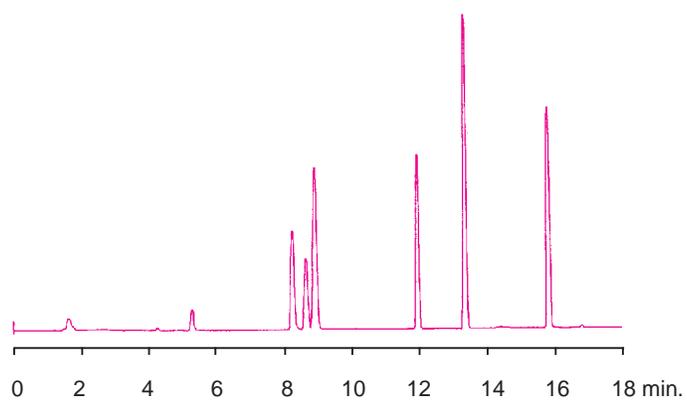


## PARTIE 1

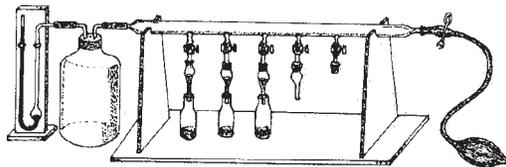
---

# Méthodes séparatives



## L'INVENTION DE LA CHROMATOGRAPHIE

On a coutume d'attribuer à Michel Tswett l'invention, peu après 1900, de la chromatographie actuelle. Au travers de ses publications successives, on peut en effet reconstituer sa démarche intellectuelle qui en fait un pionnier, si ce n'est l'inventeur, de cette importante méthode séparative. Son domaine de recherche était lié à la biochimie des plantes. À son époque on savait extraire avec de l'éthanol la chlorophylle et les autres pigments des plantes vertes, souvent des feuilles. En évaporant ce solvant, il restait un extrait noirâtre qui pouvait être redissous dans bon nombre d'autres solvants et en particulier dans l'éther de pétrole (on dirait maintenant des solvants polaires ou non polaires). Cependant on ne comprenait pas bien pourquoi ce dernier solvant était incapable d'extraire directement la chlorophylle des plantes. Tswett émit l'hypothèse que dans les plantes la chlorophylle devait être retenue par des forces qui la fixait sur la cellulose, empêchant ainsi l'éther de pétrole de l'extraire. Il entrevoyait ici le principe de l'adsorption. Pour tester cette hypothèse il eut l'idée de dissoudre l'extrait de pigments dans l'éther de pétrole et d'ajouter du papier filtre (cellulose), comme succédané du tissu des feuilles. Il s'aperçut alors que le papier captait la teinte et qu'en ajoutant de l'éthanol au mélange on pouvait ré-extraire ces mêmes pigments. En prolongement de ce travail, il décida de faire des essais systématiques avec toutes sortes de poudres dont il pouvait disposer. Pour gagner du temps, il avait réalisé un montage qui lui permettait de faire plusieurs essais simultanément.



Il plaçait les poudres à tester dans les tubes et il ajoutait à chacun d'eux une solution des pigments dans l'éther de pétrole. Cela lui permit d'observer que dans certains tubes les poudres laissaient apparaître des anneaux superposés aux couleurs différentes, ce qui témoignait que la force de rétention variait avec la nature des pigments présents. En rinçant les colonnes avec des solvants différents, il put recueillir séparément certains de ces constituants. La chromatographie moderne était née. C'est un peu plus tard, en 1906, qu'il rédigea la publication (parue dans Ber. Dtsch. Botan., Ges.), dans laquelle il écrivit le paragraphe le plus souvent cité : « Comme les radiations lumineuses dans le spectre, les différents composants d'un mélange de pigments, obéissant à une loi, se trouvent séparés sur la colonne de carbonate de calcium et peuvent ensuite être déterminés qualitativement et quantitativement. J'appelle une telle préparation un chromatogramme et la méthode correspondante la méthode chromatographique ».

## Chapitre 1

---

# Chromatographie, aspects généraux

*La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles. En chromatographie, l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. Ce procédé hydrodynamique a donné naissance à une méthode analytique instrumentale qui a un très grand domaine d'applicabilité et par suite se trouve très répandue. Aucun laboratoire analysant des composés moléculaires ne peut ignorer la chromatographie.*

### 1.1 GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE ANALYTIQUE

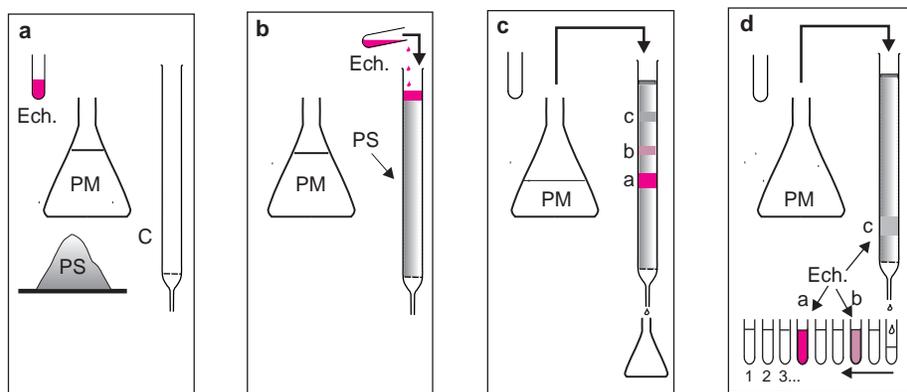
La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation, au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée, des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Les applications de ce procédé sont donc potentiellement très nombreuses, d'autant plus que beaucoup de mélanges hétérogènes ou sous forme solide peuvent être mis en solution par emploi d'un solvant (celui-ci apparaissant comme un composé supplémentaire).

L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit (fig. 1.1) :

1. On immobilise dans une *colonne* un solide finement divisé appelé *phase stationnaire*.
2. On place au sommet de cette colonne un petit volume de l'*échantillon* à séparer.
3. On force cet échantillon à traverser la colonne de haut en bas au moyen de la *phase mobile* afin d'entraîner ses divers constituants. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile.

En dehors de cette exploitation de la chromatographie qui perdure depuis son origine, ce procédé est devenu en soi une méthode d'analyse lorsqu'on eut l'idée de mesurer les temps de migration des composés dans la colonne pour les identifier. Pour cela il devenait indispensable de maîtriser certains paramètres (débits, température...) et il fallait placer en sortie de colonne un détecteur pour repérer les changements de composition de la phase mobile.

Cette application de la chromatographie, dont le but n'est plus de récupérer les composés séparés mais de mesurer leurs temps de passage dans la colonne s'est développée lentement.



**Figure 1.1** L'expérience de base en chromatographie.

a) Les ingrédients nécessaires C, colonne, PS, phase stationnaire, PM, phase mobile et E, échantillon ; b), le dépôt de l'échantillon ; c) le début de l'éluion ; d) la récupération des produits après séparation.

L'identification d'un composé par chromatographie correspond à une méthode comparative.

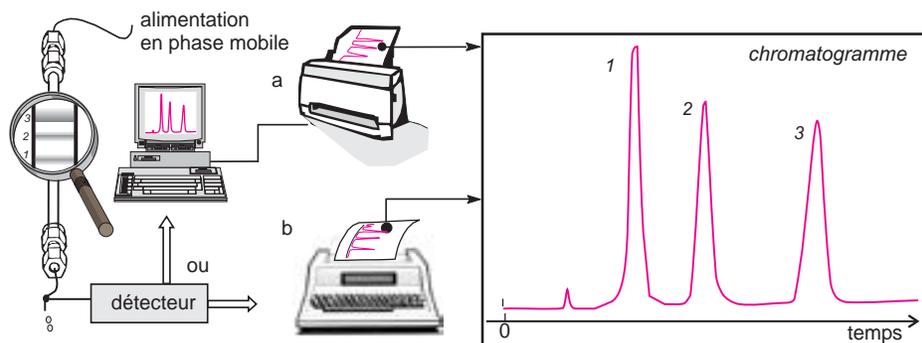
Pour identifier un composé, dont on ne sait s'il s'agit de A ou de B, par la méthode chromatographique, on compare son *temps de migration* à ceux des deux composés de référence A et B, ceci, sans changer d'appareillage et en se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales.

■ Dans une telle expérience de chromatographie analytique, on n'a pas effectué des séparations (il s'agit de produits purs) mais simplement repéré des temps de migration. Cependant il apparaît trois points faibles à cette méthode : le procédé est assez long de mise en œuvre, l'identification n'est pas absolue, et le contact physique entre l'échantillon et la phase stationnaire peut modifier ses propriétés à demeure, en particulier les temps de rétention.

Ce procédé particulier de fractionnement est né, sous sa forme moderne, au début du siècle dernier des travaux du botaniste Michaël Tswett à qui on attribue également l'invention des termes de *chromatographie* et de *chromatogramme*.

La technique s'est considérablement améliorée depuis ses débuts. On dispose actuellement de chromatographes pilotés par des logiciels qui rassemblent autour d'une colonne performante et miniaturisée – pour pouvoir séparer des micro-quantités d'échantillon – tout un ensemble d'accessoires destinés à assurer la répétabilité des expériences successives par la maîtrise parfaite des différents paramètres de séparation. Pour des analyses successives d'un même échantillon, réalisées dans des conditions identiques à plusieurs heures d'intervalle, les temps de rétention sont reproductibles à la seconde près (fig. 1.2).

Chaque séparation effectuée donne lieu à un enregistrement particulier appelé *chromatogramme*, qui correspond au tracé des variations de composition de la phase éluée au cours du temps. Pour obtenir ce document particulier, il faut placer à l'extrémité aval de la colonne un *capteur* dont il existe un grand nombre de variantes.



**Figure 1.2** Principe de l'analyse par chromatographie.

Le chromatogramme, passage obligé de toute analyse chromatographique, est obtenu à partir des variations en fonction du temps d'un signal électrique envoyé par le détecteur. Il est soit présenté en temps réel soit en différé à partir des valeurs instantanées mises en mémoire dans un micro-ordinateur. Les logiciels de chromatographie recalculent ces valeurs pour être mises au format désiré (a, imprimante). Pendant longtemps il a été obtenu avec un simple enregistreur graphique ou un enregistreur-intégrateur (b). Chromatogramme illustrant la séparation d'un mélange de 3 constituants principaux. Noter l'ordre d'apparition des pics en correspondance avec la position de chaque constituant dans la colonne.

■ L'identification d'un composé moléculaire, à partir du chromatogramme, est quelquefois aléatoire. Une manière plus sûre consiste à associer deux techniques complémentaires. On réunit, par exemple, un chromatographe et un second appareil « en ligne », tel un spectromètre de masse ou un spectromètre infrarouge. Ces méthodes couplées, du second ordre (ou bidimensionnelles) permettent de récupérer deux types d'informations indépendantes (temps de migration et « spectre »). On peut alors déterminer avec certitude la composition de mélanges complexes ou la concentration de certains composés à partir de quantités de l'ordre du nanogramme (analyses de confirmation).

## 1.2 LE CHROMATOGRAMME

Le *chromatogramme* est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne (fig. 1.3). Le temps (ou très rarement le *volume d'éluion*) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. La *ligne de base* correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. La séparation est complète quand le chromatogramme présente autant de *pics chromatographiques* revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser.

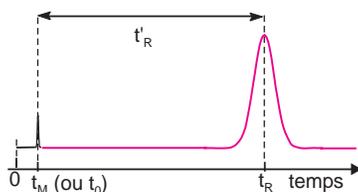
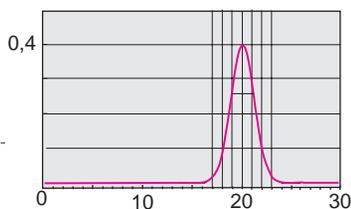
Un constituant est caractérisé par son *temps de rétention*  $t_R$ , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal  $t_R$  est indépendant de la quantité injectée. Un constituant non retenu sort de la colonne au temps  $t_M$ , appelé temps mort <sup>(1)</sup> (désigné également par  $t_0$ ).

(1) Les symboles utilisés suivent les recommandations de l'IUPAC – *Pure & Appl. Chem.*, 65(4), 819, (1993).

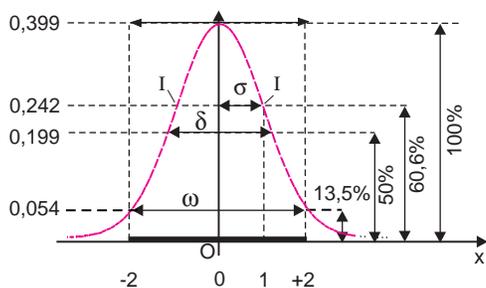
La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé  $t'_R$ .

En analyse quantitative on se contente le plus souvent de bien séparer du mélange les constituants à doser. Si le signal envoyé par le capteur varie linéairement avec la concentration d'un composé, il en sera de même de l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme.

a) temps de rétention

b) courbe de Gauss avec  $\mu = 20$  et  $\sigma = 1$ 

c) caractéristiques du pic idéal



$$\begin{aligned} \delta &= 2,35 \sigma \\ \omega &= 4 \sigma \\ \omega &= 1,7 \delta \end{aligned}$$

l'aire comprise entre  $-2$  et  $+2$  vaut 95,4% de l'aire totale comprise entre la courbe et l'axe des  $x$

d) comparaison entre un chromatogramme réel et des courbes gaussiennes

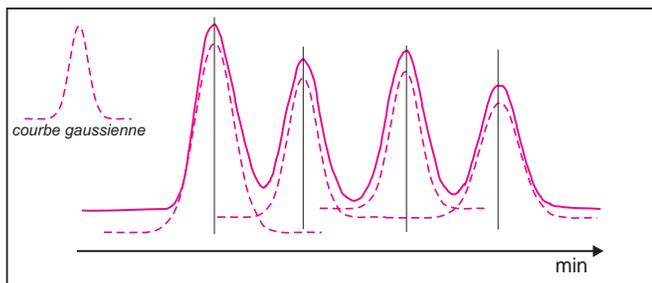


Figure 1.3 Pics chromatographiques.

a) Notion de temps de rétention ; b) exemple de tracé de la fonction 1.2 ; c) signification des trois paramètres classiques et résumé des caractéristiques d'une courbe de Gauss ; d) un exemple de chromatogramme réel qui montre que l'éluion des composés peut conduire à des pics qui ressemblent vraiment à des courbes gaussiennes.

### 1.3 PICS D'ÉLUTION GAUSSIENS

Un pic d'éluion idéal, sur un chromatogramme, a le même aspect que la représentation graphique de la loi Normale de distribution des erreurs aléatoires (courbe de Gauss 1.2, cf. § 22.3). En conservant les notations classiques,  $\mu$  correspond ici au temps de rétention et  $\sigma$  à l'écart-type du pic d'éluion (dont le carré symbolise la variance).  $y$  représente le signal, en fonction du temps  $x$ , du détecteur situé en sortie de colonne (fig. 1.3).

C'est pourquoi, afin de modéliser le signal d'un pic d'éluion parfait d'un constituant, on se sert de la fonction « densité de probabilité » (1.2).

$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left[-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right] \quad (1.1)$$

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left[-\frac{x^2}{2}\right] \quad (1.2)$$

Cette fonction caractérise une courbe paire (maximum pour  $x = 0$ ,  $y = 0,399$ ) qui possède deux points d'inflexion pour  $x = \pm 1$  (fig. 1.3), dont l'ordonnée est de 0,242 (soit 60,6 % de la valeur du maximum) et dont la largeur aux points d'inflexion est égale à  $2\sigma$ , ( $\sigma = 1$ ).

En chromatographie,  $\delta$  désigne la largeur à mi-hauteur ( $\delta = 2,35\sigma$ ) et  $\sigma^2$  la variance du pic. La largeur « à la base » du pic, appelée  $\omega$  est mesurée à 13,5 % de la hauteur, point où, la courbe étant gaussienne, on a  $\omega = 4\sigma$  par définition.

- Les chromatogrammes réels sont quelquefois loin de présenter des pics d'aspect gaussien. Il y a plusieurs raisons à cela. En particulier il se produit une irrégularité de concentration dans la zone de dépôt de la substance en tête de colonne. De plus, la vitesse de la phase mobile est nulle au niveau de la paroi et maximum au centre de la colonne. L'asymétrie observée d'un pic est traduite par deux paramètres appelés facteur d'asymétrie ( $F_a$ ) et facteur de traînée ( $F_t$ ), mesurés à 10 % de sa hauteur (pour la signification de  $a$  et  $b$ , voir figure 1.4) :

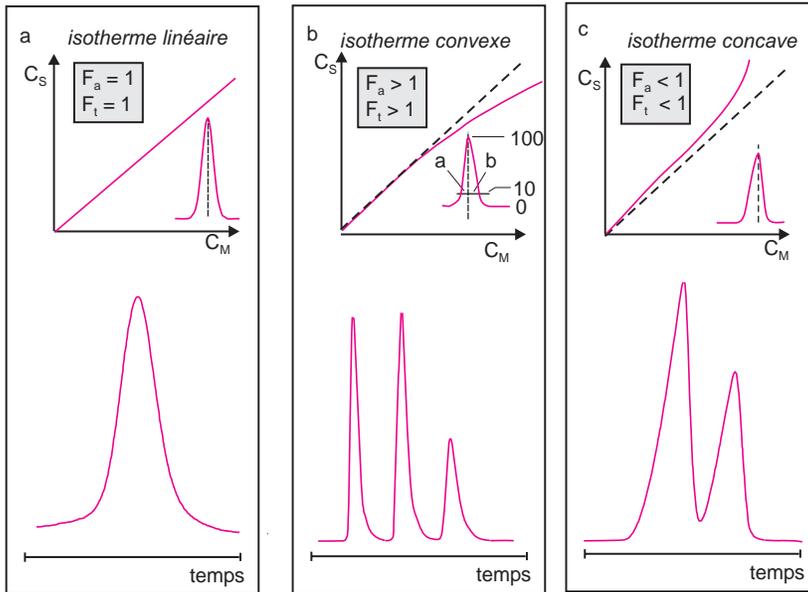
$$F_a = \frac{b}{a} \quad (1.3)$$

$$F_t = \frac{a+b}{2a} \quad (1.4)$$

### 1.4 MODÈLE DES PLATEAUX

Depuis un demi-siècle, différentes théories visant à modéliser la chromatographie ont été et continuent à être proposées. Les plus connues sont les approches statistiques (théorie stochastique), le modèle des plateaux, et l'approche par la dynamique moléculaire.

Pour expliquer le mécanisme de migration et de séparation des composés dans la colonne, le modèle le plus ancien, ou *modèle des plateaux* de Craig, est une approche statique, jugée obsolète, mais qui permet de décrire de manière simple les séparations.



**Figure 1.4** Isothermes de distribution.

a) Situation idéale correspondant à l'invariance de l'isotherme de concentration ; b) situation dans laquelle la phase stationnaire est saturée – de ce fait la montée du pic est plus rapide que la descente (facteur de traînée plus grand que 1) ; c) situation inversée : le constituant est trop retenu dans la phase stationnaire, le temps de rétention est allongé et la montée du pic est plus lente que la descente, qui apparaît normale. Pour chaque type de colonne, les fabricants indiquent quelle est leur capacité limite exprimée en ng/composé, avant déformation du pic. Les situations a, b et c sont illustrées avec des chromatogrammes réels en CLHP.

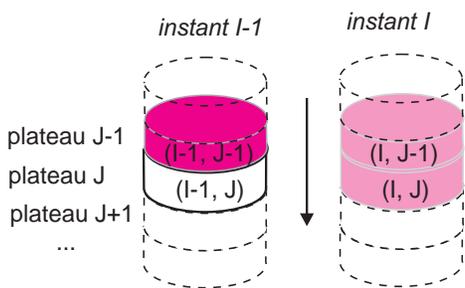
Bien que la chromatographie soit un phénomène continu, on considère dans le modèle statique de Craig, que chaque soluté se déplace progressivement en une suite d'étapes distinctes. Le processus élémentaire est représenté par un cycle d'adsorption/désorption. L'enchaînement de ces étapes reproduit la migration des fluides dans la colonne, de même qu'un film de dessins animés donne l'illusion du mouvement par un suite d'images fixes. Chaque étape correspond à un nouvel état d'équilibre de *toute* la colonne.

Ces équilibres successifs sont à la base de la notion de *plateau théorique* selon lequel la colonne de longueur  $L$  est découpée en  $N$  petits disques fictifs de même hauteur  $H$ , numérotés de 1 à  $n$ . Pour chacun d'eux, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration dans la phase stationnaire de ce soluté. À chaque nouvel équilibre le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire dans la colonne, appelé *plateau théorique*.

La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou  $H$ ) vaut donc (1.5) :

$$H = \frac{L}{N} \quad (1.5)$$

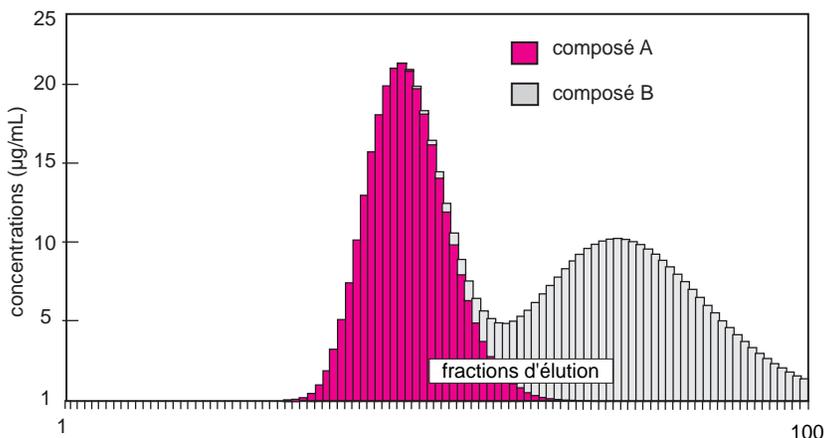
Cette approche fait appel aux règles de développement des polynômes pour calculer, au niveau de chaque plateau, les masses réparties entre les deux phases en présence.



Si on se place à l'instant  $I$ , le plateau  $J$  contient une masse totale de soluté  $m_T$  qui se compose de la quantité  $m_M$  de ce soluté qui vient d'arriver de la phase mobile du plateau  $J - 1$ , en équilibre à l'instant  $I - 1$ , à laquelle s'ajoute la quantité  $m_S$  déjà présente dans la phase stationnaire du plateau  $J$  à l'instant  $I - 1$ .

$$m_T(I, J) = m_M(I - 1, J - 1) + m_S(I - 1, J)$$

En posant que pour chaque plateau  $m_S = Km_M$  et  $m_T = m_M + m_S$ , on peut, par une formule de récurrence, calculer  $m_T$  (ainsi que  $m_M$  et  $m_S$ ). Étant donné que, pour chaque plateau, le soluté est en équilibre de concentration entre les deux phases, la masse totale de soluté en solution dans le volume de phase mobile  $V_M$  de la colonne demeure constante, tant que le soluté n'a pas atteint son extrémité. Quant au chromatogramme, il correspond à la masse transitant par la phase mobile au  $(N + 1)^{\text{e}}$  plateau (fig. 1.5) au cours des équilibres successifs. Cette théorie a pour défaut de ne pas tenir compte de la dispersion due à la diffusion des composés dans la colonne.



**Figure 1.5** Modèle des plateaux.

Simulation à l'aide d'un tableur de l'élué de deux composés A et B, chromatographiés sur une colonne de 30 plateaux ( $K_A = 0,6$ ;  $K_B = 1,6$ ;  $M_A = 300 \mu\text{g}$ ;  $M_B = 300 \mu\text{g}$ ). Composition du mélange en sortie de colonne pour les 100 premiers équilibres. L'application de ce modèle montre à l'évidence une forme de pic non symétrique. Cependant, compte tenu de la diffusion, et comme le nombre d'équilibres est très grand, la courbe prend de plus en plus nettement l'aspect d'une courbe de Gauss.

■ Le terme de plateau théorique vient d'une approche ancienne décrivant la chromatographie en prenant pour modèle la distillation par Martin et Synge (prix Nobel de chimie en 1952). Ce terme ancré pour des raisons historiques n'a pas la signification physique de son homonyme servant à mesurer les performances d'une colonne à distiller. Il aurait peut-être été préférable de le baptiser par exemple du nom de Tswett !

Le temps total  $t_R$  de migration du soluté dans la colonne peut être séparé en deux termes : le temps  $t_M$  pendant lequel il est dissous dans la phase mobile et où il progresse à la même vitesse que celle-ci, et le temps  $t_S$  pendant lequel il est fixé à la phase stationnaire et où il est donc immobile. Entre deux transferts successifs d'une phase à l'autre, on admet que les concentrations ont le temps de se rééquilibrer.

■ La chromatographie fait intervenir au moins trois équilibres : soluté/phase mobile, soluté/phase stationnaire et phase mobile/phase stationnaire. Dans une théorie récente de la chromatographie, on ne parle plus de molécules immobilisées par la phase stationnaire mais simplement ralenties lorsqu'elles passent à proximité.

## 1.5 COEFFICIENT (OU CONSTANTE) DE DISTRIBUTION DE NERNST ( $K$ )

C'est le paramètre physico-chimique de base en chromatographie qui quantifie le rapport de concentration de chaque composé entre les deux phases en présence.

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}} \quad (1.6)$$

Les valeurs de  $K$  sont très variables. Elles sont grandes (1 000, par exemple) lorsque la phase mobile est un gaz, et petites (2, par ex.) lorsque les deux phases sont à l'état condensé. Chaque composé n'occupant qu'un espace limité de la colonne et de plus avec une concentration variable, les valeurs vraies de  $C_M$  et de  $C_S$  ne sont pas accessibles mais leur rapport est constant.

■ **Chromatographie et thermodynamique.** Les relations de la thermodynamique s'appliquent aux équilibres de distribution ci-dessus.  $K$ , ( $C_S/C_M$ ), constante d'équilibre relative aux concentrations  $C$  du composé en présence des deux phases mobile ( $M$ ) et stationnaire ( $S$ ), est calculable à partir d'expériences de chromatographie. On peut donc accéder, connaissant la température de l'expérience, à la variation d'énergie libre standard  $\Delta G^0$  de cette transformation :

$$C_M \rightleftharpoons C_S \quad \Delta G^0 = -RT \ln K$$

Si, en chromatographie en phase gazeuse, par exemple, on détermine  $K$  à deux températures, il est possible de calculer (en admettant que l'enthalpie et l'entropie n'ont pas changé), les variations d'enthalpie standard  $\Delta H^0$  et d'entropie  $\Delta S^0$  :

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Les valeurs de ces trois paramètres sont négatives, en accord avec la spontanéité de cette transformation. Il est également logique que l'entropie diminue quand le composé quitte la phase mobile pour se fixer sur la phase stationnaire. De même l'équation de *van't Hoff* permet, entre autres, une approche plus rigoureuse de l'effet de la température sur les temps de rétention d'un composé. On comprend donc que dans toute étude complète de la chromatographie, on fasse appel à la thermodynamique classique.

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

## 1.6 EFFICACITÉ D'UNE COLONNE

### 1.6.1 Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

À mesure que le soluté migre dans la colonne, il occupe une zone allant s'élargissant (fig. 1.6). Cette dispersion linéaire  $\sigma_L$ , repérée par la variance  $\sigma_L^2$  croît avec la distance parcourue. Lorsque cette distance vaut  $L$ , longueur de la colonne, on pose :

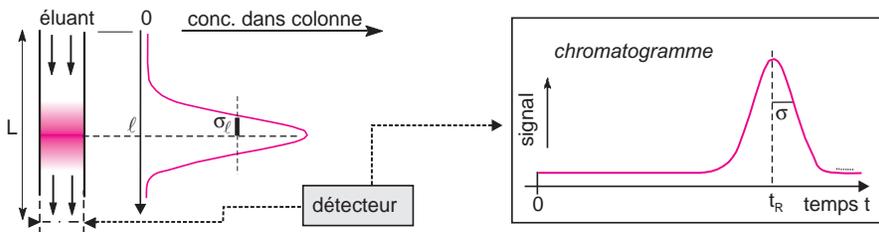
$$\sigma_L^2 = H \cdot L \quad (1.7)$$

En rappel du modèle de la théorie des plateaux, cette approche conduit à la valeur de la hauteur équivalente à un plateau théorique  $H$  et au nombre  $N$  de plateaux théoriques ( $N = L/H$ ).

Donc, pour tout chromatogramme, à partir d'un pic d'éluion d'un composé, dont on pourra mesurer la variance temporelle  $\sigma^2$ , on pourra calculer pour le composé en question l'efficacité théorique  $N$  (1.8) et en déduire la valeur de  $H$  sachant que  $H = L/N$ .

$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2} \quad \text{ou} \quad N = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \quad (1.8)$$

Ces deux paramètres sont accessibles de manière indirecte à partir du pic d'éluion du composé. On mesure  $t_R$  et  $\sigma$  dont le rapport a même valeur que celui de  $L$  et de  $\sigma_L$  (1.8).



**Figure 1.6** Dispersion d'un soluté dans une colonne et traduction sur le chromatogramme.

La courbe de gauche correspond à une image *isochrone* de la concentration du composé élué à l'instant considéré, et le chromatogramme de droite, à la variation de la concentration en sortie de colonne en fonction du temps.  $t_R$  et  $\sigma$  sont dans le même rapport que  $L$  et  $\sigma_L$ . L'efficacité  $N$  peut être calculée à partir du chromatogramme en utilisant un double décimètre. Sur le graphe ci-dessus on trouverait environ 100 plateaux théoriques.

Sur le chromatogramme,  $\sigma$  représente la demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur et  $t_R$  le temps de rétention du composé.  $t_R$  et  $\sigma$  doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant). Si on exprime  $\sigma$  en unités de volume (en faisant intervenir le débit),  $4\sigma$  correspond au « volume du pic » soit 95 % du composé injecté. Par suite des propriétés de la courbe de Gauss ( $\omega = 4\sigma$ ), il en résulte la formule 1.9. Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée : on utilise de préférence la formule équivalente 1.10.

$N$  est un paramètre relatif, puisqu'il dépend à la fois du soluté et des conditions opératoires suivies. On choisit généralement un constituant qui apparaît en fin ce chromato-

gramme pour avoir une valeur repère, à défaut de savoir si la colonne permet de réussir une séparation donnée.

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2} \quad (1.9)$$

$$N = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2} \quad (1.10)$$

### 1.6.2 Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

Afin de comparer les performances de colonnes de conceptions différentes, vis-à-vis d'un même composé, – c'était notamment le cas en CPG lorsqu'on voulait comparer les performances d'une colonne capillaire et d'une colonne remplie – on remplace le temps total  $t_R$  qui figure dans les expressions 1.8 à 1.10 par le *temps de rétention réduit*  $t'_R$  qui ne tient pas compte du temps mort  $t_M$  passé par le composé dans la phase mobile. Les trois précédentes expressions deviennent :

$$N_{\text{eff}} = \frac{t'^2_R}{\sigma^2} \quad (1.11)$$

$$N_{\text{eff}} = 16 \frac{t'^2_R}{\omega^2} \quad (1.12)$$

$$N_{\text{eff}} = 5,54 \frac{t'^2_R}{\delta^2} \quad (1.13)$$

On considère actuellement que ces trois dernières relations ne sont plus de grande utilité.

### 1.6.3 Hauteur de plateau

La *hauteur équivalent à un plateau théorique*  $H$  a déjà été définie (formule 1.5). Ce paramètre est calculé pour des composés de référence car il permet de comparer des colonnes de longueurs différentes, bien qu'il ne s'agisse en aucune façon d'une constante. Sa valeur dépend du composé choisi et des conditions de l'expérience.

- En chromatographie gazeuse, on a longtemps utilisé une valeur corrigée appelée hauteur de plateau effectif  $H_{\text{eff}}$  faisant intervenir l'efficacité réelle à la place de l'efficacité théorique.

Le calcul de  $H_{\text{eff}}$  à partir de l'efficacité réelle utilise l'expression 1.14 :

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{N_{\text{eff}}} \quad (1.14)$$

- **Hauteur de plateau réduite.** En chromatographie dont la phase mobile est un liquide et pour les colonnes dont le remplissage est formé de particules sphériques, on rencontre assez souvent la hauteur de plateau réduite,  $h$ , qui tient compte du diamètre moyen  $d_m$  des particules. On élimine en quelque sorte l'effet de la taille des particules. Des colonnes présentant le même rapport (longueur de la colonne)/(diamètre des particules) conduisent à des performances semblables.

$$h = \frac{H}{d_m} = \frac{L}{N \cdot d_m} \quad (1.15)$$

## 1.7 GRANDEURS DE RÉTENTION

### 1.7.1 Temps de rétention

La définition du temps de rétention a été précédemment donnée dans le paragraphe 1.2.

### 1.7.2 Volume d'élution ou volume de rétention $V_R$

Le volume d'élution (de rétention)  $V_R$  de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si le débit  $\mathcal{D}$  est stationnaire,

$$V_R = t_R \cdot \mathcal{D} \quad (1.16)$$

■ **Volume d'un pic,  $V_{pic}$ .** Il correspond au volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne. Il vaut par définition :

$$V_{pic} = \omega \cdot \mathcal{D} \quad (1.17)$$

### 1.7.3 Volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort $V_M$ )

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort)  $V_M$  correspond au volume interstitiel accessible. Il peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. On peut l'exprimer en fonction de  $t_M$  et du débit  $\mathcal{D}$  :

$$V_M = t_M \cdot \mathcal{D} \quad (1.18)$$

### 1.7.4 Volume de la phase stationnaire

Ce volume désigné par  $V_S$  n'apparaît pas sur le chromatogramme. Dans les cas simples on le calcule en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

### 1.7.5 Facteur de rétention $k$ (ou de capacité)

Quand un composé de masse totale  $m_T$  est introduit dans la colonne, il se répartit en deux quantités :  $m_M$  dans la phase mobile et  $m_S$  dans la phase stationnaire. Si on ne change pas les conditions opératoires, ces deux quantités demeurent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Leur rapport, appelé *facteur de rétention*, est indépendant de  $m_T$  :

$$k = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad (1.19)$$

Le facteur de rétention, encore appelé *facteur de capacité*  $k$ , est un paramètre très important de la chromatographie. Il est défini en régime isocratique. Ce n'est pas une constante, bien qu'il ne varie pas avec le débit ou la longueur de la colonne, car il dépend des conditions opératoires. Pour cette raison il est quelque fois désigné par  $k'$  au lieu de  $k$ .

Ce paramètre rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque composé (*capacité*). Dans la mise au point des séparations on fait en sorte que  $k$  ne dépasse pas 10, afin de ne pas trop allonger le temps de passage des composés.

### Approche expérimentale du facteur de rétention $k$

En s'appuyant sur le modèle de Craig, on imagine que chaque molécule d'un composé passe alternativement de la phase mobile (où elle progresse à la vitesse de celle-ci), à la phase stationnaire (où elle est alors immobile). Sa vitesse moyenne de progression dans la colonne est donc d'autant plus lente que le cumul des temps passés dans la phase stationnaire est plus grand.

Si on extrapole maintenant au cas de  $n$  molécules semblables de ce composé (l'échantillon de masse  $m_T$ ), on admettra qu'à chaque instant, le rapport du nombre des  $n_S$  molécules fixées sur la phase stationnaire (masse  $m_S$ ) et des  $n_M$  molécules présentes dans la phase mobile (masse  $m_M$ ), est le même que celui des temps passés dans chaque phase pour une molécule isolée. Les trois rapports suivants ont donc même valeur :

$$\frac{n_S}{n_M} = \frac{m_S}{m_M} = \frac{t_S}{t_M} = k$$

- Prenons le cas d'une molécule qui passe les 3/4 de son temps dans la phase stationnaire. Sa vitesse moyenne sera 4 fois plus lente que si elle restait en permanence dans la phase mobile. Par conséquent si 4  $\mu\text{g}$  de composé ont été introduits dans la colonne, il y aura en moyenne et en permanence 1  $\mu\text{g}$  dans la phase mobile et 3  $\mu\text{g}$  dans la phase stationnaire.

Sachant que le temps de rétention d'un composé  $t_R$  est tel que  $t_R = t_M + t_S$ , la valeur de  $k$  est donc accessible à partir du chromatogramme ( $t_S = t'_R$ ) (voir figure 1.7) :

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1.20)$$

Cette relation importante est également souvent rencontrée sous la forme :

$$t_R = t_M(1 + k) \quad (1.21)$$

Compte tenu des relations 1.16 et 1.18, le volume de rétention  $V_R$  d'un soluté pourra s'écrire :

$$V_R = V_M(1 + k) \quad (1.22)$$

ou :

$$V_R = V_M + K V_S \quad (1.23)$$

Cette dernière expression qui relie les paramètres expérimentaux au coefficient thermodynamique de distribution  $K$  est valable pour une chromatographie idéale.

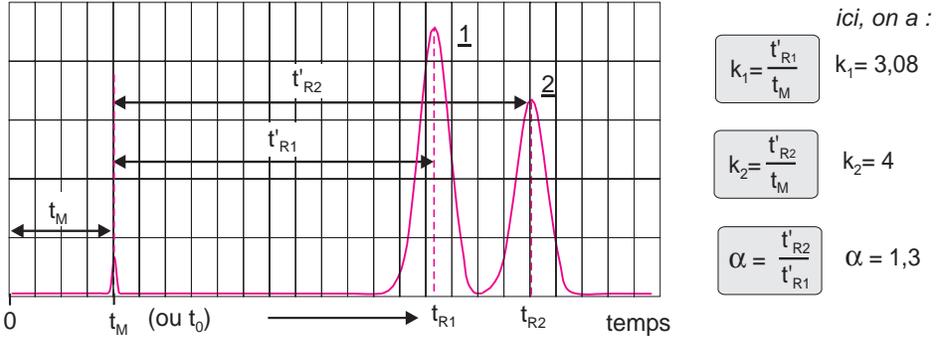
## 1.8 FACTEUR DE SÉPARATION (OU SÉLECTIVITÉ) ENTRE DEUX SOLUTÉS

Le facteur de séparation  $\alpha$  (1.24) permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents 1 et 2 sur un chromatogramme (fig. 1.7). Il est défini par les relations suivantes (1.24 et 1.25). Il ne peut, par définition, être inférieur à 1 :

$$\alpha = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}} \quad (1.24)$$

ou

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad (1.25)$$



**Figure 1.7** Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents. Chaque composé a un facteur de rétention qui lui est propre.  $\alpha$  à lui seul, ne permet pas de savoir si la séparation est réellement possible. Sur cette figure, le facteur de séparation est d'environ 1,3.

Pour des pics non adjacents, on définit le **facteur de rétention relative**  $r$ , qui, calculé comme  $\alpha$ , ne peut être inférieur à 1.

## 1.9 FACTEUR DE RÉOLUTION ENTRE DEUX PICS

Pour traduire numériquement la plus ou moins bonne séparation entre deux composés, on utilise le facteur de résolution  $R$  qui est calculé à partir du chromatogramme (fig. 1.8) :

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2} \quad (1.26)$$

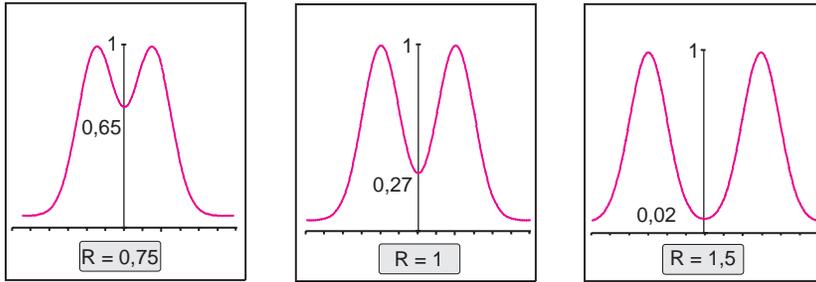
- Il existe, pour exprimer la résolution, d'autres relations dérivées des précédentes, établies en vue de remplacer un paramètre par un autre, ou admettant des hypothèses simplificatrices. Ainsi les deux expressions 1.27 et 1.28 sont-elles très souvent employées.

La relation 1.28 montre l'influence, sur la résolution, de l'efficacité, du facteur de capacité et de la sélectivité. La figure 1.9 en est une vérification expérimentale.

$$R = 1,177 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\delta_1 + \delta_2} \quad (1.27)$$

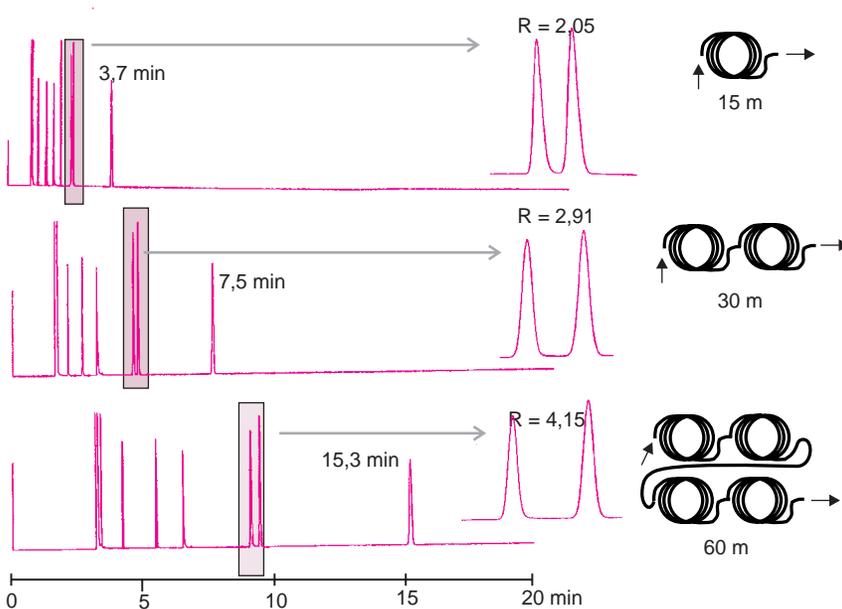
$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (1.28)$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \cdot \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2} \quad (1.29)$$



**Figure 1.8** Facteur de résolution.

Simulation de pics chromatographiques par juxtaposition plus ou moins rapprochée de 2 courbes gaussiennes identiques. Aspect visuel correspondant aux valeurs de  $R$  indiquées sur les diagrammes. À partir de  $R = 1,5$  on considère que les pics sont résolus, la vallée entre les pics étant d'environ 2 %.



**Figure 1.9** Effet de la longueur de la colonne sur la résolution.

Expériences faites en chromatographie en phase gazeuse en modifiant seulement la longueur de la colonne capillaire. On illustre ainsi qu'en doublant la longueur de la colonne la résolution est multipliée par 1,41 (adapté d'un document de la société Waters).

## 1.10 INFLUENCE DE LA VITESSE DE LA PHASE MOBILE

Dans tout ce qui précède, en particulier dans les différentes expressions caractérisant les séparations, la vitesse de la phase mobile dans la colonne n'est pas prise en compte. Or, de toute évidence, cette vitesse doit avoir une incidence sur la progression des analytes dans la colonne, donc sur leur dispersion, en bref sur la qualité de l'analyse en cours.

L'influence de la vitesse de la phase mobile a été mise en évidence par Van Deemter qui a proposé la première équation cinétique, dans le cas des colonnes remplies en chromatographie en phase gazeuse.

### 1.10.1 Équation de Van Deemter

La forme simplifiée, proposée par cet auteur en 1956, est très connue en chromatographie en phase gazeuse, pour les colonnes remplies (1.30). Elle relie  $H$  (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile  $\bar{u}$  dans la colonne (fig. 1.10) :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u} \quad (1.30)$$

Cette équation montre qu'il existe un *débit optimal* pour chaque colonne, correspondant au minimum de  $H$ , tel que le prévoit la courbe représentant l'équation 1.30. La diminution de l'efficacité, quand le débit croît, correspond à un résultat que chacun a pu découvrir à ses dépens en voulant accélérer une séparation chromatographique par augmentation du débit de la phase mobile. Ce qui est moins intuitif par contre, est la perte d'efficacité due à un débit trop lent. Pour expliquer ce phénomène, il faut revenir sur l'origine des termes  $A$ ,  $B$  et  $C$  dont chacun a un domaine d'influence qui peut être repéré sur le graphe (fig. 1.10).

Les trois coefficients numériques expérimentaux  $A$ ,  $B$  et  $C$  sont reliés à divers paramètres physico-chimiques, à la colonne et aux conditions opératoires. Si on choisit d'exprimer  $H$  en cm,  $A$  sera en cm,  $B$  en  $\text{cm}^2/\text{s}$  et  $C$  en s (la vitesse étant en  $\text{cm}/\text{s}$ ). La courbe représentative de cette fonction est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum ( $H_{\min}$ ) pour :

$$\bar{u}_{\text{opt.}} = \sqrt{\frac{B}{C}} \quad (1.31)$$

#### *A, terme de remplissage $A = 2 \lambda \cdot d_p$*

Le terme  $A$  est en relation avec le profil d'écoulement de la phase mobile à travers la phase stationnaire. La taille des particules (de diamètre  $d_p$ ), leur répartition dimensionnelle et la régularité du remplissage (paramètre  $\lambda$ ) sont à l'origine de chemins préférentiels qui peuvent conduire à des échanges imparfaits entre les deux phases. C'est le facteur de diffusion d'Eddy, ou diffusion turbulente, considéré comme peu important en chromatographie liquide et absent par nature pour les colonnes capillaires WCOT en CPG (équation de Golay sans terme  $A$ , cf. 1.10.2).

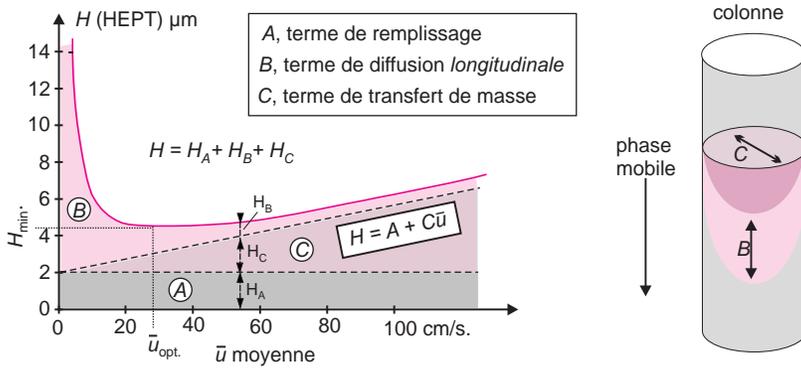
#### *B, terme de diffusion dans la phase mobile $B = 2 \gamma D_G$*

Le second terme  $B$ , qui peut être exprimé à partir de  $D_G$ , coefficient de diffusion de l'analyte dans la phase mobile et  $\gamma$ , facteur de tortuosité, est à considérer surtout si la phase mobile est un gaz. La diffusion longitudinale dans la colonne est, en effet, rapide. C'est une conséquence de l'entropie qui nous rappelle qu'un système évolue spontanément vers un plus grand désordre, telle la goutte d'encre qui diffuse dans le verre d'eau où elle vient de tomber. En conséquence, si le débit est trop faible, les produits en cours de séparation se mélangent à nouveau plus vite qu'ils ne migrent. On retiendra à ce propos qu'on ne doit jamais interrompre provisoirement une chromatographie en cours, au risque de perdre toute efficacité.

#### *C, terme de transfert de masse $C = C_G + C_L$*

Le terme  $C$ , dû à la résistance au transfert de masse du soluté entre les deux phases, devient prépondérant lorsque le passage est trop rapide pour que l'équilibre soit atteint. Des

turbulences locales au sein de la phase mobile et des gradients de concentration ont pour conséquence de retarder la mise en équilibre ( $C_S \rightleftharpoons C_M$ ). La diffusion entre les deux phases n'est pas instantanée, si bien que le soluté sera entraîné hors équilibre. Il n'existe pas de formule simple rendant compte des différents facteurs intégrés dans le paramètre  $C$ . Le terme  $C_G$  dépend du coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile gazeuse, alors que le paramètre  $C_L$  dépend du coefficient de diffusion dans la phase stationnaire liquide.



**Figure 1.10** Courbe de Van Deemter en chromatographie gazeuse avec indication des domaines propres à A, B et C. Il existe également une équation semblable à celle de Van Deemter qui fait intervenir cette fois la température :  $H = A + B/T + C \cdot T$ .

■ Dans la pratique on accède aux valeurs des coefficients A, B, C, en faisant plusieurs mesures d'efficacité pour un même composé chromatographié à des débits différents, puisque débit et vitesse linéaire moyenne sont reliés. On calcule ensuite l'équation de l'hyperbole qui satisfait au mieux les valeurs expérimentales, de préférence par la méthode de régression linéaire multiple.

### 1.10.2 Équation de Golay

En 1958, Golay a proposé une équation comparable réservée aux seules colonnes capillaires de la chromatographie en phase gazeuse.

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + C_L \cdot \bar{u} + C_G \cdot \bar{u} \tag{1.32}$$

■ La relation 1.32 permet d'établir une HEPT minimum pour toute colonne de rayon  $r$  si l'on connaît le facteur de rétention du composé test.

On peut calculer alors l'efficacité d'imprégnation (coating efficiency) de la colonne qui est égale au produit par 100 du rapport de la valeur ainsi trouvée et de celle qui est déduite de l'efficacité ( $H = L/N$ ) obtenue à partir du chromatogramme.

$$H_{\text{min. théo.}} = r \sqrt{\frac{1 + 6k + 11k^2}{3(1+k)^2}} \tag{1.33}$$

### 1.10.3 Équation de Knox

Une autre équation – connue sous le nom d'équation de Knox – plus récente (1977), est applicable aux divers types de chromatographie liquide. Elle fait intervenir la hauteur réduite :

$$h = A \bar{u}^{1/3} + \frac{B}{\bar{u}} + C \bar{u} \quad (1.34)$$

## 1.11 OPTIMISATION D'UNE ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

La chromatographie analytique est essentiellement utilisée en analyse quantitative. À cette fin, il faut pouvoir déterminer les aires des pics des espèces à doser, donc les séparer. Pour y parvenir on fait de plus en plus souvent appel à des logiciels d'optimisation basés sur la connaissance du processus chromatographique. C'est l'étape de l'optimisation de l'analyse qui met à profit les connaissances de l'analyste et les ressources de l'appareil pour simuler les résultats à attendre des modifications de la composition de la phase mobile et d'autres paramètres physico-chimiques tels la température ou le pH dans le cas de substances ionisables.

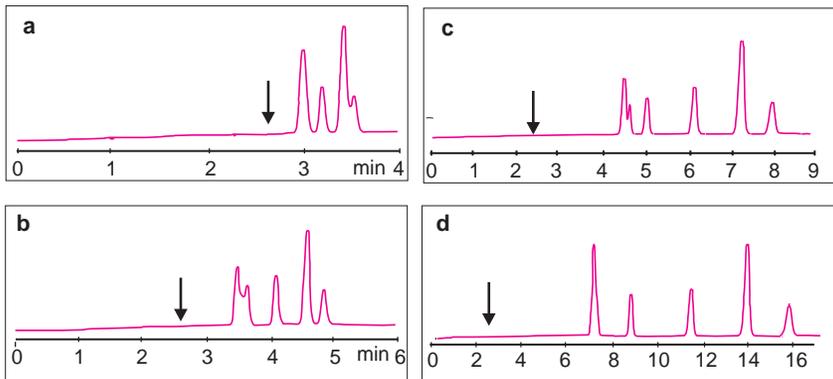
- En chromatographie en phase gazeuse, les séparations peuvent être si complexes qu'on ne peut déterminer par avance s'il est préférable de baisser ou d'élever la température. Le choix de la colonne, de sa longueur, de son diamètre, de la phase stationnaire, du rapport de phase ainsi que des paramètres de séparation (température et débit), sont autant de facteurs qui interagissent les uns sur les autres.

La *résolution* et le *temps d'éluion* sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante du ou des composés intéressants en un minimum de temps. Dans certains cas, il ne faut toutefois pas oublier le temps nécessaire à la colonne pour revenir aux conditions initiales avant d'effectuer l'analyse suivante. La chromatographie correspond en effet à un type d'analyse lente. Si la résolution est très bonne, l'optimisation aura encore sa raison d'être pour gagner du temps en utilisant une colonne plus courte – sachant que la résolution est affectée d'un facteur faisant intervenir la racine carrée de la longueur de la colonne (*cf.* le paramètre  $N$  de la formule 1.28 et la figure 1.9).

Quand on modifie le débit dans une séparation avec gradient on observe des changements importants sur le chromatogramme. La sélectivité entre pics est perturbée, comme le sont bien sûr les temps de rétention. La figure 1.11 illustre par un exemple l'optimisation d'une séparation, en chromatographie liquide, d'un mélange d'hydrocarbures aromatiques par modification de la composition de la phase mobile. On remarquera que cette optimisation s'accompagne d'une augmentation importante du temps d'analyse pour « boucler le cycle ».

Si on ne s'intéresse qu'à certains des composés présents, on peut faire appel à un détecteur sélectif qui ne verra, à la limite, qu'eux seuls. Dans d'autres cas, par contre, on s'attache à séparer le plus grand nombre possible de composés du mélange initial.

Suivant les types de chromatographie, l'optimisation est plus ou moins rapide. En chromatographie en phase gazeuse elle est plus facile qu'en chromatographie liquide où intervient la composition de la phase mobile : des logiciels ont été spécialement créés pour aider

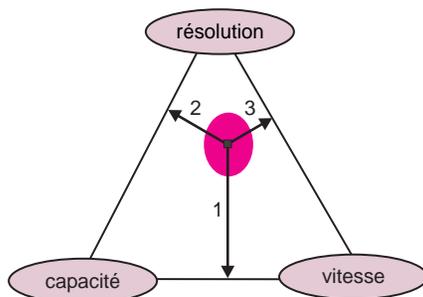


**Figure 1.11** Chromatogrammes d'une séparation.

La phase mobile est un mélange binaire eau/acétonitrile : a) 50/50 ; b) 55/45 ; c) 60/40 ; d) 6/35. La flèche indique le temps mort  $t_M$  (min), (selon J.W. Dolan, *LC-GC Int*, 1994, 7(6), 333).

au meilleur choix de la composition de la phase mobile. Moyennant certaines hypothèses (pics gaussiens ou non), on peut calculer avec assez de précision les aires des pics mal résolus.

Le chromatographe est toujours prisonnier d'un triangle dont les sommets correspondent à la résolution, à la vitesse et à la capacité, trois paramètres qui s'opposent (fig. 1.12). Une chromatographie analytique optimisée utilise à plein le potentiel du paramètre le plus efficace : la sélectivité. Dans ce triangle elle se situe donc près du sommet *résolution*.



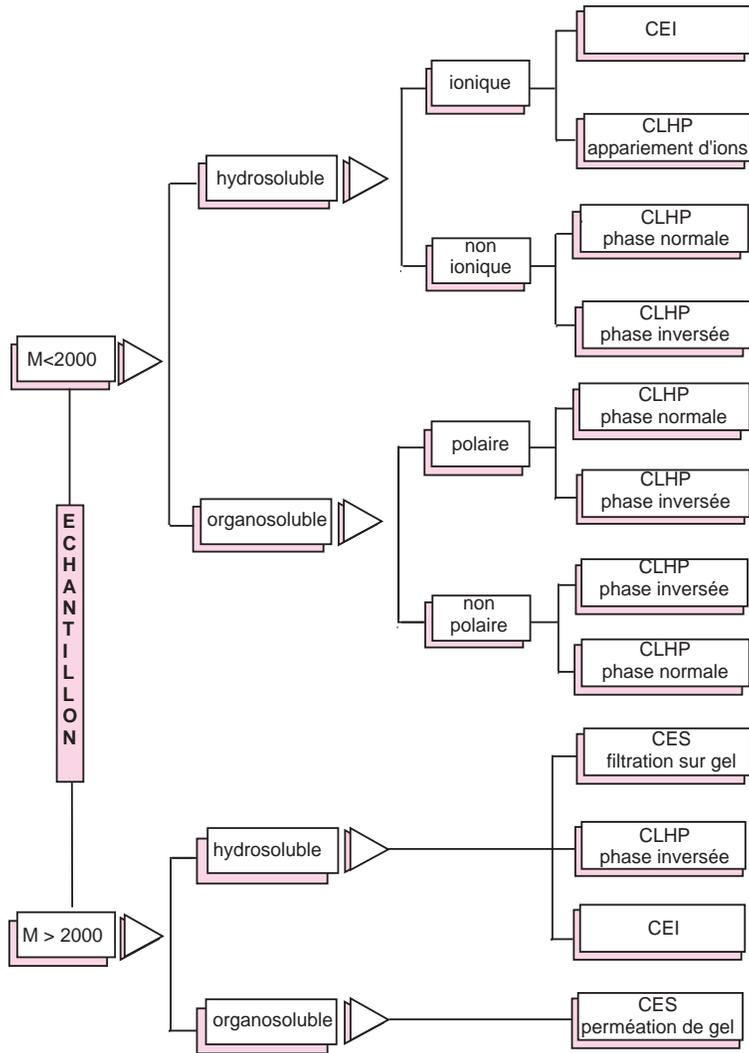
**Figure 1.12** Le triangle des chromatographistes.

La zone ombrée indique le domaine qui correspond à la chromatographie analytique. Celle-ci tire profit des 5 paramètres :  $K$ ,  $N$ ,  $k$ ,  $\alpha$  et  $R$ .

## 1.12 LES DIVERSES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Les techniques chromatographiques peuvent être réparties suivant plusieurs critères : en fonction de la *nature* des deux phases en présence, ou du *procédé utilisé*, ou du *phénomène physico-chimique* responsable du coefficient de distribution  $K$  vu précédemment (fig. 1.6).

Le classement suivi ci-après est établi à partir de la nature physique des phases (fig. 1.13).



**Figure 1.13** Guide de sélection se rapportant aux différentes techniques chromatographiques utilisant une phase mobile liquide. On choisira en fonction de la séparation à effectuer, la technique la mieux adaptée.

### 1.12.1 Chromatographie en phase liquide (CPL)

Ici la phase mobile est un liquide. C'est ce type de chromatographie auquel appartient la forme la plus anciennement connue en tant que méthode préparative de séparation. Cette catégorie très répandue peut être subdivisée d'après le phénomène mis en jeu :

**Chromatographie liquide/solide (ou d'adsorption).** La phase stationnaire est un milieu solide perméable sur lequel les molécules adhèrent par un double effet de physisorption et de chimisorption. Le paramètre physico-chimique concerné est le *coefficient d'adsorption*. Les phases stationnaires ont fait beaucoup de progrès depuis Tswett, qui utilisait le carbonate de calcium ou l'inuline (un polymère en poudre très fine du sucre ordinaire).

**Chromatographie ionique.** La phase stationnaire solide comporte en surface des sites ioniques et la phase mobile est une solution-tampon aqueuse. La séparation met en jeu des échanges entre les ions de l'échantillon avec ceux de la phase stationnaire. La séparation repose sur les *coefficients de distribution ionique*.

**Chromatographie d'exclusion.** La phase stationnaire est un matériau comportant des pores dont les dimensions sont choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise ainsi une sorte de perméation sélective à l'échelle moléculaire. Selon la nature, aqueuse ou organique de la phase mobile, cette technique est désignée par *filtration sur gel* ou *perméation de gel*. Le coefficient de distribution prend le nom de *coefficient de diffusion*.

**Chromatographie liquide/liquide ou de partage (CLL).** La phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un matériau inerte et poreux qui n'a qu'un rôle de support. L'imprégnation, le procédé le plus ancien pour immobiliser un liquide, est une voie maintenant abandonnée, par suite d'un risque important de lessivage de la colonne.

**Chromatographie liquide/phase greffée.** Pour immobiliser la phase stationnaire (il s'agit généralement d'un polymère de type liquide), on fixe de manière définitive les espèces qui la composent par des liaisons covalentes : c'est la technique du *greffage*. La séparation repose sur le *coefficient de partage  $K$*  du soluté entre les deux phases, un phénomène comparable à l'extraction d'une phase aqueuse avec un solvant dans une ampoule à décanter.

### 1.12.2 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La phase mobile est un gaz inerte et, comme précédemment, ce type de chromatographie peut être subdivisé selon le phénomène mis en œuvre :

**Chromatographie gaz/liquide (CGL).** La phase mobile est un gaz et la phase stationnaire est un liquide immobilisé soit par imprégnation, soit par greffage sur un support inerte lequel peut être tout simplement la paroi de la colonne. À défaut d'être un gaz, l'échantillon doit donc être porté à l'état de vapeur. Ce sont Martin et Synge qui ont suggéré le remplacement de la phase mobile liquide par un gaz afin d'améliorer les séparations. C'est à partir de cette époque qu'on assista au véritable démarrage de la chromatographie analytique. Ici encore c'est le coefficient de partage  $K$  qui est concerné.

**Chromatographie gaz/solide (CGS).** La phase stationnaire est un solide poreux (carbone graphite ou gel de silice ou alumine) et la phase mobile est un gaz. Ce type de CPG est très performant pour les analyses de mélanges de gaz ou de composés à bas point d'ébullition. Le paramètre concerné est le coefficient d'adsorption.

### 1.12.3 Chromatographie en phase supercritique

La phase mobile est un fluide à l'état supercritique, tel le dioxyde de carbone vers 50 °C et 150 bars (15 MPa). La phase stationnaire peut être un liquide ou un solide. On réunit ainsi les avantages propres aux techniques précédentes (gaz/phase greffée ou liquide/phase greffée).

## ANALYSE QUANTITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE

Le développement considérable pris par la chromatographie en analyse quantitative est dû essentiellement à sa fiabilité et à sa précision. La relation entre la **masse injectée** de l'analyte dans la colonne et l'**aire du pic** correspondant sur le chromatogramme conduit à une méthode comparative, utilisée dans beaucoup de protocoles normalisés de dosages. La reproductibilité des séparations alliée à des logiciels de traitement de données permet d'automatiser les tâches de calcul associées à ces analyses. Les dosages de traces et d'ultratraces par chromatographie sont reconnus en particulier dans les méthodes EPA de l'environnement, bien que leur prix de revient soit assez élevé. Les trois méthodes les plus utilisées sont décrites ci-après dans leur configuration la plus simple.

### 1.13 PRINCIPE ET RELATION DE BASE

Pour calculer la concentration massique d'un composé responsable d'un pic sur le chromatogramme il faut réunir deux conditions : *disposer d'un échantillon authentique du composé* que l'on veut doser, à usage de référence, pour déterminer la sensibilité du détecteur à son égard, et disposer d'un moyen logiciel ou autre pour connaître soit les *hauteurs* soit les *aires* des différents pics d'élution d'intérêt. Toutes les méthodes de quantification en chromatographie sont donc des méthodes comparatives et non pas absolues.

Pour un réglage donné de l'appareil, on admet qu'il existe pour chaque pic du chromatogramme une relation linéaire entre son aire (ou sa hauteur) et la quantité du composé responsable de ce pic dans l'échantillon injecté. Cette relation est valable pour une plage de concentrations qui dépend du détecteur employé. On traduit cette hypothèse par :

$$m_i = K_i A_i \quad (1.35)$$

$m_i$  masse du composé  $i$  injectée dans la colonne

$K_i$  coefficient de réponse absolu du composé  $i$

$A_i$  aire du pic d'élution du composé  $i$

Le coefficient absolu  $K_i$  (à ne pas confondre avec le coefficient de partition), dépend du réglage du chromatographe. Ce n'est pas un paramètre intrinsèque du composé.

Pour calculer le coefficient  $K_i$  d'un composé  $i$ , il faut, d'après cette relation, connaître l'aire  $A_i$  et la masse  $m_i$  traversant la colonne. Or cette masse est difficile à déterminer avec précision, car elle dépend à la fois de la seringue et de l'injecteur (en CPG) ou de la boucle d'injection (en CPL). C'est pourquoi les méthodes utilisées en analyse quantitative, préprogrammées dans les enregistreurs-intégrateurs ou logiciels divers, évitent de faire intervenir les coefficients de réponse absolus  $K_i$ .

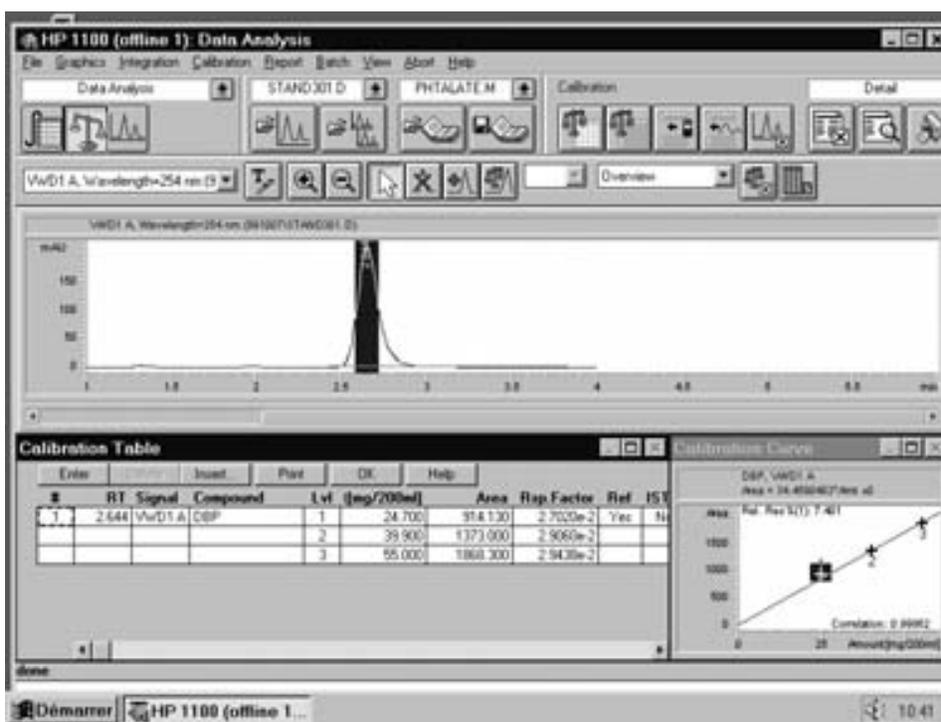
### 1.14 AIRES DES PICS ET LOGICIELS DE CHROMATOGRAPHIE

Pour déterminer les aires des pics, on utilise les fonctions spécialement prévues des logiciels de chromatographie, qui assurent non seulement le pilotage du chromatographe, mais qui

peuvent, en plus de l'acquisition des chromatogrammes, analyser les données, quantifier et fournir le rapport d'analyse correspondant à l'une des méthodes d'analyse quantitative préprogrammées (fig. 1.14).

Le signal analogique récupéré au niveau du détecteur est échantillonné par un circuit ADC, au rythme d'une centaine de fois par seconde afin de pouvoir reproduire correctement les pics les plus fins des chromatogrammes obtenus notamment en CPG avec les colonnes capillaires. Tous les logiciels permettent d'effectuer des corrections de ligne de base, de prendre en compte les pics négatifs et de choisir une méthode d'intégration pour les pics.

- La méthode manuelle de calcul de la surface d'un pic par triangulation n'est plus employée. Il est utile cependant de savoir que pour un pic gaussien, le produit de sa largeur à mi-hauteur par sa hauteur, correspond à environ 94 % de la surface totale du pic. De même l'usage d'un enregistreur-intégrateur pour mesurer l'aire des pics n'est plus guère employé.



**Figure 1.14** Un logiciel d'analyse quantitative en chromatographie.

Le signal du détecteur n'étant pas numérisé à la sortie du chromatographe, sa conversion analogique/numérique est assurée à l'entrée du micro-ordinateur. Le chromatogramme, mémorisé sous forme de nombres sert de base à l'exploitation par le logiciel. Différentes fenêtres de travail affichent aires, droite d'étalonnage, type de méthode etc. (Logiciel Chem-station de la société Agilent Technologies).

## 1.15 MÉTHODE DE L'ÉTALONNAGE EXTERNE

Cette méthode permet de calculer la teneur (en termes de concentration ou de pourcentage massique) d'un ou plusieurs constituants apparaissant séparés sur le chromatogramme,

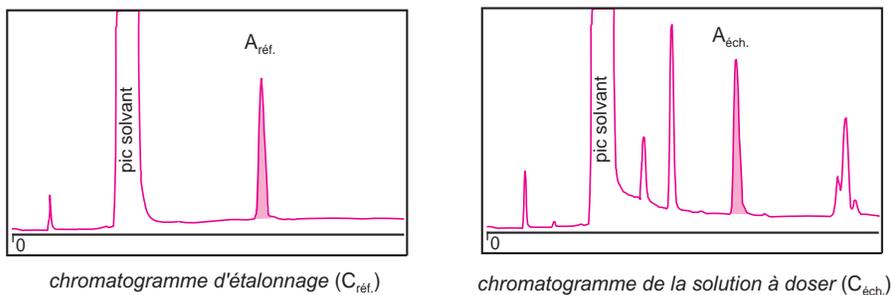
même en présence d'autres composés donnant des pics non résolus. Facile de mise en œuvre, elle correspond à l'application d'un principe commun à beaucoup de dosages.

Le procédé repose sur la comparaison de deux chromatogrammes obtenus successivement *sans changer les conditions de réglage* de l'appareil (fig. 1.15). Le premier est un chromatogramme de référence acquis à partir d'une solution de référence (conc.  $C_{\text{réf}}$ ) dans un solvant, du composé qui fait l'objet du dosage. On injecte un volume  $V$  de cette solution et on repère sur le chromatogramme l'aire  $A_{\text{réf}}$  du pic correspondant. Le second résulte de l'injection d'un volume identique  $V$  de l'échantillon en solution, contenant le composé à doser (conc.  $C_{\text{éch}}$ ). Soit  $A_{\text{éch}}$  l'aire du pic correspondant. Puisque les volumes injectés sont égaux, il y a proportionnalité entre les aires, qui dépendent des masses injectées, et les concentrations correspondantes ( $m_i = C_i \cdot V$ ). La relation 1.35 appliquée aux deux chromatogrammes conduit à la relation 1.36 caractéristique de cette méthode :

$$m_{\text{réf}} = C_{\text{réf}} \cdot V = K \cdot A_{\text{réf}} \quad \text{et} \quad m_{\text{éch}} = C_{\text{éch}} \cdot V = K \cdot A_{\text{éch}}$$

soit :

$$C_{\text{éch}} = C_{\text{réf}} \frac{A_{\text{éch}}}{A_{\text{réf}}} \quad (1.36)$$



**Figure 1.15** Méthode de dosage par étalonnage externe.

La précision de cette méthode est améliorée lorsqu'on utilise plusieurs solutions afin de tracer la droite d'étalonnage. Pour l'analyse de traces, il est parfois conseillé, en chromatographie liquide, de remplacer les aires des pics par leurs hauteurs qui sont moins sensibles aux variations de débit de la phase mobile.

L'étalonnage est possible, comme ici sur la figure 1.15, avec un seul point de mesure (la « droite d'étalonnage » passe donc par l'origine). La précision sera meilleure si les concentrations des solutions de référence et de l'échantillon sont du même ordre de grandeur. Il s'entend que les réglages de l'appareil ne doivent pas être modifiés entre les injections.

Cette méthode, faisant appel aux *coefficients de réponse absolus*, donne des résultats très fiables avec les chromatographes performants actuels qui sont équipés d'un auto-échantillonneur : ce dernier constitué de la réunion d'un carrousel porte-échantillons et d'un injecteur automatique permet d'enchaîner plusieurs dosages sans intervention humaine. Une seule solution de référence permet de compenser une éventuelle dérive de l'instrument par des ré-injections programmées de contrôle.

La précision du dosage est évidemment améliorée en calculant la moyenne des aires obtenues à partir de plusieurs injections identiques, mais, quitte à faire plusieurs mesures, il est alors préférable de procéder à un étalonnage multipoints (*multilevel calibration*). Pour

cela on injecte des volumes égaux d'une série de solutions étalons. Les résultats d'analyse sont directement obtenus à partir de la courbe d'étalonnage  $A = f(C)$ .

Cette méthode, la seule qui soit adaptée aux échantillons de gaz, a également pour avantage qu'on n'ajoute aucun composé à la solution échantillon, à la différence de celle qui fait l'objet du paragraphe suivant.

## 1.16 MÉTHODE DE L'ÉTALONNAGE INTERNE (ÉTALON INTERNE)

Cette deuxième méthode repose sur l'utilisation du *coefficient de réponse relatif* de chaque composé à doser vis-à-vis d'un marqueur introduit comme référence. Cela permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés, un handicap de la précédente méthode.

La méthode nécessite, ici encore, deux chromatogrammes, l'un pour calculer les coefficients de réponse relatifs et l'autre pour l'analyse de l'échantillon.

Les aires des pics des produits à quantifier sont donc comparées avec celle d'un composé de référence, appelé *étalon interne*, introduit à une concentration connue dans l'échantillon.

### 1.16.1 Calcul des coefficients de réponse relatifs

Supposons que l'échantillon contienne deux composés à doser 1 et 2, et que le composé *E* désigne un composé supplémentaire à usage d'étalon interne (fig. 1.16).

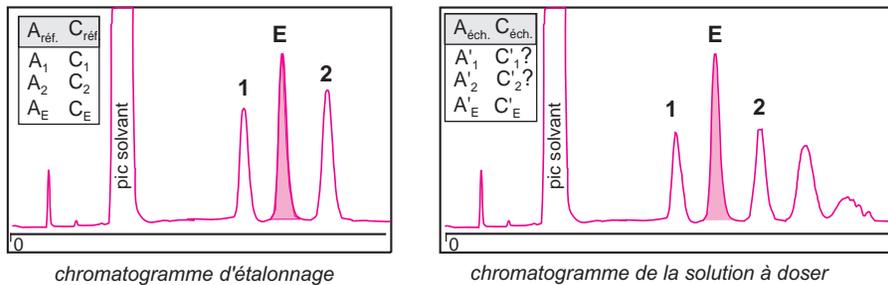


Figure 1.16 Méthode d'analyse par étalonnage interne.

Dans une première étape, on commence par préparer une solution de concentration  $C_1$  en 1,  $C_2$  en 2 et  $C_E$  en *E*. Appelons  $A_1$ ,  $A_2$  et  $A_E$  les aires des pics d'éluion repérés sur le chromatogramme obtenu à partir d'une prise d'essai de cette solution. Si  $m_1$ ,  $m_2$  et  $m_E$  sont les quantités réellement introduites dans la colonne, on peut écrire les trois relations du type 1.35 suivantes :

$$\begin{aligned} m_1 &= K_1 \cdot A_1 \\ m_2 &= K_2 \cdot A_2 \\ m_E &= K_E \cdot A_E \end{aligned}$$

soit :

$$\frac{m_1}{m_E} = \frac{K_1 \cdot A_1}{K_E \cdot A_E} \quad \text{et} \quad \frac{m_2}{m_E} = \frac{K_2 \cdot A_2}{K_E \cdot A_E}$$

Ces rapports permettent de calculer les coefficients de réponse relatifs de 1 et de 2 vis-à-vis de  $E$  choisi comme étalon, et désignés par  $K_{1/E}$  et  $K_{2/E}$  :

$$K_{1/E} = \frac{K_1}{K_2} = \frac{m_1 \cdot A_E}{m_E \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/E} = \frac{K_2}{K_E} = \frac{m_2 \cdot A_E}{m_E \cdot A_2}$$

Comme les masses  $m_i$  réellement injectées sont proportionnelles aux concentrations massiques correspondantes  $C_i$ , ( $m_i = C_i \cdot V$ ), on en déduit les deux expressions suivantes :

$$K_{1/E} = \frac{C_1 \cdot A_E}{C_E \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/E} = \frac{C_2 \cdot A_E}{C_E \cdot A_2}$$

### 1.16.2 Chromatographie de l'échantillon – Calcul des concentrations

La seconde étape de l'analyse consiste à chromatographier un volume quelconque d'une solution faite avec l'échantillon à étudier et dans laquelle a été ajoutée une quantité connue du composé  $E$ . Soient  $A'_1$ ,  $A'_2$  et  $A'_E$ , les aires du nouveau chromatogramme obtenu dans les mêmes conditions opératoires. Si  $m'_1$ ,  $m'_2$  et  $m'_E$  désignent les masses de 1, 2 et  $E$  réellement introduites dans la colonne, on aura :

$$\frac{m'_1}{m'_E} = K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad \frac{m'_2}{m'_E} = K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E}$$

À partir des coefficients relatifs calculés dans la première expérience ainsi que de la concentration de l'étalon interne dans l'échantillon,  $C'_E$ , connue, on accède à :

$$C'_1 = C'_E K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad C'_2 = C'_E K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E}$$

En généralisant à  $n$  constituants, on peut calculer la concentration massique du soluté  $i$  au moyen de l'expression 1.37 :

$$C'_i = C'_E K_{i/E} \frac{A'_i}{A'_E} \quad (1.37)$$

et en déduire sa teneur dans l'échantillon, exprimée en %, (expression 1.38) :

$$x_i \% = \frac{C'_i}{\text{Masse d'échantillon prélevée}} \times 100 \quad (1.38)$$

Cette méthode est encore plus précise si on fait plusieurs injections de l'étalon ou de l'échantillon à doser. En conclusion cette méthode générale et reproductible exige néanmoins un bon choix de l'étalon interne dont les caractéristiques peuvent se résumer ainsi :

- il doit être pur et ne pas se trouver initialement dans l'échantillon ;
- son pic d'éluion doit être bien résolu par rapport à tous ceux qui forment le chromatogramme de l'échantillon ;
- son temps de rétention doit être proche de celui (ou de ceux) du (ou des) soluté(s) à doser ;
- sa concentration doit être proche ou supérieure à celle des autres solutés pour être dans les conditions d'une réponse linéaire du détecteur ;
- il doit être inerte vis-à-vis des composés de l'échantillon.

## 1.17 MÉTHODE PAR NORMALISATION INTERNE

Cette méthode, également appelée « 100 % normalisée », est réservée aux mélanges dont on a identifié tous les constituants par autant de pics d'élution séparés sur le chromatogramme, afin de pouvoir faire le bilan complet de l'échantillon concerné.

Supposons qu'il s'agisse de trouver les concentrations massiques d'un mélange de trois composés 1, 2, 3 (fig. 1.17). On va procéder ici encore en deux étapes.

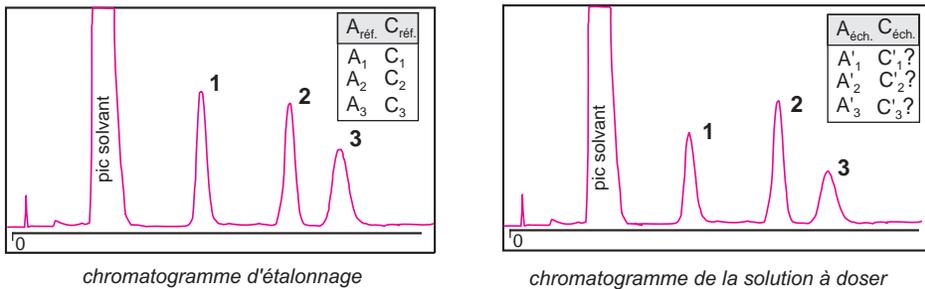


Figure 1.17 Méthode d'analyse par normalisation interne.

### 1.17.1 Calcul des coefficients de réponse relatifs

On prépare une solution d'étalonnage contenant les trois composés 1, 2, et 3 dont les concentrations massiques sont respectivement  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ . Le chromatogramme correspondant à l'injection d'un volume  $V$ , présente trois pics d'aires  $A_1$ ,  $A_2$  et  $A_3$ . Ces aires seront reliées aux masses injectées  $m_1$ ,  $m_2$  et  $m_3$  par trois expressions du type 1.35.

On choisit l'un des composés comme substance de normalisation interne, le composé 3 par exemple, afin de déterminer les coefficients de réponse relatifs  $K_{1/3}$  et  $K_{2/3}$  des composés 1 et 2 par rapport à 3. On trouve comme précédemment :

$$K_{1/3} = \frac{K_1}{K_3} = \frac{m_1 \cdot A_3}{m_3 \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/3} = \frac{K_2}{K_3} = \frac{m_2 \cdot A_3}{m_3 \cdot A_2}$$

Étant donné que  $m_i = C_i \cdot V$ , on aboutit, pour  $K_{1/3}$  et  $K_{2/3}$ , aux expressions suivantes :

$$K_{1/3} = \frac{C_1 \cdot A_3}{C_3 \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/3} = \frac{C_2 \cdot A_3}{C_3 \cdot A_2}$$

### 1.17.2 Chromatographie de l'échantillon – Calcul des concentrations

On procède ensuite à l'injection d'un prise d'essai du mélange à doser contenant les constituants 1, 2 et 3. En désignant les surfaces des pics d'élution par  $A'_1$ ,  $A'_2$  et  $A'_3$ , on aura accès directement à la composition centésimale massique du mélange représentée par  $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$  en écrivant trois expressions de la forme :

$$x_i \% = \frac{K_{i/3} \cdot A'_i}{K_{1/3} \cdot A'_1 + K_{2/3} \cdot A'_2 + A'_3} \times 100 \quad (\text{avec } i = 1, 2, 3)$$

la condition de normalisation étant que  $x_1 + x_2 + x_3 = 100$

■ En extrapolant à  $n$  solutés normalisés par rapport à un soluté  $j$ , l'expression générale des facteurs de réponse est la suivante (pour un composé choisi  $i$ ) :

$$K_{i/j} = \frac{C_i \cdot A_j}{C_j \cdot A_i} \quad (1.39)$$

Il est également possible de déterminer des  $K_{i/j}$  moyens par tracé du graphe concentration-réponse pour chaque soluté.

Pour l'échantillon contenant  $n$  solutés, si  $A'_i$  désigne l'aire du pic d'élution du composé  $i$ , le composé servant de référence interne étant  $j$ , la teneur en composé  $i$  obéira à la relation :

$$x_i \% = \frac{K_{i/j} \cdot A'_i}{\sum_{i=1}^n K_{i/j} \cdot A'_i} \times 100 \quad (1.40)$$

## EXERCICES

*Solutions en fin d'ouvrage*

### Exercice 1.1

On mélange dans un erlenmeyer 6 mL de gel de silice et 40 mL d'un solvant contenant en solution 100 mg d'un composé considéré comme non volatil. Après avoir bien agité ce mélange, on laisse décanter et on recueille 10 mL du solvant que l'on évapore. Le résidu pèse 12 mg.

Calculer le coefficient d'adsorption  $K = C_S/C_M$  de ce composé dans cette expérience.

### Exercice 1.2

Calculer le facteur de séparation entre 2 composés 1 et 2 dont les volumes de rétention sont respectivement égaux à 6 et 7 mL. Le volume mort de la colonne utilisée est de 1 mL.

Montrer que ce facteur est égal au rapport des coefficients de distribution  $K_2/K_1$  de ces composés ( $t_{R(1)} < t_{R(2)}$ ).

### Exercice 1.3

Pour un soluté donné, montrer que le temps d'analyse — qu'on peut assimiler au temps de rétention du composé le plus retenu —, dépend, entre autres, de la longueur de la colonne  $L$ , de la vitesse linéaire moyenne  $\bar{u}$  de la phase mobile et des volumes  $V_S$  et  $V_M$  qui désignent respectivement le volume de la phase stationnaire et celui de la phase mobile.

### Exercice 1.4

La formule (2) est quelquefois employée pour calculer  $N_{\text{eff}}$ . Montrer que cette formule est équivalente à la formule classique (1).

$$N_{\text{eff}} = 5,54 \frac{(t_R - t_M)^2}{\delta^2} \quad (1)$$

$$N_{\text{eff}} = N \frac{k^2}{(1 + k^2)} \quad (2)$$

---

### Exercice 1.5

Le facteur de résolution  $R$ , pour deux solutés 1 et 2 dont les pics d'élution sont adjacents, est exprimé par la relation (1) :

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2} \quad (1)$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (2)$$

**a)** Montrer, si on admet que les deux pics adjacents ont même largeur à la base ( $\omega_1 = \omega_2$ ), que l'expression (2) est équivalente à (1).

**b)** La formule suivante permet de calculer le nombre de plateaux effectifs  $N_{\text{eff}}$ , en fonction de  $\alpha$ , pour une résolution donnée  $R$ . Retrouver cette expression.

$$N_{\text{eff}} = 16 R^2 \frac{\alpha^2}{(\alpha - 1)^2}$$

---

### Exercice 1.6

Montrer que si l'efficacité  $N$  est la même pour deux composés 1 et 2 voisins, l'expression classique de la résolution devient :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2} \quad (1)$$

Montrer qu'en posant  $\bar{k} = \frac{k_1 + k_2}{2}$  les expressions (1) et (2) sont équivalentes :

$$R = \frac{1}{2} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \frac{\bar{k}}{1 + \bar{k}} \quad (2)$$

---

### Exercice 1.7

Un rapport de chromatogramme nous donne :

Largeur à 10 % de la hauteur : 0,085 min, Facteur d'asymétrie : 1,024.

Quelle est la valeur du facteur de traînée ?

---

### Exercice 1.8

On veut déterminer par la méthode de normalisation interne la composition massique d'un échantillon constitué de 4 esters de l'acide butanoïque. Une solution de référence de ces quatre esters (concentrations massiques connues) conduit aux valeurs suivantes des coefficients de réponse relatifs des butanoates de méthyle (ME), d'éthyle (EE) et de propyle (PE) par rapport au butanoate de butyle (BE) :

$$k_{\text{ME/BE}} = 0,919 ; \quad k_{\text{EE/BE}} = 0,913 ; \quad k_{\text{PE/BE}} = 1,06.$$

À partir des indications données en page suivante, fournies par le chromatogramme de l'échantillon à doser, trouver la composition massique de ce mélange.

$N^{\circ}$ pic	$t_R$	Composé	Aire (unités arbitraires)
1	2,54	méthyl ester (ME)	2340,1
2	3,47	éthyl ester (EE)	2359,0
3	5,57	propyl ester (PE)	4077,3
4	7,34	butyl ester (BE)	4320,7

### Exercice 1.9

Dosage de la sérotonine *S* (5-hydroxytryptamine) par la méthode de l'étalon interne.

On prélève 1 mL de la solution à doser à laquelle on ajoute 1 mL d'une solution contenant 30 ng de *N*-méthylsérotonine (*NMS*). On traite ce mélange pour le débarrasser d'autres composés gênants. On opère par extraction en phase solide pour isoler la sérotonine et son dérivé méthylé, dilués dans une phase convenable.

**a)** Pourquoi ajoute-t-on le composé d'étalonnage interne avant l'étape d'extraction ?

**b)** Calculer le facteur de réponse de la sérotonine par rapport à la *N*-méthylsérotonine sachant que le chromatogramme d'étalonnage conduit aux résultats suivants :

– aire sérotonine                      30 885 982  $\mu\text{V}\cdot\text{s}$             quantité injectée : 5 ng

– aire *N*-méthylsérotonine        30 956 727  $\mu\text{V}\cdot\text{s}$             quantité injectée : 5 ng

À partir du chromatogramme de la solution échantillon, trouver quelle est la concentration en sérotonine dans l'échantillon de départ sachant que l'aire du pic sérotonine vaut 2 573 832  $\mu\text{V}\cdot\text{s}$  et l'aire du pic *N*-méthylsérotonine 1 719 818  $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ .

## Chapitre 2

---

# Chromatographie liquide haute performance

*Parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) est la plus connue. Son champ d'application recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire. L'efficacité des colonnes est moindre qu'en CPG, mais l'utilisation de phases chirales ou des nouvelles phases stationnaires opérant suivant plusieurs modes, les techniques par appariement d'ions ainsi que d'interaction hydrophobe accroissent encore plus les possibilités de la CLHP. Enfin la miniaturisation de la technique (nanochromatographie) a facilité son association avec la spectrométrie de masse.*

### 2.1 L'ORIGINE DE LA CLHP

La chromatographie liquide haute performance, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

Ces phases, constituées de la réunion de micro-particules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 micromètres ou de matériaux monolithiques poreux conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable. Pour marquer cette particularité de la technique, la lettre P du sigle CLHP a pendant longtemps correspondu au mot *pression*.

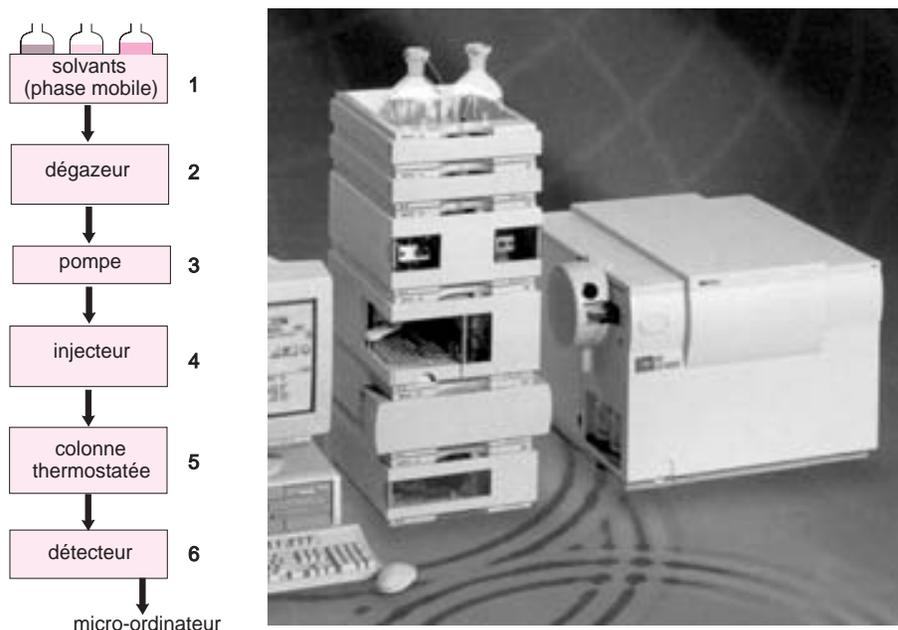
- La migration forcée d'une phase liquide au contact d'une phase stationnaire se retrouve dans plusieurs techniques chromatographiques. La particularité de la CLHP est de faire intervenir des mécanismes d'échange soluté/phase mobile/phase stationnaire basés sur les coefficients d'adsorption ou de partage.

## 2.2 CONCEPTION GÉNÉRALE D'UN APPAREIL DE CLHP

Une installation de CLHP comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement (fig. 2.1).

Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK® (ou *polyether-etherketone*), un polymère souple et coloré qui résiste aux solvants usuels, même sous des pressions élevées (350 bars).

- L'écoulement des faibles débits obéit à la loi de Poiseuille. La vitesse de la phase mobile est maximum au centre des canalisations et nulle au contact des parois. Une dispersion des composés se produit donc inévitablement. Pour améliorer les séparations on fait donc en sorte que le volume de phase mobile hors-colonne soit le plus réduit possible (10 % du volume mort de la colonne).



**Figure 2.1** Schéma d'une installation de CLHP avec double détection.  
Un exemple de réalisation de type modulaire.

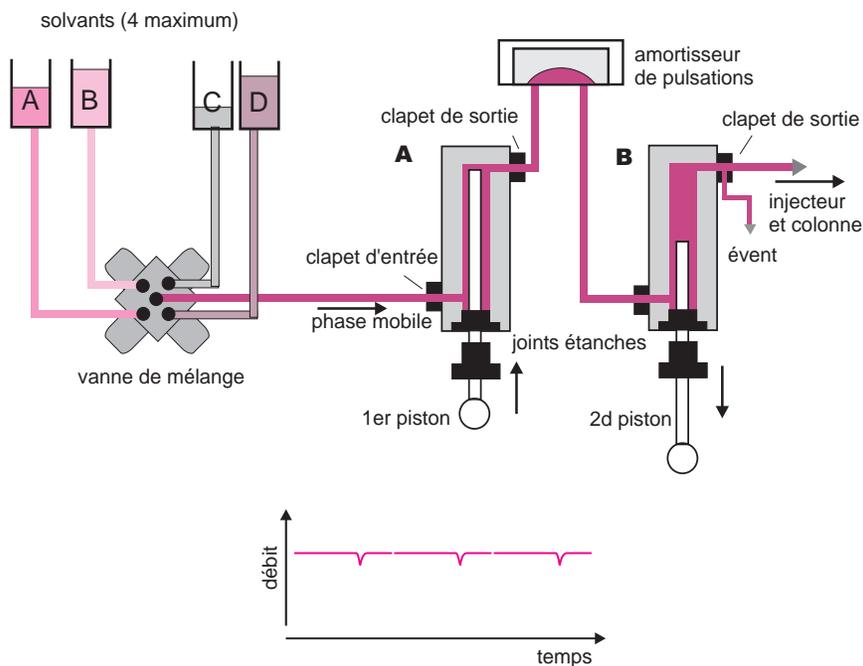
L'utilisateur compose son installation en fonction des applications prévues. La présentation en colonne des différents modules est commune à de très nombreux modèles concurrents. Ici le chromatographe modèle HP 1100 (reproduit avec l'autorisation de la société Agilent Technologies), comporte un injecteur automatique permettant un fonctionnement en continu et une colonne thermostatée pour améliorer la reproductibilité des séparations. Les composés élués, après passage par le détecteur UV sont identifiés avec encore plus de certitude au moyen d'un spectromètre de masse (cf. chapitre 16), situé à droite de l'image.

## 2.3 POMPES ET GRADIENTS D'ÉLUTION

### 2.3.1 Pompes pour éluants

Toute installation de CLHP comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars) selon le débit imposé à la phase mobile ou sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire.

On utilise des pompes conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable, même si la composition de la phase mobile varie. Ces pompes *débitométriques* comportent généralement deux pistons en série fonctionnant en opposition pour éviter les interruptions de débit dues au remplissage du cylindre (fig. 2.2). Le déplacement des pistons est contrôlé par un moteur pas à pas associé à une came de forme particulière.



**Figure 2.2** Principe de fonctionnement d'une pompe à deux têtes en série.

De manière simplifiée et en ignorant les corrections de compressibilité des solvants, on peut décrire ainsi le cycle de fonctionnement. Partant de l'instant où le clapet de sortie du cylindre A vient de se fermer et le clapet d'entrée vient de s'ouvrir, le piston de A recule pour remplir la chambre A. Pendant ce temps le cylindre B est ouvert et le piston de B avance pour chasser la phase mobile vers la colonne. Le volume déplacé par le piston de B est deux fois plus petit que le volume aspiré par le piston de A. Arrivé au fond de sa course, le clapet d'entrée de A se ferme et le clapet de sortie s'ouvre. Le piston de A avance et chasse le contenu du cylindre A. Ce volume pour moitié est expulsé vers la colonne, l'autre moitié servant à remplir le cylindre B dans sa phase de recul. Entre les deux cylindres est placé un amortisseur de pulsations (dessin réalisé à partir d'un document de la société Agilent-Technologies). (En bas), Variations de débit d'une pompe en fonction des cycles.

■ La présence, dans les solvants, des gaz ambiants ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ...), dissous en quantité non négligeable, peut perturber les séparations par modification de la compressibilité des éluants et formation éventuelle de bulles. En outre le dioxygène abrège la vie des colonnes et est gênant pour les détecteurs électrochimiques ou photométriques UV. Il est donc préférable de dégazer les solvants, soit avec des ultrasons soit par barbotage d'hélium, soit par diffusion en les faisant passer dans un long tube de petit diamètre en polymère perméable aux gaz.

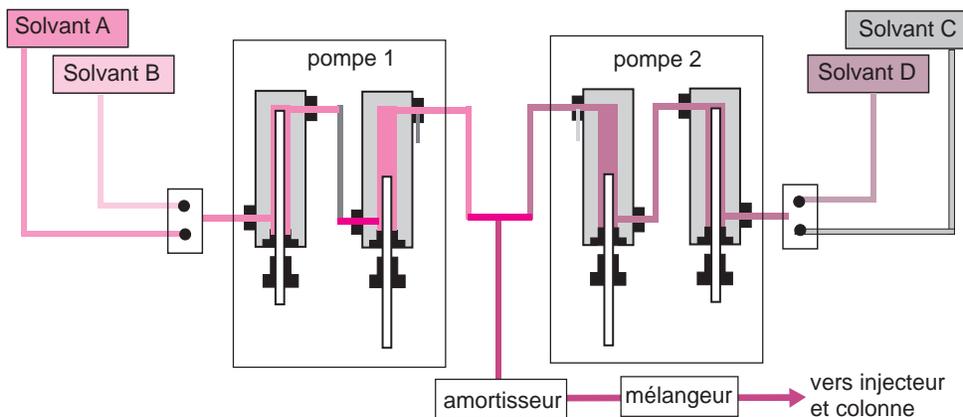
Pour parfaire la régulation du débit, on intercale entre la (ou les) pompe(s) et l'injecteur un amortisseur de pulsations fonctionnant suivant le principe mécanique du ballastage. Le montage le plus simple consiste à intercaler dans le circuit de la phase liquide un tube de faible section de plusieurs mètres de long, enroulé sur lui-même. Sous l'effet de l'onde de pression de solvant envoyée par la pompe, le tube se déplie légèrement ce qui augmente son volume interne et par là, contrecarre la variation de pression.

■ Pour obtenir les micro-débits ( $1 \mu L/min$ , par exemple) nécessaires aux colonnes capillaires remplies, on utilise les mêmes pompes en ajoutant à la sortie un by-pass pour diviser le débit en deux fractions dont seule la plus petite est dirigée vers la colonne.

Par ailleurs pour résister aux pH acides de beaucoup de mélanges d'éluion, qui sont d'autant plus corrosifs que la pression est plus grande, les pièces et revêtements au contact de la phase mobile doivent être inertes. Ainsi les pistons ou clapets des pompes sont en téflon ou alliages spéciaux et souvent même en pierres précieuses, saphir ou agate.

Suivant leur conception, les chromatographes comportent une ou plusieurs pompes. Associées à une chambre de mélange située en amont ou en aval, elles permettent de délivrer un éluant de composition fixe (*mode isocratique*) ou au contraire de composition variable pour faire un *gradient d'éluion*. Le système doit tenir compte dans ce second cas des différences de compressibilité des solvants, afin que la composition soit respectée à la pression d'utilisation.

### 2.3.2 Gradients basse-pression ou haute-pression



**Figure 2.3** Exemple de configuration pour gradient haute pression.

Les pompes sont appelées binaires, ternaires, quaternaires suivant le nombre de solvants qu'elles peuvent mélanger (ici binaires).

Pour réaliser des gradients de phases mobiles, il faut plusieurs solvants. Si l'installation comporte une pompe unique, elle doit être précédée d'une chambre de mélange *basse-pression* dans laquelle des électrovannes font rentrer les différents solvants selon un programme. Par opposition, d'autres installations comportent plusieurs pompes, spécialisées chacune pour un ou deux solvants (pompes binaires), sachant que le mélange final est obtenu sous *haute-pression*, dans une sorte de té placé avant la colonne (fig. 2.3).

- Lorsqu'on doit enchaîner plusieurs analyses on évite si possible de recourir à l'usage de gradients, en recherchant un compromis de séparation réalisable avec un éluant de composition fixe. On réduit ainsi le temps de post-analyse qui sépare les analyses consécutives. On considère en effet qu'avec un gradient, il faut, pour rééquilibrer les deux phases entre elles avec la composition de départ, faire passer dans la colonne au moins 10 fois le volume mort de l'installation.

## 2.4 INJECTEURS

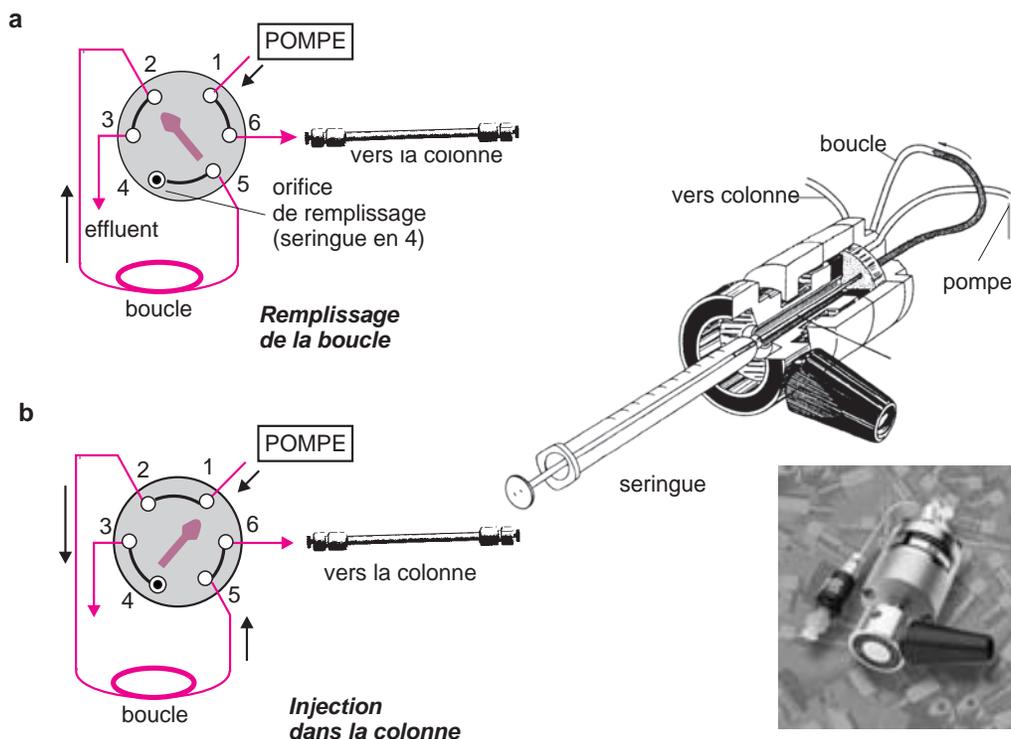
L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne (fig. 2.4). Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 30 000 kPa. Elle fonctionne en deux temps :

- Dans la position *chargement*, où seule la communication entre pompe et colonne est assurée (fig. 2.5), l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé *boucle*. Celle-ci, dont il existe tout un choix de volumes, est soit extérieure, soit intégrée dans le corps de la vanne.
- Dans la position *injection*, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de  $60^\circ$  d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle.



**Figure 2.4** Vanne d'injection pour CLHP et boucles assorties.

Vanne vue de l'arrière (vanne à 6 entrées/sorties avec une boucle raccordée) et assortiment de boucles de différents volumes (reproduit avec l'autorisation de la société Rheodyne Inc.).



**Figure 2.5** Injection avec une boucle.

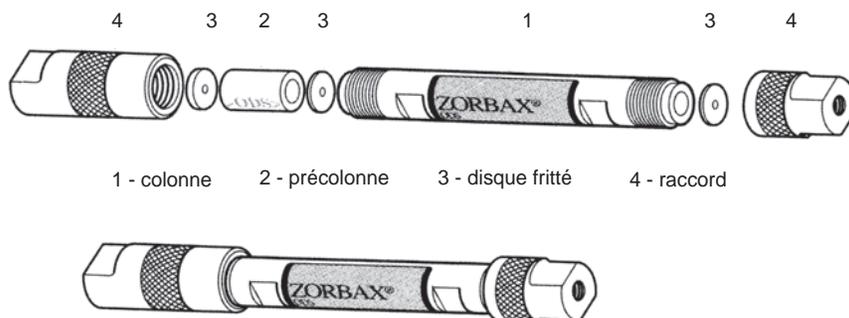
a) Remplissage de la boucle. Dans cette étape, la seringue est introduite à la position n° 4 ; b) injection dans la colonne (noter la nouvelle position de la manette). Vanne modèle 7125. Les vannes sont motorisables (reproduit avec l'autorisation de la société Rheodyne Inc.)

## 2.5 COLONNES

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Les colonnes « standard » dont le diamètre interne (DI) est d'environ 4,5 mm et la longueur de 10 cm (fig. 2.6), sont de plus en plus supplantées par des colonnes de plus faibles diamètres, baptisées *narrow-bore* (DI 2-4 mm), *micro-bore* (DI 1-2 mm), *capillaires remplies* (DI 0,1-1 mm). Ces modèles sont apparus suite à l'évolution des phases stationnaires customisées et pour simplifier les problèmes de couplage avec la spectrométrie de masse (technique couplée CLHP/SM, cf. chapitre 16).

■ Toute application en chromatographie correspond avant tout à une séparation. La colonne doit donc avoir une efficacité suffisante, sans pour autant qu'il soit utile d'avoir des performances plus que nécessaires. Une colonne courte permettra d'aller plus vite. Une colonne étroite se traduira par une économie de phase mobile. Ainsi pour une colonne standard, le débit est de l'ordre de 1 mL/min, alors qu'il tombe à quelques  $\mu\text{L}/\text{min}$  pour une colonne micro-bore, ce qui nécessite des pompes et des détecteurs adaptés – quelques gouttes suffisant pour éluer tous les composés.

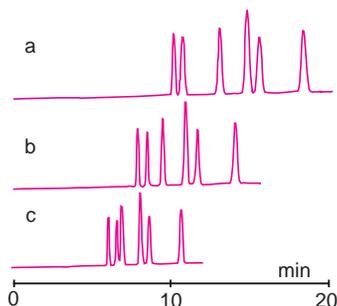
La colonne est souvent précédée d'une précolonne, dite *colonne de garde*, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés (fig. 2.6). On augmente ainsi la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances.



**Figure 2.6** Colonne standard et précolonne de CLHP.

Aspects extérieurs éclatés et assemblés d'une colonne ZORBAX<sup>®</sup>. La phase stationnaire est maintenue par deux disques poreux situés à ses extrémités. La surface interne du tube est rendue inerte par un traitement de passivation, ou par un chemisage de verre ou de polymère PEEK<sup>®</sup>). La précolonne, périodiquement changée, évite le colmatage de la colonne. Il n'empêche qu'il est conseillé de faire passer les échantillons avant analyse à travers un filtre de porosité inférieure à 0,5  $\mu\text{m}$  (reproduit avec l'autorisation de la société RTI).

- Les écarts de température modifiant les temps de rétention, les appareils actuels permettent de thermostatier la colonne et l'éluant, à la fois pour assurer la répétitivité des analyses et pour faire intervenir éventuellement la température comme paramètre de séparation (fig. 2.7).



**Figure 2.7** Effet de la température de la colonne sur une séparation.

Exemple relatif à trois essais effectués sur un même mélange et avec un même débit de phase mobile à des températures différentes (a) 25 °C, (b) 35 °C et (c) 45 °C.

## 2.6 PHASES STATIONNAIRES

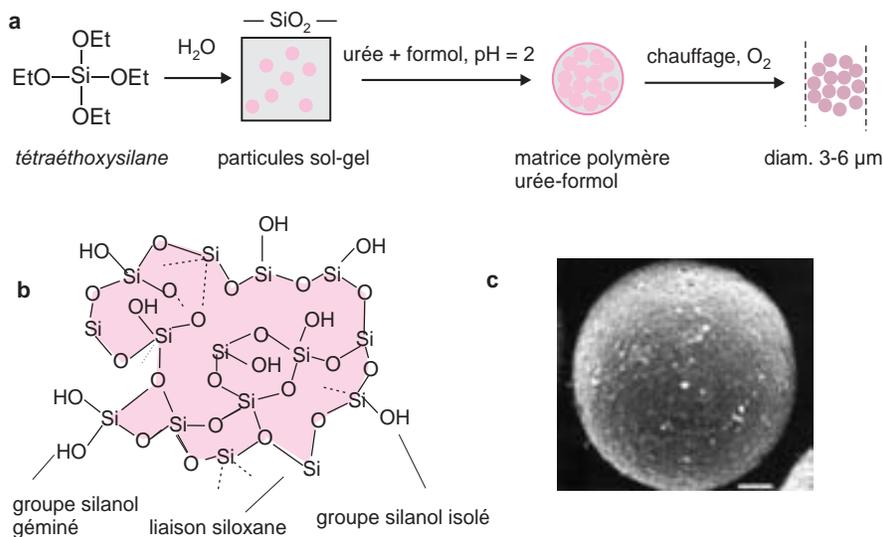
La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par voie de conséquence d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées. Pour raccourcir les temps d'analyse, il faut tenter d'accélérer dans la colonne les transferts entre les phases mobile et fixe.

### 2.6.1 Le gel de silice, matière de base des phases actuelles

Parmi tous les matériaux qui ont été ou sont actuellement utilisés pour la confection des phases stationnaires, le *gel de silice* tient une place prépondérante.

Ce matériau de base est un solide amorphe ayant pour formule de composition  $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$  (avec  $n$  très proche de 0). Il est tout à fait différent de la silice naturelle cristalline ( $\text{SiO}_2$ ) qui n'est qu'un précurseur très éloigné de sa préparation. Cette dernière fait appel à des procédés de polymérisation *sol-gel* d'un tétraalcoxysilane (ex. tétraéthoxysilane) au sein d'un liquide, sous l'effet d'une hydrolyse catalysée (fig. 2.8).

Le gel de silice n'a pas la structure ordonnée de la silice cristalline, mais il reste néanmoins bâti autour de l'agencement tétraédrique des quatre liaisons issues de l'atome de silicium. C'est un polymère inorganique réticulé. Il comporte des *groupements silanols*,  $\text{Si-OH}$  en nombre variable, qui ont résisté à la phase finale de déshydratation thermique. Ces groupements sont responsables des propriétés catalytiques acides de ce matériau très polaire car  $\text{Si-OH}$  a un pK de 10, comparable à celui du phénol. Leur concentration peut être établie par RMN du  $^{29}\text{Si}$  ou par analyse centésimale du carbone pour les phases greffées (cf. plus loin).

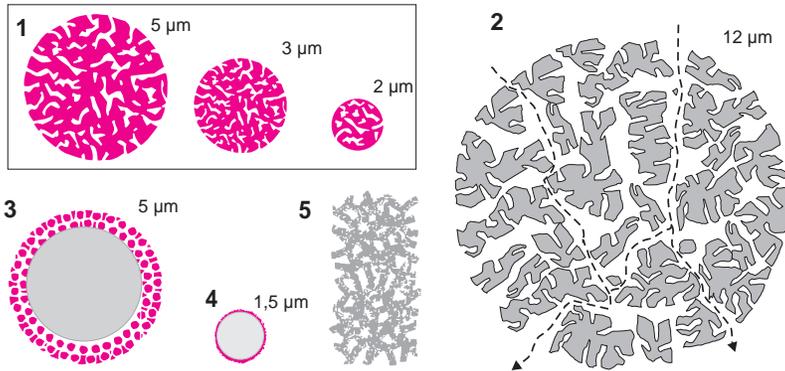


**Figure 2.8** Le gel de silice pour chromatographie.

a) préparation de grains sphériques de gel de silice via un sol-gel. La dispersion, appelée sol, constituée de particules sphériques de quelques nm de diamètre, s'agglutine en présence d'un liant organique urée/formol jusqu'à atteindre la taille voulue (3-7  $\mu\text{m}$ ). Le traitement final consiste en une pyrolyse pour éliminer la matrice organique. b) représentation du réseau, correspondant à un maillage tridimensionnel, d'un gel de silice porteur de groupements silanols. c) image d'une particule sphérique de gel de silice issu d'un assemblage compact de sphères submicroniques.

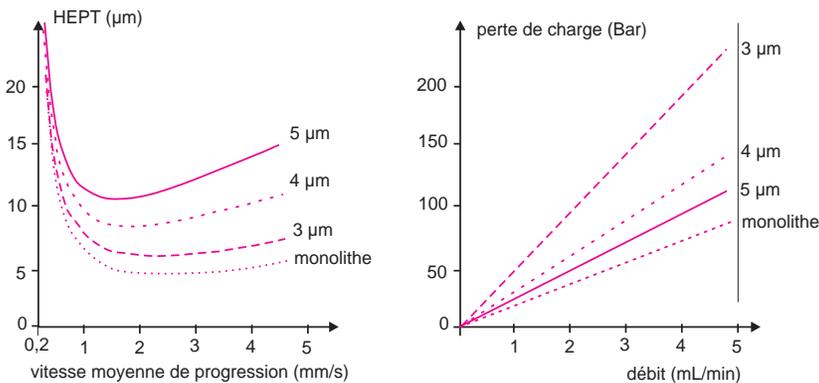
Le gel de silice comporte des pores de tailles différentes. Pour remplir la colonne d'une manière homogène, il est préparé sous forme, soit de microparticules sphériques, soit d'un monolithe poreux (fig. 2.9 et 2.11). Il est nécessaire en effet d'éviter la formation de chemins préférentiels pour la phase mobile et par suite pour les composés qui y sont dissous.

- Les micro-sphères ont un diamètre constant dans une même colonne mais il en existe plusieurs types allant de 1 à 12  $\mu\text{m}$ .
- Les monolithes, apparus plus récemment, sont ainsi nommés parce qu'il s'agit d'un gel de silice formé d'une seule pièce dans la colonne même. La reproductibilité des caractéristiques de ce second type de colonne est plus difficile à maîtriser.



**Figure 2.9** Représentations imagées de quelques types de gels de silice (porosité et dimensions).  
 1- structure comportant des pores de diffusion répartis dans la totalité de la particule. 2- structure comportant des fissures de perfusion pour accélérer le processus de transfert. 3 et 4- Particules poreuses en surface avec un noyau non poreux. 5- détail de structure d'un remplissage du type monolithique.

■ L'emploi de particules de très faible diamètre ( $< 2 \mu\text{m}$ ) augmente la surface de contact et diminue l'HEPT, mais produit une perte de charge beaucoup plus importante que pour les plus grosses particules. On est donc amené à réduire la longueur de la colonne, ce qui va à l'encontre des performances. On gagne cependant en temps d'analyse. Les phases monolithiques offrent une alternative intéressante à la fois parce que la perte de charge est beaucoup plus faible et que les performances ne sont pas altérées par des débits élevés (fig. 2.10).

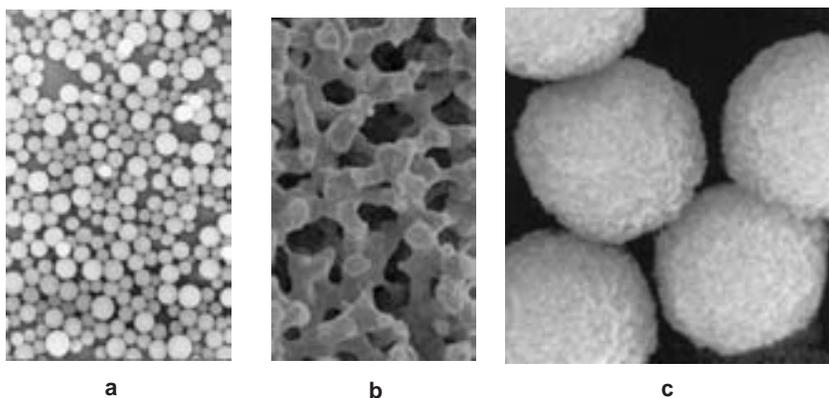


**Figure 2.10** Nature de la phase stationnaire et efficacité.

L'HEPT décroît avec la taille des particules, mais à débit identique la perte de charge augmente. Les colonnes monolithiques améliorant les transferts de masse entre les phases, apparaissent supérieures. Essais réalisés avec des colonnes de 5 cm remplies d'une phase stationnaire RP-18 de même fabrication et en prenant le naphthalène comme composé test

Les propriétés des gels de silice dépendent de nombreux paramètres : *structure interne*, *porosité ouverte* (dimension et répartition des pores), *surface spécifique*, *résistance à l'écrasement* et *polarité*. Les gels de silice courants comportent environ 5 groupes silanols par  $\mu\text{m}^2$ . La surface spécifique est de l'ordre de  $350 \text{ m}^2/\text{g}$  avec des pores de 10 nm. Pour les particules sphériques, la porosité mesurée par le volume de phase mobile dans la colonne varie de 30 à 70 % du volume total de la colonne. Pour les colonnes monolithiques elle atteint 90 %, ce qui conduit à une perte de charge plus faible et autorise donc des débits plus importants (fig. 2.10). On est bien loin des phases utilisées au début du siècle par Tswett, constituées de craie ou de sucre en poudre. Le traitement subi par la silice en fait plutôt une sorte de « sable magique ».

■ La préparation du gel de silice sous forme de grains irréguliers, utilisé en chromatographie préparative, fait appel à un procédé hydrothermal : on forme d'abord l'acide orthosilicique, composé instable,  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$  par acidification du silicate de sodium  $[\text{Na}_2\text{SiO}_3]$  encore appelé « liqueur de cailloux », ou water-glass, lui-même issu de certains sables très purs par fusion alcaline.  $\underline{1}$  donne d'abord un dimère  $\underline{2}$  qui continue à se polycondenser progressivement en particules colloïdales à surface hydroxylée. On obtient par agrégation un hydrogel de silice gélatineux dont la calcination conduit à des grains de gel de silice dense (xerogel).



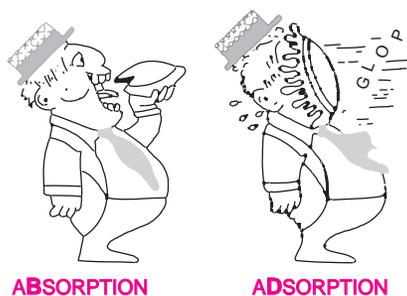
**Figure 2.11** Le gel de silice pour chromatographie.

a) microsphères de taille homogène ; b) structure macroporeuse d'une colonne monolithique ; c) particules de silice à noyau dur et poreuse en surface.

■ Le mécanisme d'action du gel de silice repose sur l'adsorption (fig. 2.12), phénomène qui consiste en l'accumulation d'un composé à l'interface entre deux phases. Dans les cas les plus simples, il y a formation d'une monocouche (isotherme de Langmuir), mais souvent il se crée aussi une attraction entre les molécules déjà adsorbées et celles qui sont restées en solution. C'est la raison principale de la non-symétrie des pics d'élution. D'autres théories expliquent le phénomène de séparation des constituants par un simple ralentissement (sans immobilisation) au niveau de l'interface PM/PS qui diffère pour chaque analyte.

### 2.6.2 Les silices greffées

Bien qu'ayant une capacité d'adsorption élevée, le gel de silice décrit précédemment n'est plus utilisé tel quel en chromatographie analytique. Hydrophile par nature, ses caractéristiques évoluent au cours du temps, entraînant un manque de reproductibilité des séparations.



**Figure 2.12** Phénomènes d'adsorption et de partage.

L'adsorption est un phénomène d'interface à la différence de l'absorption (reproduit avec l'autorisation de M. Laguës, *L'Actualité Chimique* 1990, (1) p.17.

Pour diminuer sa polarité jugée excessive dans de nombreux cas on le rend essentiellement hydrophobe.

Les modifications classiques mettent à profit la réactivité des fonctions silanols présentes en surface pour fixer des molécules organiques par des liaisons covalentes. Le gel de silice ainsi modifié devient assimilable à un liquide immobilisé, la séparation mettant en jeu les *coefficients de partage* et non plus les *coefficients d'adsorption*. Ces phases greffées, dont la polarité peut être ajustée avec précision, sont à l'origine de la *chromatographie de partage à polarité de phase inversée*, utilisée dans quasiment toutes les séparations.

Ces modifications de la surface du gel conduisent à deux types de phases.

**Phases monomériques (10–15  $\mu\text{m}$  d'épaisseur).** Elles sont obtenues en faisant réagir un monochlorosilane en présence d'une base sur les fonctions silanols de surface (fig. 2.13). On prépare ainsi les phases classiques RP-8 (groupement diméthyl-octylsilane) et RP-18 (groupement diméthyl-octadécylsilane, ou ODS). Une fraction des groupements Si-OH demeure cependant intacte. Elle peut être la cause d'interactions polaires gênantes. D'autres réactifs silylés tels le chlorotriméthylsilane ( $\text{ClSiMe}_3$ ) ou l'hexaméthyl-disilazane ( $\text{Me}_3\text{SiNHSiMe}_3$ ), conduisent à une réaction plus complète. Les quelques sites restants non transformés, car inaccessibles au réactif, le sont également aux analytes.

**Phases polymériques (25  $\mu\text{m}$  ou plus en épaisseur).** On utilise cette fois un di- ou trichlorosilane en présence de vapeur d'eau qui provoque une polymérisation en solution du réactif avant dépôt et greffage sur la silice. On obtient ainsi une couche polymérique réticulée.

L'architecture finale du revêtement est difficile à se représenter. Mono- ou multicouche, sa représentation à l'échelle moléculaire relève plutôt de la spéculation.

### 2.6.3 Autres phases à polarités variées

Les gels de silice précédents, comportant des greffons alkyles à 8 ou 18 atomes de carbone, sont polyvalents et par conséquent très utilisés (65 % des applications), mais pour améliorer la séparation de certaines classes de composés, il est fait appel à des phases stationnaires spécifiques. Sur une âme de silice, sont fixés des ligands porteurs de fonctions (groupements aminopropyle, cyanopropyle, benzyle) ou des greffons dipolaires (zwitterions) pour conférer une polarité intermédiaire à la phase stationnaire. La séparation des mélanges comportant à la fois des constituants polaires et non polaires, qui exigent des phases mobiles riches

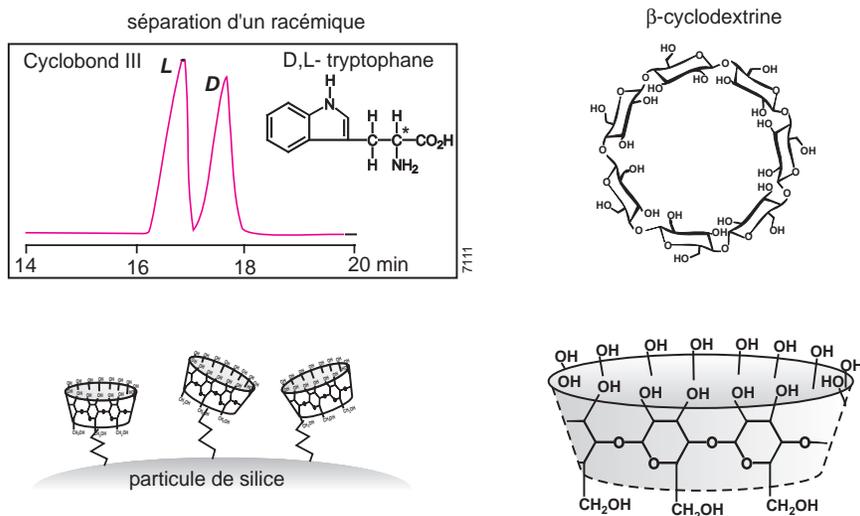


notées ici R (composé)/R(phase stat.) et S (composé)/R (phase stat.) dont les stabilités sont légèrement différentes. Les aires sont proportionnelles à l'abondance de chacune des deux formes R et S.

Actuellement on utilise principalement des résines optiquement actives ou des gels de silice greffés avec des cyclodextrines (enchaînements cycliques de 5 à 7 molécules de glucose) par l'intermédiaire d'un « bras » ayant plusieurs atomes de carbone (fig. 2.14). Ces molécules de forme cylindrique présentent une cavité hydrophobe tandis que la paroi externe est hydrophile. Ces phases ont la particularité de permettre l'inclusion sélective d'une grande variété de composés qui conduisent en surface à des complexes diastéréoisomères réversibles.

On appelle **pureté optique** de l'analyte, son excès énantiérique (e.e), calculé à partir de la relation suivante où  $S_R$  et  $S_S$  désignent les aires des pics des deux énantiomères :

$$\text{Pureté optique (e.e. \%)} = 100 \frac{|S_R - S_S|}{S_R + S_S}$$



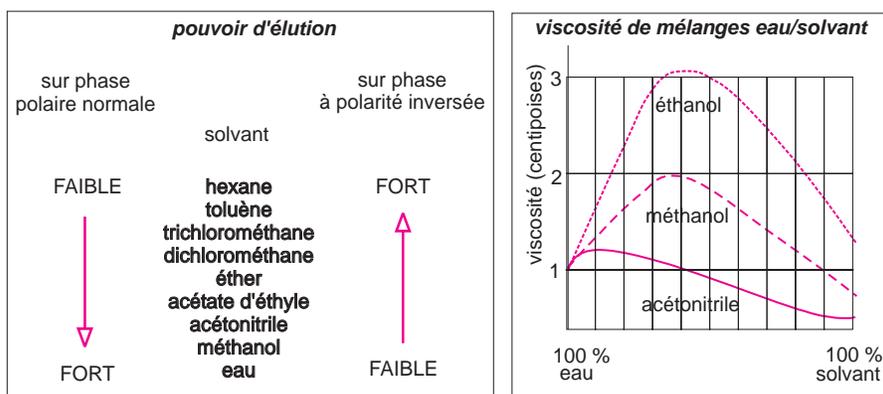
**Figure 2.14** Séparation d'un racémate sur phase stationnaire chirale.

Chromatogramme d'un composé à l'état de mélange 50/50 des deux formes R et S (adapté d'un document Alltech); formule développée de la β-cyclodextrine et aspect dans l'espace (diamètre 1,5 nm, trou 0,8 nm, hauteur 0,8 nm); représentation partielle d'une sphère de gel de silice greffée avec une cyclodextrine par l'intermédiaire d'un bras extenseur.

## 2.8 PHASES MOBILES

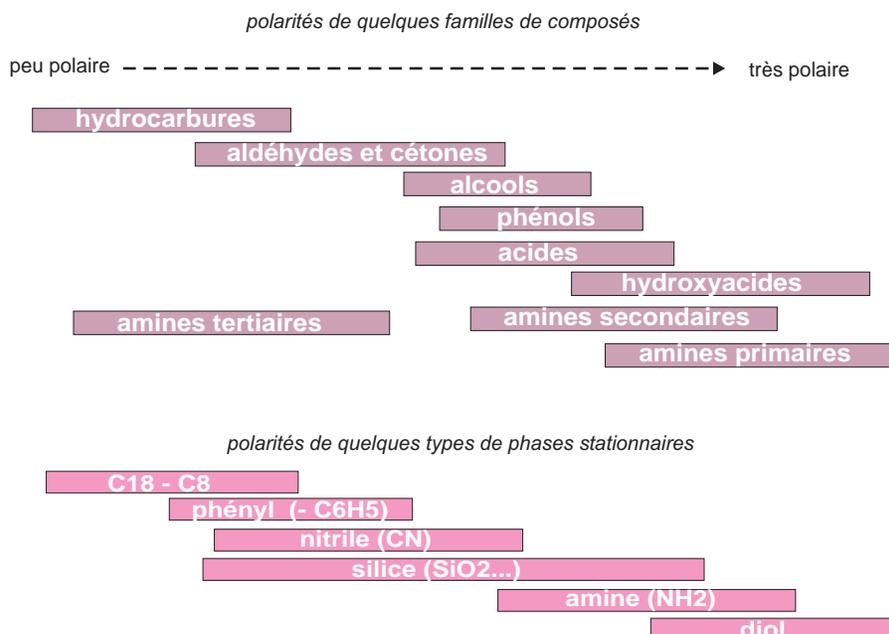
Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire et vice-versa. La chromatographie est dite *en phase normale* dans le premier cas et à *polarité de phase inversée* (« R – HPLC »). dans le second.

Sachant que la plupart des applications actuelles font appel à des gels de silice transformés, peu polaires, de nature plutôt hydrophobe, on choisit comme phases mobiles des mélanges d'eau et d'un modifiant tel le méthanol ou l'acétonitrile. En changeant la composition de la phase mobile, donc sa polarité, on agit par l'intermédiaire des coefficients de distribution  $K$  ( $C_S/C_M$ ) sur les facteurs de rétention  $k$  des composés (fig. 2.15). La difficulté pour le chromatographe est de faire le bon choix en fonction des composés à séparer (fig. 2.16).



**Figure 2.15** « Force » des solvants utilisés comme phases mobiles.

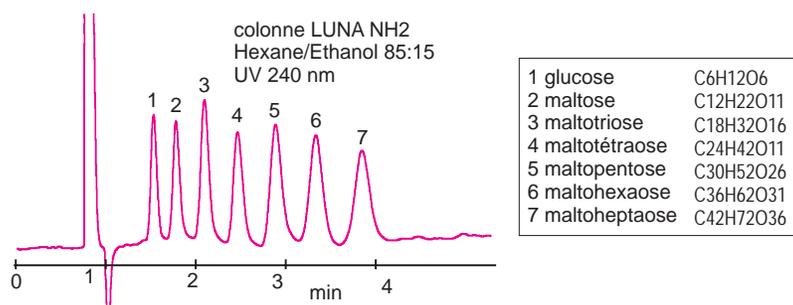
On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile. On notera que la viscosité, donc la pression en tête de colonne varie selon la composition de la phase mobile.



**Figure 2.16** Polarités de quelques familles de composés organiques ainsi que des principaux types de greffons des phases stationnaires actuelles.

Avec une phase stationnaire dont la partie active ressemble à une couche paraffinique, l'ordre d'éluion est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. En revanche, les composés polaires sont assez difficiles à séparer entre eux. Il faut réaliser des gradients d'éluion en diminuant progressivement au cours du temps la concentration en eau (polaire) au profit du modifiant choisi (moins polaire). On commencera par exemple avec un mélange 80/20 % eau/acétonitrile pour terminer à la composition de 40/60 %. C'est le domaine de la chromatographie d'interaction hydrophile.

- On reconnaît quatre types d'interactions entre les molécules de solvant et de soluté :
  - ionique quand soluté et solvant ont tous deux des moments dipolaires ;
  - de dispersion due à l'attraction entre elles des molécules voisines ;
  - diélectriques, qui favorisent la dissolution des solutés ioniques dans les solvants polaires ;
  - par liaisons hydrogène, quand sont réunis un soluté et un solvant dont l'un est donneur et l'autre accepteur de protons.



**Figure 2.17** Séparation de sucres sur une phase « amine ».

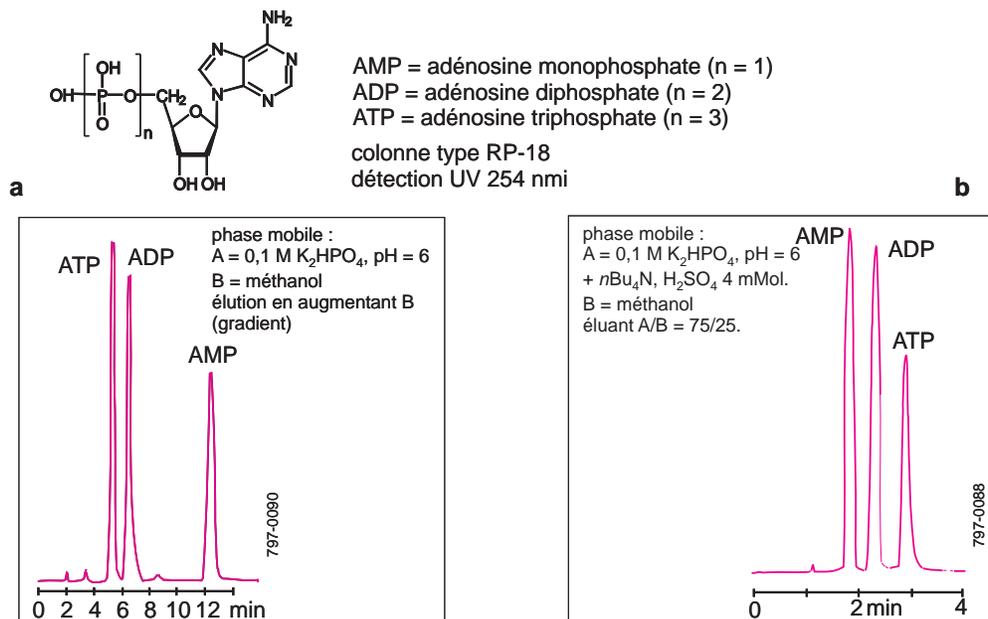
L'ordre d'éluion des 7 sucres homologues nous indique que la phase stationnaire est polaire et que le pouvoir d'éluion de la phase mobile diminue d'autant plus que la masse moléculaire est plus grande.

- La séparation des composés très polaires sur les phases stationnaires de type RP-18 impose l'usage d'une phase mobile très riche en eau. Dans ces conditions, il arrive que la phase stationnaire, qui est hydrophobe, devienne subitement non mouillable. La séparation devient mauvaise. C'est pourquoi on choisit de préférence des phases présentant une polarité résiduelle pour maintenir l'interaction entre les analytes et l'eau de la phase mobile (fig. 2.17).

## 2.9 CHROMATOGRAPHIE D'APPARIEMENT D'IONS

La chromatographie par appariement d'ions (PIC, *paired ion chromatography*) permet d'améliorer la séparation des composés ioniques ou très polaires quand on décide d'utiliser une colonne apolaire sur laquelle ces composés ont trop peu d'affinité (fig. 2.18). Pour augmenter leur temps de rétention, on doit diminuer leur caractère ionique. Il suffit, pour certains, de modifier le pH, mais pour d'autres, on ajoute à la phase mobile un composé porteur à la fois d'une chaîne carbonée (peu polaire) et d'un groupement de charge opposée

à celle du composé à séparer (alkylammonium ou alkylsulfonate). Ceci conduit à des d'ions globalement neutres, assez stables. De la sorte, il devient possible de séparer des cations et des anions inorganiques avec une colonne remplie de polarité inversée.

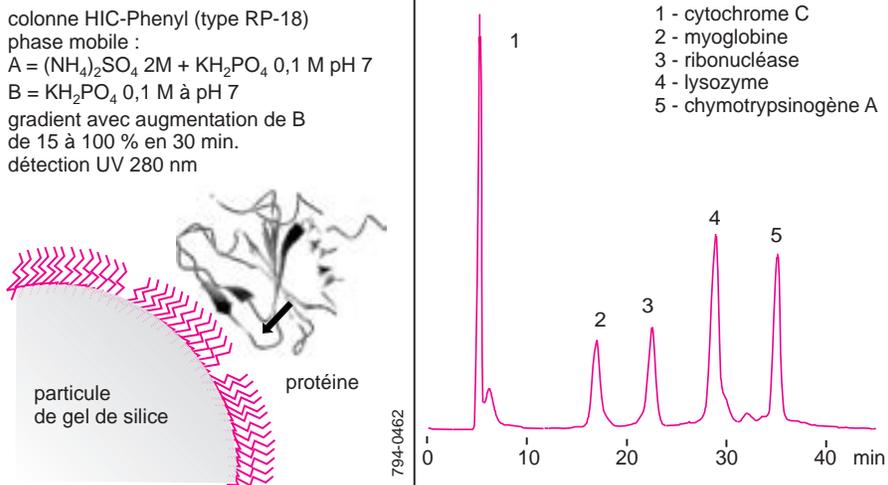


**Figure 2.18** Effet de l'appariement d'ions sur une séparation avec une colonne à polarité inversée. Le chromatogramme d'un mélange de 3 nucléotides montre en a la situation normale avec une élution dans l'ordre des polarités décroissantes; en b, par contre, situation inversée : l'ATP associé à l'ion tétrabutylammonium est devenu plus lipophile, et est donc plus longtemps retenu (adapté d'un document Alltech).

## 2.10 CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTION HYDROPHOBE

La chromatographie à interaction hydrophobe (HIC, *hydrophobic interaction chromatography*) permet d'améliorer la séparation des composés bioorganiques tels les protéines solubles dans l'eau. On choisit une colonne apolaire et on commence l'élution avec une phase mobile fortement saline (sulfate d'ammonium 2 M et phosphate monosodique 0,1 M, à pH 7). Dans ces conditions les protéines se fixent par leurs domaines hydrophobes sur la PS. Ensuite on diminue progressivement la concentration saline afin que les protéines repassent dans la phase mobile (fig. 2.19). Ainsi elles sont éluées dans l'ordre décroissant de leur caractère hydrophile.

- Cette opération rappelle une technique expérimentale connue en chimie organique : quand, dans une ampoule à décanter, on veut extraire avec de l'éther un composé organique au sein d'une phase aqueuse, on ajoute de la saumure pour faire reculer la solubilité du composé organique dans l'eau donc faciliter son extraction par l'éther.



**Figure 2.19** Séparation améliorée sur le principe de l'interaction hydrophobe. Chromatogramme d'un mélange de protéines de moins en moins hydrophiles, obtenu en diminuant au cours du temps la concentration saline (reproduit avec l'autorisation de la société Supelco).

## 2.11 PRINCIPAUX DÉTECTEURS

L'analyse par chromatographie a rarement pour but de déterminer la composition totale de l'échantillon, mais plutôt de repérer la présence ou doser un composé présent, pour lequel on a choisi un détecteur bien adapté. Le détecteur universel n'est donc pas indispensable. Dans certains cas, il peut même être un handicap pour la lisibilité du chromatogramme. Plus nettement encore qu'en CPG, les aires relatives des pics d'un chromatogramme n'ont souvent aucun rapport avec la composition molaire ou massique du mélange analysé.

Cependant quel qu'il soit, le détecteur doit réunir un certain nombre de qualités : donner pour chaque composé détecté une réponse proportionnelle à sa concentration instantanée, être sensible et avoir peu de bruit de fond, être stable dans le temps.

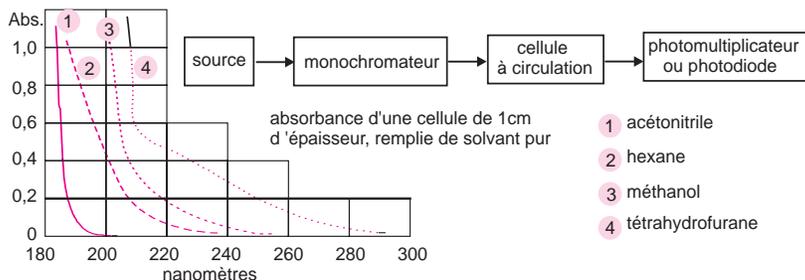
Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés : absorption, fluorescence et indice de réfraction.

### 2.11.1 Détecteurs spectrophotométriques

La détection est basée sur la loi de Lambert-Beer ( $A = \varepsilon_\lambda lc$ ) : l'absorbance  $A$  de la phase mobile est mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde  $\lambda$  ou plusieurs longueurs d'onde dans l'UV ou le visible (cf. chapitre 9). La phase mobile ne doit pas, ou très peu, absorber par elle-même (fig. 2.20). L'intensité de l'absorption dépend du coefficient d'absorption molaire  $\varepsilon_\lambda$ , ce qui rend impossible, par la simple observation d'un chromatogramme, de se faire une idée de la concentration des espèces repérées, même de manière très approximative.

La détection UV correspond donc à une détection sélective. Pour les composés qui n'ont pas de spectre d'absorption exploitable, on fait appel à la « dérivation » post-colonne des analytes.

**Détection monochromatique.** Le modèle de base se compose d'une source au deutérium ou à vapeur de mercure, d'un monochromateur pour isoler une bande passante étroite (10 nm) ou une raie (ex. la raie 254 nm du Hg), d'une cellule à circulation d'un volume de quelques  $\mu\text{L}$  (trajet optique de 0,1 à 1 cm) et d'un moyen de détection optique.

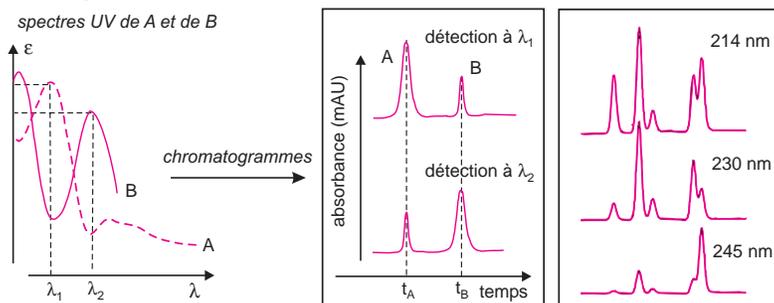


**Figure 2.20** Détection photométrique.

Principe d'un détecteur photométrique à une seule longueur d'onde et spectres d'absorption de quelques solvants utilisés en chromatographie liquide. On considère que la limite de transparence d'un solvant correspond à une absorbance de 0,2 pour 1 cm d'épaisseur traversée.

■ L'essor actuel des biotechnologies, comme de la biochimie, a accru la demande d'analyse des acides aminés (hydrolysats de protéines) ; on peut utiliser les détecteurs photométriques à condition de réaliser avant passage dans la cellule de mesure une réaction post-colonne avec la ninhydrine par exemple (cf. chapitre 8).

**Détection polychromatique.** Les détecteurs plus perfectionnés permettent soit d'enregistrer l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde quasi-simultanément, soit de capter en une fraction de seconde tout un domaine de longueurs d'onde sans interrompre la circulation dans la colonne (fig. 2.21 à 2.23).

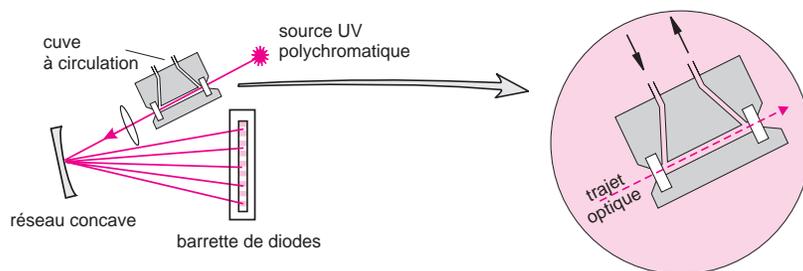


**Figure 2.21** Chromatographie d'un échantillon contenant 2 composés A et B, dont les spectres UV sont différents.

Selon le choix de la longueur d'onde de détection, le chromatogramme n'aura pas le même aspect. Les chromatogrammes (à droite) d'un mélange de quelques pesticides enregistrés à trois longueurs d'onde différentes illustrent ce phénomène. En analyse quantitative, on doit donc déterminer d'abord les facteurs de réponse du détecteur pour tous les composés analysés (cf. analyse quantitative, Chap. 1).

Le détecteur à barrette de diodes permet non seulement d'obtenir un chromatogramme, mais il fournit des renseignements spectraux pouvant servir à s'assurer de l'identité des composés séparés (fig. 2.22). C'est ce qu'on nomme *l'analyse de certitude* (cf. ch. 9).

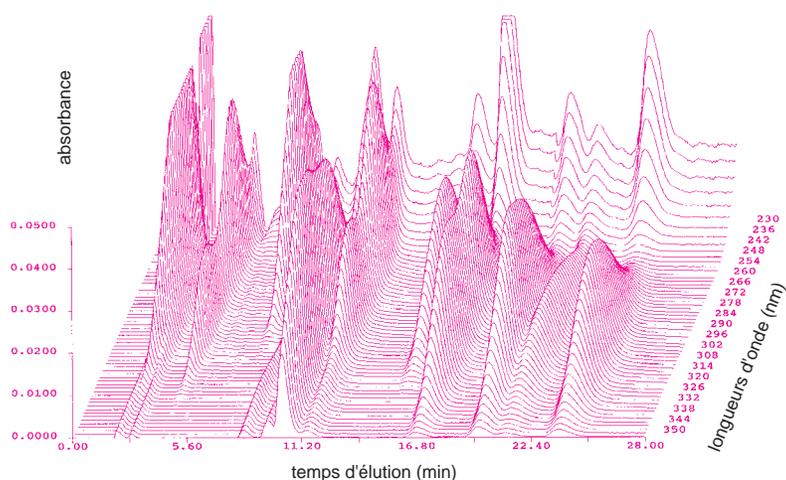
Les détecteurs spectrophotométriques peuvent être utilisés en mode gradient d'élution.



**Figure 2.22** Principe du détecteur à barrette de diodes.

La cellule de mesure est éclairée par une source polychromatique dans le proche UV/Vis. La lumière transmise par l'échantillon est dispersée par un réseau à réflexion sur un détecteur constitué par une rangée de diodes (plusieurs centaines), chacune permettant de connaître l'absorbance moyenne sur un intervalle très étroit de longueur d'onde (ex. 1 nm).

■ Les spectres successifs des composés élués par la phase mobile, captés en sortie de colonne, sont tout d'abord mis en mémoire par l'instrument au fur et à mesure de l'élution, pour être traités ultérieurement par un logiciel adapté. On obtient des spectrochromatogrammes souvent spectaculaires (fig. 2.23). Cette acquisition d'un grand nombre de spectres pour une seule analyse accroît les potentialités de ces détecteurs qui se prêtent à de multiples usages, telle la représentation topographique de la séparation effectuée,  $A = f(\lambda, t)$  (diagrammes d'isoabsorption).



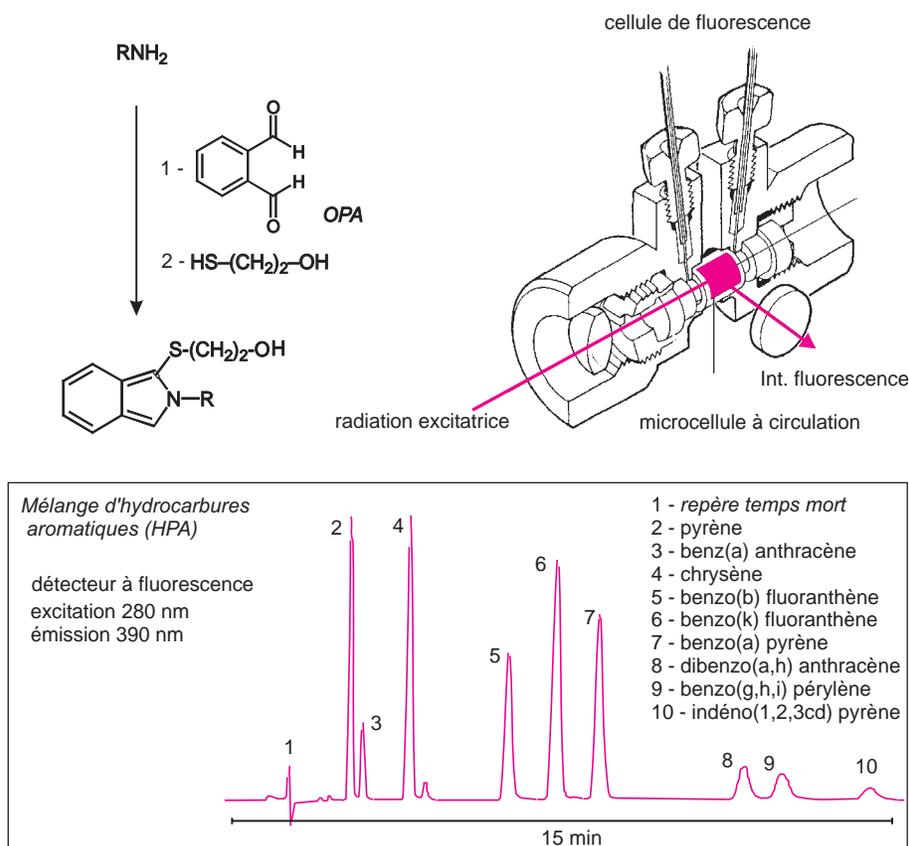
**Figure 2.23** – Représentation sous forme tridimensionnel,  $A = f(t, \lambda)$ , d'une séparation chromatographique obtenue par une méthode d'enregistrement rapide (reproduit avec l'autorisation de la société TSP instruments).

### 2.11.2 Détecteur spectrofluorimétrique

Les composés fluorescents réémettent sous forme de radiations lumineuses une fraction plus ou moins grande du rayonnement de la source auquel ils sont soumis (cf. ch. 11).

L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration de la substance à condition que celle-ci reste faible. Les détecteurs de fluorescence (fig. 2.24) à la fois sensibles et sélectifs sont utilisables pour les composés naturellement fluorescents et pour tous ceux qui peuvent le devenir par traitement préalable à la détection. Dans ce dernier cas on fait appel aux procédés de dérivation pré- ou post-colonne : un automate placé soit avant la colonne soit entre la colonne et le détecteur effectue une ou plusieurs réactions sur les composés afin de les rendre fluorescents.

- En suivant ce principe, on dose les traces de carbamates (pesticides) dans l'environnement, par saponification avec de la soude puis réaction sur l'aldéhyde o-phthalique, pour transformer la méthylamine en un dérivé fluorescent (fig. 2.24).

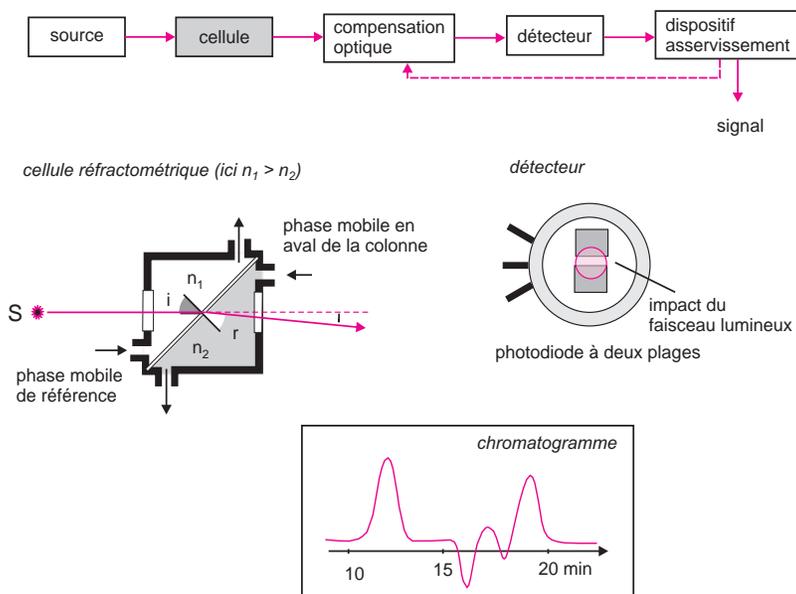


**Figure 2.24** Détection fluorimétrique.

Exemple de réactifs utilisés pour rendre fluorescents les amines primaires par action de l'OPA en présence de monothioglycol. Détail d'une cellule à circulation pour détecter la fluorescence. Dans la pratique, la fluorescence est observée dans une direction perpendiculaire à la direction de l'excitation (reproduit avec l'autorisation de la société Hewlett-Packard). Chromatogramme d'un mélange de quelques hydrocarbures polynucéaires aromatiques (HPA). L'intensité de fluorescence varie énormément d'un composé à un autre, à la fois parce que la longueur d'onde d'excitation devrait être ajustée pour chaque composé et que l'intensité de fluorescence varie également. Il existe des détecteurs programmables pour obtenir une réponse optimale.

### 2.11.3 Détecteur réfractométrique

Ce type de détecteur comporte un réfractomètre différentiel qui a pour objet de mesurer en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne. Pour cela un faisceau lumineux (mono- ou polychromatique) passe à travers une cellule comportant deux compartiments dont l'un est rempli avec la phase mobile seule et l'autre avec l'effluent en sortie de colonne (fig. 2.25). La différence d'indice entre les deux liquides, qui apparaît lorsqu'un composé est mélangé à l'éluant, se traduit par un déplacement angulaire du rayon réfracté. Dans la pratique, le signal correspond à la mesure en continu de la rétroaction qu'il faut fournir à un élément optique pour compenser la déviation du faisceau réfléchi.



**Figure 2.25** Un détecteur réfractométrique différentiel à déviation.  
Trajet optique au niveau de la cellule.

Le principe repose sur les lois de Fresnel de transmission de la lumière dans les milieux transparents dont l'indice de réfraction est  $n$ . Le contrôle de la position du faisceau réfracté est obtenu avec une photocellule à deux plages sensibles, dont on maintient les réponses égales par un coin optique (non représenté). Aspect d'un chromatogramme d'un mélange de sucres obtenu avec ce type de détecteur.

Ce détecteur considéré comme quasi universel présente l'inconvénient d'être beaucoup moins sensible que le détecteur UV, et d'être trop sensible aux variations de température. Il faut que sa température soit parfaitement régulée (à 0,001 °C) et que la colonne soit thermostatée. Il conduit à des pics négatifs ou positifs, ce qui impose un réglage de la ligne de base à mi-hauteur du graphe. Il ne peut être utilisé qu'en mode isocratique. En effet, en gradient d'éluant, la composition de la phase mobile évolue au cours du temps ainsi que son indice, d'où une dérive de la ligne de base. La compensation, facilement obtenue dans le cas d'un éluant de composition fixe, n'est plus réalisable quand la composition de l'éluant en tête de colonne diffère de celle qui en sort. Il n'est donc utilisé que pour les composés qui n'absorbent pas dans l'UV-Visible ou en série avec d'autres détecteurs.

### 2.11.4 Autres détecteurs

L'identification d'un composé d'après son seul temps de rétention est quelquefois aléatoire. Elle exige qu'on en dispose à l'état authentique pour pouvoir faire une injection témoin.

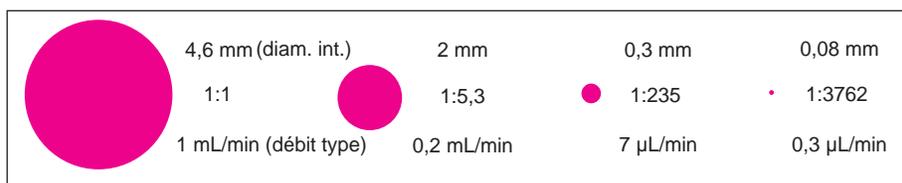
Des détecteurs plus perfectionnés, donnant des informations complémentaires sur les produits élués de la colonne, peuvent être installés en sortie de colonne.

On aboutit, quand le détecteur constitue à lui seul une seconde méthode d'analyse, à des identifications bidimensionnelles plus sûres. Dans ce domaine on trouve divers types de spectrophotomètres à qui on fait jouer à la fois le rôle de détecteurs classiques (obtention du chromatogramme) et d'outils d'identification des espèces séparées (*cf.* §16.5). Le couplage avec la spectrométrie de masse (CLHP/SM), est très utile pour identifier les mélanges de composés connus quand on dispose d'une spectrothèque adaptée. Quant au couplage avec la RMN (CLHP/RMN<sup>1</sup>H), longtemps considéré comme impossible, il facilite grandement l'étude des mélanges comportant des composés inconnus (*cf.* chapitres 15 et 16).

## 2.12 TENDANCES ACTUELLES DE LA CLHP

L'intérêt porté à la technique couplée CLHP/SM a fait progresser la chromatographie liquide dans le sens de la miniaturisation (fig. 2.26). En effet le principal problème rencontré lorsqu'on installe un spectromètre de masse en aval d'un chromatographe liquide est l'élimination de la phase mobile. Pour cela le passage à la *chromatographie liquide capillaire* ou à la *nano-chromatographie*, deux techniques en voie de développement, facilite l'interface entre les deux appareils.

L'adaptation de microcolonnes augmente les performances des séparations, mais en contre-partie le passage de la technique au royaume de Lilliput est exigeant sur le plan de la réalisation. Il faut savoir gérer les microdébits de phase mobile, les volumes morts les plus petits possibles sur tout le parcours, de la chambre de mélange pour gradients jusqu'au volume de la cellule de détection (fig. 2.27). On doit utiliser des chromatographes spécifiques encore peu nombreux ou adapter les appareils conventionnels, mais la reproductibilité des gradients est difficile à ce niveau. Les microfuites des pompes deviennent de l'ordre de grandeur des débits à réaliser.

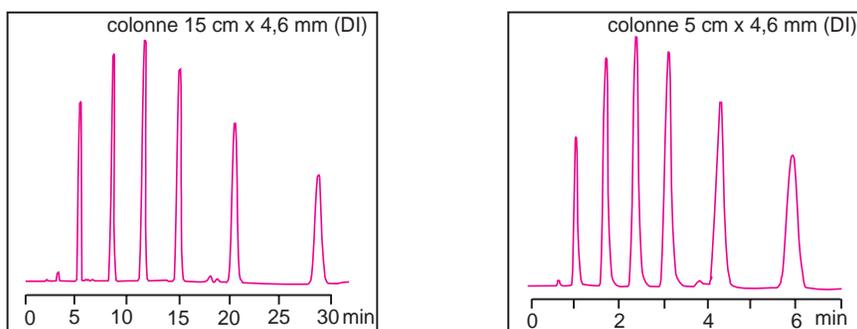


**Figure 2.26** Comparaison des débits dans des colonnes de diamètres différents.

En admettant que le remplissage de ces quatre colonnes est de même nature et de même porosité, on voit l'avantage que présente le passage de la CLHP classique (à gauche) à la CLHP-capillaire ou à la nano-CLHP (à droite). Plus le diamètre de la colonne est étroit, plus la consommation de phase mobile diminue.

Outre cette miniaturisation dans l'échelle des quantités séparées, on note encore d'autres axes de progression :

- ▶ *Choix de phases stationnaires adaptées* à des séparations particulières : sucres, HPA, amines, nucléotides...
- ▶ *Diminution des temps d'analyse* tout en maintenant la résolution. Pour cela on tend à utiliser des colonnes courtes et des phases stationnaires formées soit de particules non poreuses de petit diamètre (3  $\mu\text{m}$  ou moins), soit d'un réseau poreux de gel de silice (colonnes monolithiques), autorisant des débits plus rapides. On peut également opérer à des températures plus élevées. Les équilibres de concentration sont plus rapidement atteints et la viscosité de la phase mobile diminue. La pression étant moins élevée, on peut augmenter le débit et ainsi raccourcir le temps d'analyse. Il est nécessaire cependant de disposer d'installations adaptées.



**Figure 2.27** Comparaison de deux chromatogrammes obtenus à partir d'un même mélange. Une colonne plus courte et des particules plus petites permettent un gain de temps appréciable pour des performances comparables.

## QUELQUES SITES SUR INTERNET

[www.hplc.co.uk.com](http://www.hplc.co.uk.com)  
[www.thermo.com/finnigan](http://www.thermo.com/finnigan)  
[www.upchurch.com](http://www.upchurch.com)  
[www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)  
[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

[www.varianinc.com](http://www.varianinc.com)  
[www.dionex.com](http://www.dionex.com)  
[www.lcpackings.com](http://www.lcpackings.com)  
[www.shimadzu.com](http://www.shimadzu.com)  
[www.supelco.com](http://www.supelco.com)

## EXERCICES

*Solutions en fin d'ouvrage*

### Exercice 2.1

Les appareils actuels de CLHP peuvent utiliser des colonnes de 300  $\mu\text{m}$  de diamètre interne ( $d_C$  dans le texte) pour lesquelles le débit optimum conseillé est de  $4 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ .

1. Montrer par un calcul simple que ce débit conduit pratiquement à la même vitesse linéaire de la phase mobile que pour une colonne de même type mais d'un diamètre standard de 4,6 mm pour laquelle le débit conseillé est de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

2. La séparation d'un échantillon comportant 16 HPA (hydrocarbures polyaromatiques) a été effectuée sur une colonne de type RP-18 ( $L_C = 25 \text{ cm}$ ,  $d_C = 300 \mu\text{m}$ ). Le débit de la phase mobile (acétonitrile/eau) est de  $4 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ . L'un de ces HPA a un temps de rétention de 48 min.

Calculer le volume de rétention de ce composé. Que peut-on en conclure ?

3. On dispose de deux colonnes remplies de la même phase stationnaire, l'une a un diamètre intérieur  $d_C$  de 4,6 mm et l'autre, de 300  $\mu\text{m}$ . Les colonnes ont mêmes longueur et taux de remplissage ( $V_S/V_M$ ). On décide de les utiliser successivement avec le même chromatographe et dans conditions identiques, avec les débits conseillés ci-dessus pour chacune d'elles. On injecte la même quantité d'un même composé dans les deux expériences.

a) Quand on passe d'une colonne à l'autre, le volume de rétention (ou d'élution) du composé est-il modifié ?

b) Si la sensibilité du détecteur n'a pas été modifiée entre les deux expériences, l'intensité du pic correspondant sera-t-elle différente ?

### Exercice 2.2

Quel est l'ordre d'élution des acides suivants en CLHP avec une colonne dont la phase stationnaire est de type C18 et une phase mobile un tampon formiate  $C = 200 \text{ mM}$ , de pH 9 ?

1. acide linoléique                       $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$

2. acide arachidique                     $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$

3. acide oléique                          $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$

### Exercice 2.3

Indiquer en regard de chacune de ces techniques chromatographiques, le terme qui représente le mode essentiel de fixation sur la phase.

- |                            |                           |
|----------------------------|---------------------------|
| 1. phase inversée          | a. masse moléculaire      |
| 2. perméation de gel       | b. hydrophilie            |
| 3. chromatographie ionique | c. hydrophobie            |
| 4. phase normale           | d. protonation/ionisation |

---

### Exercice 2.4

On étudie par CLHP la séparation de deux composés A et B avec une colonne de type RP-18. La phase mobile est un mélange binaire d'eau et d'acétonitrile. On admettra qu'il existe une relation linéaire entre le logarithme du facteur de capacité et le pourcentage d'acétonitrile du mélange binaire eau/acétonitrile utilisé. À partir de 2 chromatogrammes obtenus l'un avec pour phase mobile un mélange eau/acétonitrile 70/30v/v et l'autre avec un mélange eau/acétonitrile 30/70v/v, les équations des deux droites sont :

pour le composé A :  $\log k_A = -6,075 \times 10^{-3} (\% \text{ MeCN}) + 1,3283$

pour le composé B :  $\log k_B = -0,0107 (\% \text{ MeCN}) + 1,5235$

- a)** Trouver la composition de la phase binaire qui conduirait à un facteur de sélectivité de 1.
- b)** On suppose que pour chaque composé, la largeur du pic correspondant sur le chromatogramme à mi-hauteur est la même et que l'efficacité de la colonne n'est pas modifiée suivant la composition de la phase mobile. La résolution entre les deux pics est-elle meilleure pour la phase mobile contenant 70 % d'eau ou 30 % d'eau ? Montrer l'intérêt pratique du choix précédent.

## Chapitre 3

---

# Chromatographie en phase gazeuse

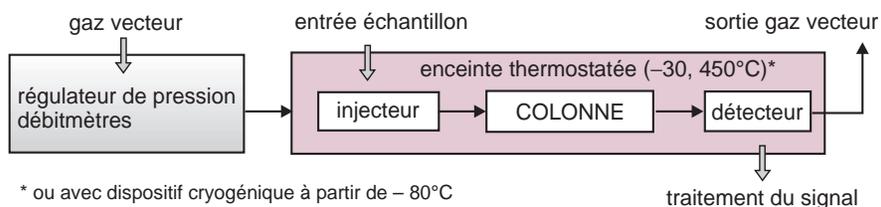
*La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles de plus de 60 ans. Son développement qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent encore plus son intérêt. La séparation sur la colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. C'est sans doute la principale contrainte à laquelle il faut penser avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et suffisamment volatils. La très grande sensibilité des détecteurs permet de déceler des quantités de l'ordre du picogramme pour certains composés. Les applications sont très nombreuses dans tous les domaines et les développements de la chromatographie gazeuse à grande vitesse ou multidimensionnelle rendent cette technique toujours plus attractive.*

### 3.1 PRINCIPE D'UNE INSTALLATION DE CPG

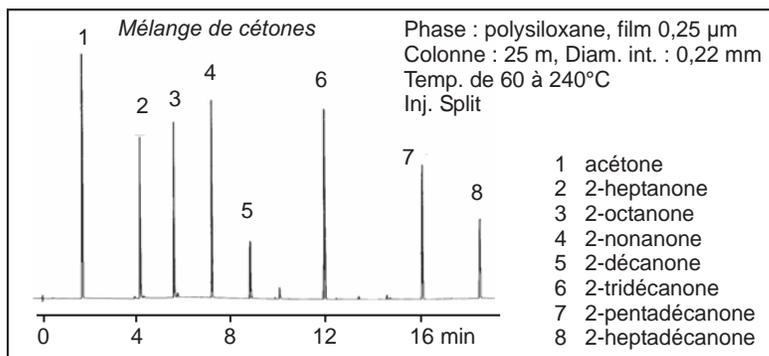
Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée (fig. 3.1). La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé *gaz vecteur*. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande répétabilité des temps de rétention.

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire. Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre. Certains modèles de chromatographes ont une alimentation autonome ainsi qu'une taille réduite pour faciliter l'emploi en milieu extérieur, sur le terrain (fig. 3.16).

■ En CPG il y a quatre paramètres opérationnels pour une phase stationnaire donnée :  $L$ , longueur de la colonne et  $u$ , vitesse de la phase mobile (qui conditionnent  $N$ ),  $T$  température de la colonne et  $\beta$  rapport de phase (qui conditionnent  $k$ ). Les réglages du chromatographe permettent d'agir sur  $T$  et sur  $u$ , donc sur l'efficacité et sur les facteurs de rétention.



\* ou avec dispositif cryogénique à partir de  $-80^{\circ}\text{C}$



**Figure 3.1** Une installation de CPG.

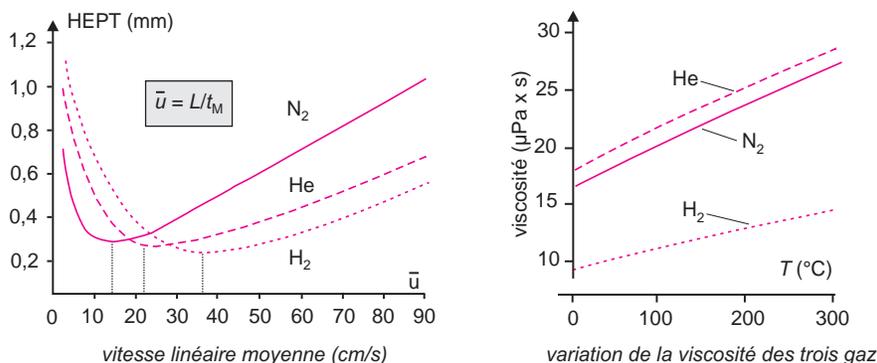
Un chromatographe commercial, le modèle 6890 de la société Agilent Technologies. L'instrument représenté comporte également un porte-échantillons et un injecteur automatique. Schéma fonctionnel d'un appareil de CPG. Chromatogramme d'un mélange de cétones.

## 3.2 GAZ VECTEUR ET RÉGULATEUR DE DÉBIT

On utilise comme phase mobile l'un des trois gaz suivants : l'hélium, le diazote ou le dihydrogène. Ils proviennent soit d'un cylindre sous pression soit d'un générateur (électrolyse de l'eau pour  $H_2$  et séparation de l'air pour  $N_2$ ), ce qui a l'avantage de fournir sur place un gaz très pur. Ce gaz vecteur doit être exempt de traces d'hydrocarbures, de vapeur d'eau et de dioxygène qui se comportent comme des impuretés préjudiciables pour certaines phases stationnaires polaires et qui réduisent la sensibilité des détecteurs. C'est la raison pour laquelle on place un double filtre, desséchant et réducteur, juste en amont du chromatographe.

La nature du gaz vecteur ne modifie pas de manière significative les valeurs des coefficients de distribution  $K$  des composés par suite de l'absence d'interaction entre gaz et solutés, la température étant le seul facteur de modification important. En revanche, la viscosité et la vitesse du gaz dans la colonne ont une influence sur la dispersion des composés dans la phase stationnaire et sur la diffusion dans la phase mobile (cf. équation de Van Deemter), donc sur le paramètre d'efficacité  $N$  et sur la sensibilité de la détection (fig. 3.2).

La pression en tête de colonne (quelques dizaines à quelques centaines de kPa) est soit stabilisée avec un système mécanique, soit asservie électroniquement afin que le débit demeure constant (système *EPC*, pour *electronic pressure control*). En effet, pour une analyse réalisée en mode de programmation ascendante de température, la viscosité de la phase stationnaire et par suite la perte de charge augmentent au cours du temps. Il est donc préférable que la pression soit corrigée pour conserver au gaz vecteur une vitesse constante et optimale. Il en résulte une analyse plus rapide et une longévité accrue des colonnes.



**Figure 3.2** Efficacité en fonction de la nature et de la vitesse linéaire du gaz vecteur.

Ces courbes typiques de van Deemter montrent que l'hydrogène est, parmi les 3 gaz étudiés, celui qui permet les séparations les plus rapides, à performances égales, tout en donnant plus de souplesse en ce qui concerne le débit, ce qui est très utile en mode programmation de température. Noter l'augmentation de la viscosité de ces gaz avec la température  $T$ . On constate aussi que l'hélium est plus visqueux que le diazote, à température égale.

■ L'injecteur et le détecteur ont des volumes morts qui entrent en ligne de compte dans le volume de rétention total. En CPG la phase mobile étant compressible, le débit mesuré en sortie de colonne doit être corrigé par le facteur de correction de compression  $J$ , qui tient compte de la surpression en amont de la colonne (cf. formule 3.1). Si le chromatogramme comporte un pic dû à un composé non retenu, il est possible de calculer la vitesse moyenne

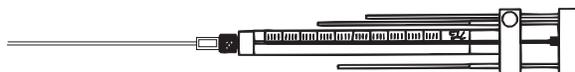
de progression du gaz vecteur dans la colonne. Par ailleurs, en adaptant un débitmètre à bulle de savon en sortie de colonne, on peut, connaissant son diamètre, en déduire la vitesse  $\bar{u}_0$  du gaz vecteur à la sortie de l'appareil, à la pression atmosphérique  $P_0$ . Le rapport entre ces deux vitesses est égal à  $J$ , facteur de compression (ou coefficient de perte de charge), lui-même relié à la pression relative  $P/P_0$  ( $P$  pression en tête de colonne) :

$$J = \frac{\bar{u}}{u_0} = \frac{3}{2} \cdot \frac{(P/P_0)^2 - 1}{(P/P_0)^3 - 1} \quad (3.1)$$

## 3.3 INTRODUCTION DE L'ÉCHANTILLON ET CHAMBRE D'INJECTION

### 3.3.1 Introduction de l'échantillon

Une très petite quantité d'échantillon en solution (ex. 0,5  $\mu\text{L}$ ), est introduite dans l'appareil avec une microseringue (fig. 3.3) dont il existe de nombreux modèles adaptés aux divers injecteurs et colonnes. Pour les échantillons gazeux on utilise des vannes à boucles semblables à celles que l'on rencontre en chromatographie liquide (cf. § 2.4). Pour mieux maîtriser la reproductibilité des injections – le simple changement d'opérateur pouvant conduire, en mode manuel, à des différences –, on adapte presque toujours un *injecteur automatique* grâce auquel les mouvements de la seringue sont automatisés (fig. 3.1). Associé à un carrousel porte-échantillons, il devient possible de programmer la séquence cyclique de prélèvement de l'échantillon, de son introduction très rapide dans l'injecteur (0,2 s) et du rinçage de la seringue. Cette dernière phase est importante pour éviter les contaminations d'un échantillon à l'autre lorsqu'il s'agit de dosages enchaînés de manière automatique.



**Figure 3.3** Seringue de 10  $\mu\text{L}$  d'un type courant, utilisé en CPG.

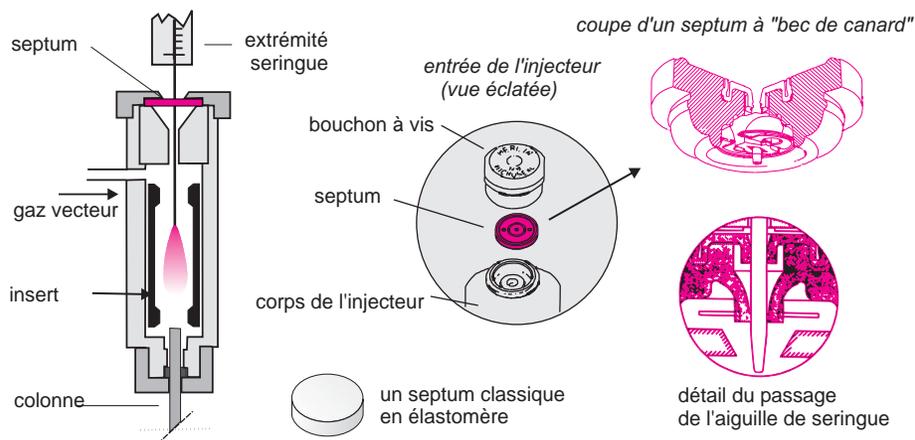
Un guide évite de tordre le piston, très fragile. Dans d'autres modèles (0,5 à 1  $\mu\text{L}$ ), le piston rentre dans l'aiguille pour libérer la totalité de l'échantillon et éviter tout volume mort (reproduit avec l'autorisation de la société Hamilton).

- Une technique d'échantillonnage connue sous le nom d'« espace de tête », dont il existe deux variantes, dites statique et dynamique, est très répandue en CPG pour faire l'analyse qualitative des constituants volatils des échantillons (cf. chapitre 21).

### 3.3.2 Injecteurs

L'injecteur est la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe. Il a deux autres fonctions : *vaporiser* et *entraîner* en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur. Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes auxquels ils sont réunis. La qualité des séparations dépend de cette phase de l'analyse.

**Injecteur à vaporisation directe.** Il consiste en un tube métallique doublé d'un chemisage de verre (appelé *insert*), balayé par le gaz vecteur et chauffé à la température moyenne d'ébullition des composés à chromatographier. L'aiguille de la microseringue contenant l'échantillon traverse l'une des extrémités de l'injecteur obturée par une pastille d'élastomère siliconé (le *septum*). L'autre extrémité est raccordée à la colonne également chauffée (fig. 3.4). La totalité de l'échantillon introduit, immédiatement vaporisé, part dans la colonne en quelques secondes. Cette méthode convient pour les colonnes remplies et les grosses colonnes capillaires, quand le débit de gaz vecteur atteint au moins 8 mL/min.



**Figure 3.4** Injecteur à vaporisation directe utilisé pour colonnes remplies.

Schéma de base d'un modèle classique à septum. Il existe une grande variété d'inserts en fonction des applications. A droite une variante de septum (le « microseal » Merlin), pouvant servir des milliers de fois (reproduit avec l'autorisation de la société Agilent Technologies).

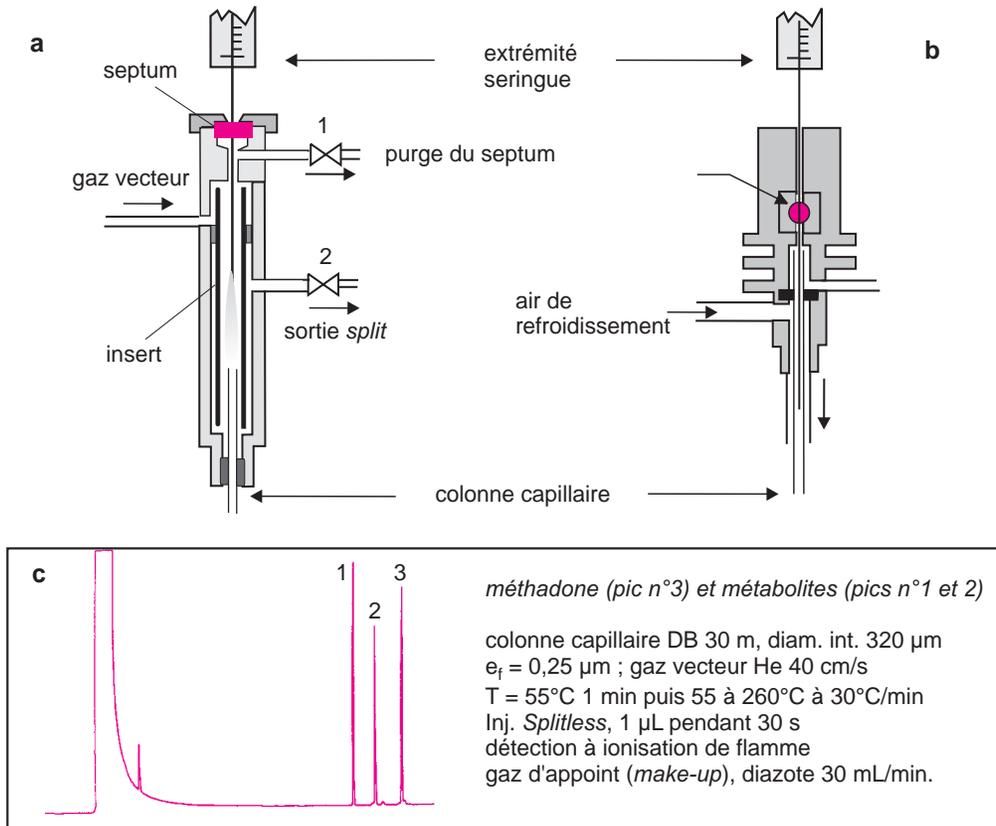
**Injecteur avec ou sans division.** Pour les *colonnes capillaires*, à faible capacité d'échantillon, les plus petits volumes qu'il est possible de prélever avec une microseringue (0,1  $\mu$ L) peuvent saturer la colonne. On utilise alors des injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, *avec* ou *sans division* (encore appelés *split* ou *splitless*).

Un courant de gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation où il se mélange à l'échantillon injecté (fig. 3.5). Une vanne de fuite, couramment réglée entre 50 et 100 mL/min, divise ce débit en deux fractions dont la plus importante est éliminée du corps de l'injecteur en entraînant la majeure partie de l'échantillon introduit. Le rapport de division (*split ratio*) peut varier entre 20 et 500. Seule la plus petite fraction pénètre dans la colonne. Elle contient une fraction de l'échantillon qui est égale au rapport de division.

$$\text{Rapport de division} = (\text{débit sortie split} + \text{débit sortie colonne}) / (\text{débit sortie colonne})$$

Ce type d'injecteur peut également fonctionner en mode *splitless*. Dans ce mode d'introduction réservé aux échantillons en solution très diluée, on injecte lentement le contenu de la microseringue en laissant la vanne 2 (fig. 3.5) en position fermée durant 0,5 à 1 minute afin que les composés vaporisés avec le solvant se concentrent dans les tous premiers décimètres de la colonne. Ce mode d'injection, qui demande plus d'expérience, se fait à une température plus basse au départ afin que le solvant précède les composés dans la colonne.

L'ouverture de la vanne 2 élimine de l'injecteur l'excès d'échantillon. La discrimination entre les composés est très faible.



**Figure 3.5** Injecteurs.

En haut : à gauche, chambre d'injection avec diviseur (la sortie 2 règle le *split*) ; à droite, injection à froid dans la colonne ; en bas : aspect typique d'un chromatogramme obtenu en mode *splitless*. Le pic solvant peut occulter une partie des composés, à moins d'utiliser un détecteur sélectif qui ne « voit » pas le solvant.

■ En analyse quantitative, l'injecteur avec diviseur peut conduire à des erreurs de concentrations dues à une forte discrimination entre les composés dont les volatilités sont très différentes : la composition de la fraction rentrant dans la colonne est différente de celle de la fraction éliminée. On évite donc ce mode d'injection lorsqu'on utilise la méthode de l'étalon externe (*cf.* section 1.15). Ce problème peut être en partie corrigé par la forme et le volume du manchon en verre qui se trouve dans l'injecteur.

**Injecteur à température programmable.** Cet injecteur encore appelé PTV, (*Programmed Temperature Vaporizer*), est de conception analogue à celle de l'injecteur split/splitless. Cependant la température de la chambre d'injection peut être programmée, de 20 à plus de 300 °C, en quelques dizaines de secondes (*fig.* 3.6).

Il conjugue les avantages de l'injection en mode split ou splitless à ceux de l'injection, à froid dans la colonne. On peut citer plus particulièrement :

- l'absence de discrimination due à l'aiguille ;
- l'utilisation de seringues classiques ;
- l'élimination du solvant ou des composés de bas point d'ébullition ;
- un plus grand volume d'injection.

Ses trois principaux modes de fonctionnement sont l'injection à froid en mode split, l'injection à froid en mode splitless et l'injection avec élimination du solvant.

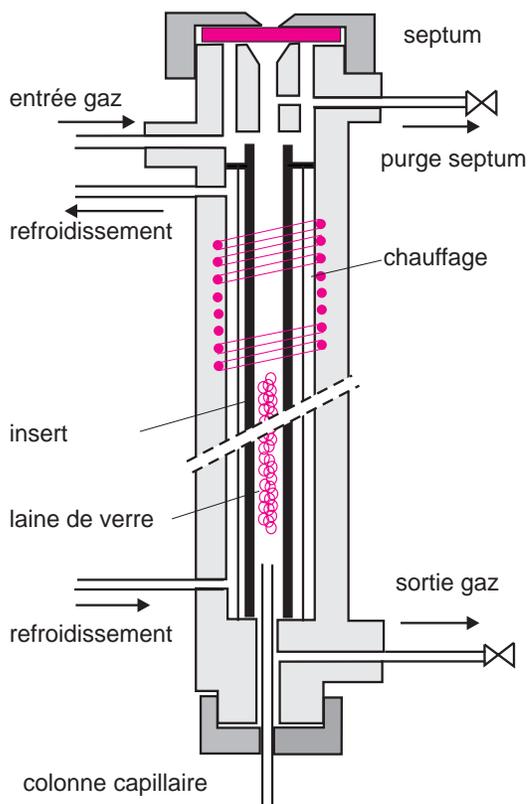
Dans l'*injection avec division, à froid*, l'échantillon est introduit dans la chambre de vaporisation froide. Immédiatement après, la vanne de fuite est ouverte et l'injecteur est chauffé. Comme l'échantillon n'est pas instantanément vaporisé, le solvant et les différents composés pénètrent dans la colonne dans l'ordre de leur point d'ébullition. De ce fait, il n'y a, à aucun moment, surcharge de la colonne.

L'*injection sans division, à froid*, est utilisée pour l'analyse de traces, la vanne de fuite est fermée pendant l'injection. La chambre d'injection est ensuite chauffée afin de transférer l'échantillon dans la colonne maintenue froide.

Dans le mode *injection avec élimination de solvant*, l'échantillon est introduit dans l'injecteur froid. Après injection, la vanne de fuite est ouverte, le débit de fuite est très élevé et peut atteindre 1 000 mL/min pour éliminer tout le solvant. Puis l'injecteur est ensuite chauffé pour permettre le transfert des composés lourds dans la colonne, la vanne de fuite étant fermée (mode splitless). Il est ainsi possible d'injecter jusqu'à 50  $\mu\text{L}$  en une seule injection ou jusqu'à 500  $\mu\text{L}$  d'échantillon en solution dans un solvant volatil, en plusieurs injections. Cette technique permet donc d'éliminer l'étape de concentration préliminaire avant injection.

### Injection à froid dans la colonne.

Ce procédé (COC, *Cold On Column*) consiste à injecter l'échantillon directement à l'intérieur de la colonne capillaire (« *on column* »), sa vaporisation



**Figure 3.6** Injecteur PTV, à température programmable. Pour permettre de faire des gradients rapides de température, la chambre d'injection est entourée d'une résistance et d'une circulation de gaz froid.

se faisant après dépôt. L'utilisation d'une microseringue dont l'aiguille (acier ou silice), a un diamètre de l'ordre de 0,15 mm seulement est nécessaire pour pénétrer dans la colonne. Celle-ci est refroidie vers 40 °C avant de reprendre sa température normale. Ce procédé utile pour les composés fragiles est difficile à maîtriser sans injecteur automatique. Il est réputé pour ne pas provoquer de discrimination entre les composés dont les volatilités sont différentes (fig. 3.5).

## 3.4 ENCEINTE THERMOSTATÉE

Le chromatographe comporte une enceinte qui permet de chauffer la colonne jusqu'à plus de 400 °C. Elle doit avoir une faible inertie thermique pour permettre une montée contrôlée et rapide en température (rampe pouvant aller jusqu'à 100 °C/min) et une excellente stabilisation (au 1/10 de °C). En adjoignant une vanne cryogénique alimentée par N<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub> liquides, l'enceinte peut être réglée à basse température.

## 3.5 COLONNES

Il existe deux types de colonnes, les colonnes *remplies* (ou colonnes à *garnissage*) et les colonnes *capillaires* (fig. 3.7). Elles n'offrent pas les mêmes performances. Pour les colonnes remplies, la phase stationnaire est immobilisée par imprégnation ou par réaction chimique avec le support poreux. Pour les colonnes capillaires, une faible épaisseur de phase stationnaire est soit déposée, soit greffée sur la surface interne de la colonne.

### 3.5.1 Colonnes remplies (à garnissage)

Ces colonnes, d'un diamètre de 1/8 ou 1/4 d'inch (3,18 ou 6,35 mm) et de 1 à 3 m de long, sont fabriquées à partir d'un tube d'acier ou de verre dont la paroi interne est traitée pour éviter d'éventuels effets catalytiques sur l'échantillon. Elles supportent un débit de gaz vecteur allant de 10 à 40 mL/min. Elles contiennent un support poreux et inerte. Il s'agit de solides ayant une surface spécifique de 2 à 8 m<sup>2</sup>/g qui se présentent sous forme de grains sphériques d'environ 0,2 mm de diamètre. Ils sont obtenus à partir de diatomites, silicates fossiles (kieselguhr, tripoli) dont le squelette est chimiquement comparable à de la silice amorphe, et d'un liant. L'un des plus connus porte le nom de Chromosorb<sup>®</sup>. D'autres matériaux de synthèse ont également été développés, tel le Spherosil<sup>®</sup> constitué de petites sphères de silice. La présence de nombreux groupements silanols confère à tous ces supports une réactivité chimique comparable à celle du gel de silice. Tous ces supports permettent le greffage ou l'imprégnation de la phase stationnaire (à un taux qui peut varier entre 3 et 25 %).

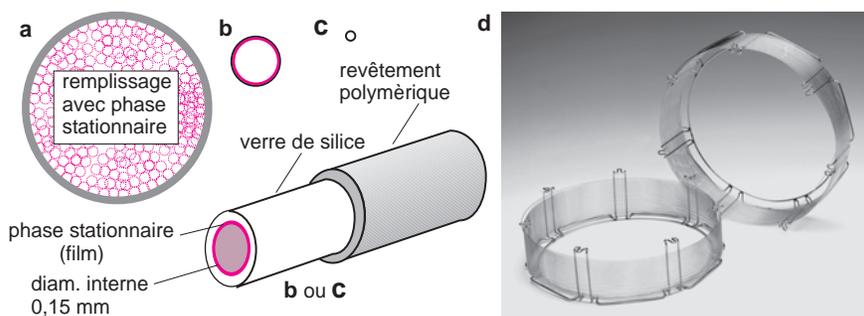
Bien qu'ayant des performances moins élevées que les colonnes capillaires, elles sont toujours utilisées pour certaines analyses de routine normalisées. Elles sont faciles à fabriquer à façon à partir d'un grand choix de phases stationnaires. Elles ne sont cependant pas adaptées aux analyses de traces actuelles.

### 3.5.2 Colonnes capillaires (à tube ouvert)

Elles sont généralement en *silice fondue* de grande pureté, obtenue par combustion de tétrachlorosilane ( $\text{SiCl}_4$ ) dans une atmosphère de dioxygène. Le diamètre interne de ces colonnes varie de 100 à 530  $\mu\text{m}$  (la précision est de quelques %). La technologie est particulièrement délicate pour obtenir des colonnes parfaitement cylindriques, dont la longueur peut aller jusqu'à 100 m pour une paroi d'environ 50  $\mu\text{m}$  (fig. 3.7). Elles comportent un revêtement extérieur brun de polyimide, polymère thermiquement stable ( $T_{\text{max}} = 370\text{ }^\circ\text{C}$ ), pour les rendre moins fragiles et pouvoir les enrouler sur elles-mêmes grâce à un support métallique adapté. Quelques fabricants proposent aussi des colonnes faites à partir d'un capillaire en métal (aluminium, nickel ou acier) qui acceptent, si la phase stationnaire le permet, des températures atteignant 450  $^\circ\text{C}$ . La paroi interne de la colonne subit divers traitements pour la préparer à une bonne fixation de la phase stationnaire. Il peut s'agir d'une attaque chimique ( $\text{HCl}$  à 350  $^\circ\text{C}$ ), ou d'un dépôt d'une fine épaisseur d'alumine ou de gel de silice.

La phase stationnaire recouvre la paroi interne sur une épaisseur régulière pouvant aller de 0,05 à 5  $\mu\text{m}$ . Elle est ou simplement *déposée* ou mieux *greffée* par des liaisons covalentes éventuellement suivie d'une polymérisation avec réticulation sur la paroi. Ce dépôt est obtenu par évaporation d'une solution ou par polymérisation *in situ* au contact de la paroi. Ce sont les colonnes WCOT (*Wall Coated Open Tubular*), et PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) suivant la nature de la phase stationnaire concernée. Certaines résistent à des rinçages périodiques avec des solvants pour leur faire retrouver leurs performances initiales.

■ **Colonnes « 530  $\mu\text{m}$  ».** Constituées par un capillaire de 0,53 mm de diamètre interne et de 5 à 50 m de long, ces colonnes désignées par « widebore », « megabore » ou « macrobore » nécessitent un débit de gaz vecteur d'au moins 5 mL/min. Les performances de ces colonnes sont inférieures à celles des colonnes capillaires de plus petit diamètre, mais elles peuvent être substituées aux colonnes remplies sur les chromatographes plus anciens, tout en conservant les mêmes injecteurs et détecteurs. Elles sont supérieures à ces dernières car elles ont aussi pour intérêt de donner très peu de ressuage, (bleed selon le terme anglais), c'est-à-dire de perte progressive de phase stationnaire. Ces colonnes sont de type WCOT ou PLOT, rarement des colonnes remplies.



**Figure 3.7** Colonnes de CPG.

Représentation à la même échelle des sections des trois types de colonnes. a) Colonne remplie de 2 mm de diamètre ; b) colonne capillaire « 530 » de 0,53 mm ; c) colonne capillaire de 0,1 mm ; détail d'une colonne capillaire. À cette échelle, l'épaisseur de phase stationnaire serait à peine visible ; d) colonnes commerciales de 50 m de longueur (Document de la Société Alltech).

■ Pour déposer une couche d'épaisseur connue, la colonne est remplie avec une solution de concentration calculée de phase stationnaire (par exemple à 0,2 % dans l'éther) pour qu'après évaporation, on obtienne l'épaisseur désirée. La couche peut être ensuite réticulée par un peroxyde ou par irradiation  $\gamma$ . Un tel procédé est comparable au dépôt d'une peinture sur une surface après avoir fixé une couche d'apprêt pour favoriser un bon accrochage.

## 3.6 PHASES STATIONNAIRES

Pour les colonnes remplies, la technique d'imprégnation, de mise en œuvre très simple, permet de choisir de nombreux composés organiques peu volatils à usage de phases stationnaires. Mais, pour les colonnes capillaires, les contraintes de fabrication imposent un choix beaucoup plus limité. Les phases actuelles correspondent à deux principaux types de composés : les *polysiloxanes* et les *polyéthylèneglycols*, chaque catégorie pouvant faire l'objet de modifications structurales mineures. On peut y ajouter les phases particulières à base de *cyclodextrines* pour l'étude des composés optiquement actifs.

Toutes ces phases sont utilisables entre deux températures, l'une minimale au-dessous de laquelle les équilibres de concentration sont trop lents à se faire, l'autre qui définit la limite supérieure d'utilisation sans dégradation, qui dépend de la nature et de l'épaisseur du film.

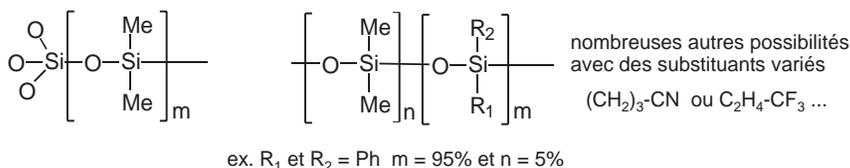
■ Les phases stationnaires décrites ci-dessous sont les plus classiques, mais dans les catalogues sont aussi présentes des phases optimisées pour des applications particulières : séparations de produits sulfurés, des pesticides chlorés, des gaz permanents, d'aldéhydes, des triglycérides, des HPA ou de produits pétroliers...

### 3.6.1 Polysiloxanes

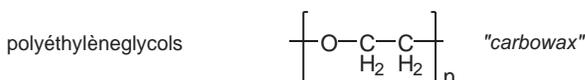
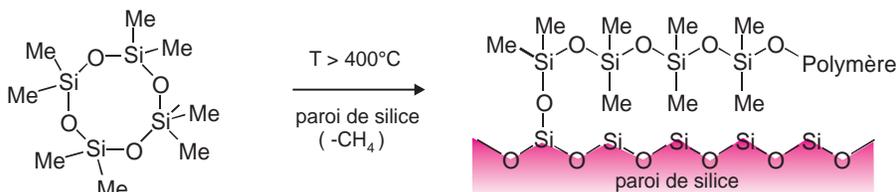
Les polysiloxanes (également connus sous le nom d'huiles et gommages silicones) correspondent à la répétition d'un motif de base comportant deux chaînes carbonées par atome de silicium (fig. 3.8). Les grandes firmes mondiales en commercialisent une vingtaine de diverses compositions avec des chaînes alkyle ou aryle (méthyle ou phényle) pouvant comporter en plus des fonctions (ex. cyanopropyle, trifluoropropyle). Les monomères, combinés en diverses proportions, permettent de moduler les propriétés des phases stationnaires (polarité et domaine de stabilité souvent de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  à  $300/325\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pour les diméthylpolysiloxanes, selon le type de colonne). Grâce à leur gamme de température très étendue, ce sont, pour les colonnes capillaires, les phases les plus utilisées.

■ La phase très connue qui sert de référence, parce qu'elle est la seule à être parfaitement définie, est le **squalane** dont la polarité est nulle dans l'échelle établie par McReynolds (cf. 3.10.3). Cet hydrocarbure saturé ( $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$ ) dérive du squalène, terpène naturel extrait du foie de requin. Il est également présent dans le sébum de la peau. Sur cette phase utilisable entre  $20$  et  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  (en mode déposé ou en imprégnation), les composés sont élués dans l'ordre de leur température d'ébullition croissante (le temps de rétention étant inversement proportionnel à la pression de vapeur). Diverses phases greffées à base de polyalkylsiloxanes, pratiquement apolaires, remplacent le squalane.

polysiloxanes greffés (exemples)



un exemple de formation d'une phase greffée



**Figure 3.8** Structure des polysiloxanes (silicones), et des polyéthylèneglycols.

L'inventaire de toutes les compositions de phases de ce type, utilisées en imprégnation ou en greffage, serait long. Traitement de la paroi interne d'une colonne en silice par le tétradiméthylsiloxane pour obtenir une phase stationnaire greffée, polymérisée et ensuite réticulée. (Le greffage ressemble à la fixation indélébile des colorants pour obtenir des tissus grand teint : le colorant est porteur d'un site réactif afin qu'il puisse s'accrocher par exemple aux fonctions alcool de la cellulose des fibres de coton).

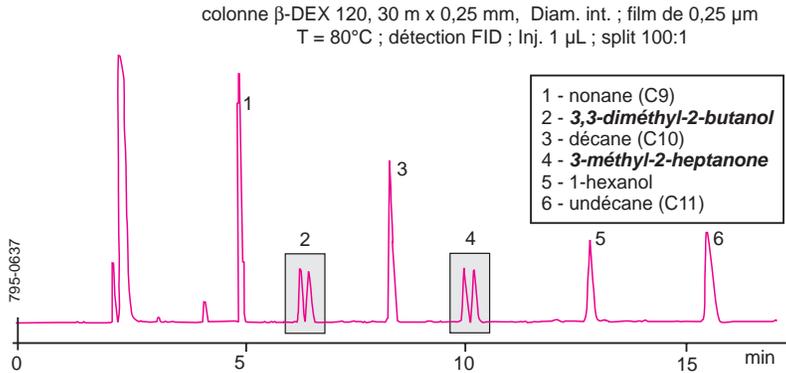
### 3.6.2 Polyéthylèneglycols (PEG)

Les représentants les plus connus de cette famille sont les **Carbowax**<sup>®</sup> (fig. 3.8), polymères polaires ( $M = 1\,500$  à  $20\,000$  – pour le Carbowax 20M) qui peuvent être utilisés en mode déposé, imprégné ou greffé ( $40 < T < 240/260$  °C, selon le type de colonne).

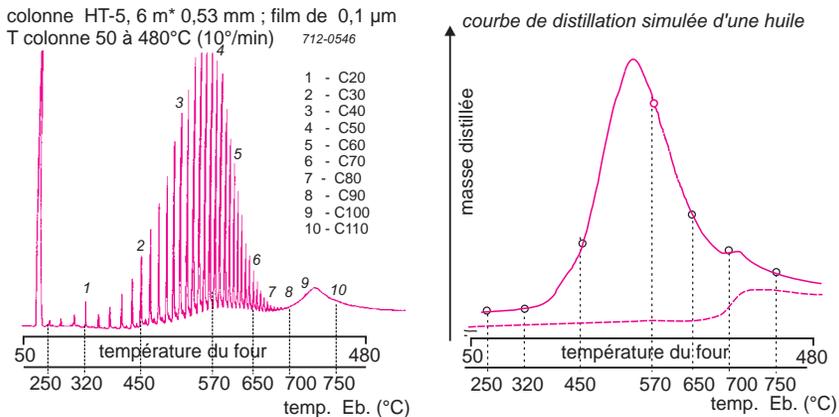
### 3.6.3 Phases stationnaires chirales

Ce sont généralement des phases polysiloxanes contenant entre 10 et 20 % en masse de molécules de  $\beta$ -cyclodextrine (polysaccharide) incluses dans le polymère de base (fig. 3.9). On utilise ce type de colonne lorsqu'on s'intéresse à la pureté optique des analytes. Si un composé organique, par exemple, comporte un carbone asymétrique, les énantiomères R et S n'auront pas tout à fait la même affinité pour la phase stationnaire chargée en cyclodextrine ce qui se traduira par des temps de rétention différents. Donc un composé chimiquement pur à l'état de racémate donnera naissance à deux pics égaux, chacun correspondant à un seul énantiomère (cf. § 2.7).

■ Certaines colonnes peuvent supporter des températures allant jusqu'à plus de 450 °C (ex. DEXSIL 400 ou PETROCOL). Parmi les applications classiques, figurent l'analyse directe des triglycérides des corps gras et la distillation simulée dans l'industrie pétrolière, cette dernière pour remplacer la distillation conventionnelle dont l'exécution peut prendre une centaine d'heures par analyse (fig. 3.10).



**Figure 3.9** Exemple de séparation obtenue avec une phase chirale comportant des cyclodextrines. En utilisant une colonne chirale les composés à l'état de racémate se dedoublent, ce qui est le cas pour les deux alcools 2 et 4. Noter que cette chromatographie en régime isotherme permettrait également de calculer les indices de rétention des composés séparés (adapté d'une illustration de la société Supelco).



**Figure 3.10** Distillation simul e d'une huile de lubrification (type polywax). En utilisant une colonne résistante à des températures  lev es, on commence par faire correspondre les *temps de rétention* et les *températures d'ébullition* d'une série d'oligo-m res connus. On chromatographie ensuite l'échantillon «   distiller » dans les mêmes conditions de programmation. Un logiciel conduit alors, d'après ce chromatogramme, à une courbe de distribution identique à celle qu'on obtiendrait par distillation, ce qui demanderait beaucoup plus de temps (documents SGE 712-0546 et -0547).

### 3.6.4 Phases stationnaires solides

Ces phases sont constitu es par des matériaux adsorbants divers : silice ou alumine d sactiv es par des sels minéraux, tamis moléculaires 5 à, verres ou polymères poreux, carbone graphité (ex. Chromosorb<sup>®</sup> 100, Porapak<sup>®</sup>). Dans le cas des colonnes capillaires à couche poreuse (PLOT), ces matériaux sont déposés en une couche uniforme, sous forme de particules très fines, sur la paroi interne de la colonne. On les utilise pour séparer les composés gazeux ou très volatils. Les colonnes à phase graphite, en particulier, ont été d velopp es pour la séparation de N<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub> et des hydrocarbures très légers. Leur efficacité est grande (cf. fig. 3.11).

■ Historiquement le gel de silice, matériau thermiquement stable et insensible à l’oxygène, a été l’un des premiers composés ayant servi de phase stationnaire, pour la réalisation de colonnes de CPG (fig. 3.11). Aujourd’hui les phases solides sont devenues des matériaux très élaborés.

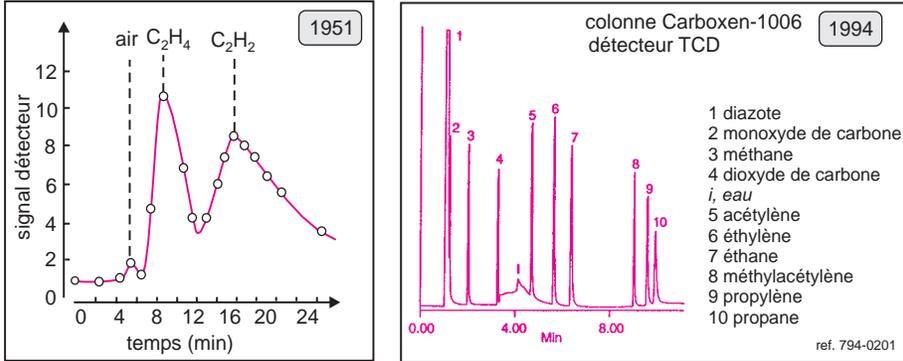
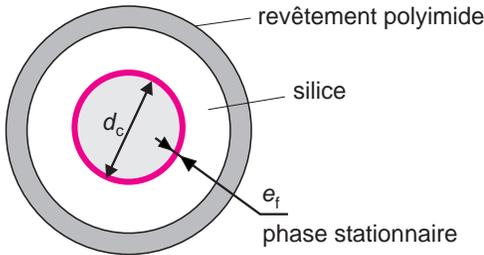


Figure 3.11 Analyses de gaz.

À gauche, l’un des tous premiers chromatogrammes, obtenu point par point, représentant un mélange d’air, d’éthylène et d’acétylène séparés sur gel de silice (E.Cremer et F.Prior, *Z. Elektrochem.* 1951, 55, 66). À droite, une analyse de gaz sur colonne PLOT moderne (reproduit avec l’autorisation de la société Supelco).

■ Pour comparer ou prévoir le comportement des colonnes capillaires, il est utile de calculer le rapport de phase  $\beta = V_M/V_S$ . En appelant  $d_C$  le diamètre interne de la colonne et  $e_f$  l’épaisseur du film déposé, un calcul approximatif conduit à :



$$\beta = \frac{V_M}{V_S} = \frac{d_c}{4e_f} \quad (3.2)$$

Si les composés à séparer sont volatils, on choisira une colonne dont le rapport  $\beta$  sera petit ( $< 100$ ), et inversement. Une colonne de  $320 \mu\text{m}$  dont la phase stationnaire fait  $1 \mu\text{m}$  d’épaisseur, conduit à  $\beta = 80$  alors que pour une colonne de  $250 \mu\text{m}$  et une épaisseur de phase de  $0,2 \mu\text{m}$ ,  $\beta = 310$ . En remarquant que  $K = k\beta$ , il résulte que  $k$ , pour un composé et une phase stationnaire donnés, augmente si  $\beta$  diminue.  $\beta$ , accessible à partir des caractéristiques physiques de la colonne permet de calculer les coefficients de partage  $K$  dont les valeurs sont généralement très grandes (1 000 par exemple), ce qui est dû à la nature de la phase mobile qui est ici un gaz.

### 3.7 PRINCIPAUX DÉTECTEURS

Certains détecteurs sont universels, c’est-à-dire qu’ils sont sensibles à pratiquement tous les composés élués, d’autres sont beaucoup plus sensibles à un type particulier de molécules.

Un détecteur spécifique, qui ne voit que certains produits, donnera un chromatogramme plus simple. À la limite, pour doser un analyte, l'idéal serait de disposer d'un détecteur ne voyant que lui. On peut répartir les détecteurs en deux groupes, ceux qui conduisent aux seuls temps de rétention, et ceux qui donnent, en outre, des informations structurales sur les composés détectés. Tous les détecteurs donnent une réponse qui dépend de la concentration molaire ou massique du soluté dans le gaz vecteur. Plusieurs détecteurs peuvent être associés en série (fig. 3.15).

### 3.7.1 Détecteur à conductibilité thermique (TCD)

Ce détecteur universel, mis au point dès les débuts de la CPG, est longtemps resté incontournable. Sa miniaturisation permet de l'utiliser aussi bien pour les colonnes remplies que pour les colonnes capillaires. De sensibilité moyenne, si on le compare aux autres détecteurs, il a néanmoins une gamme dynamique très étendue (6 décades). Son principe repose sur la mesure des variations de conductibilité thermique des mélanges gazeux en fonction de leur composition. Il s'agit d'un *catharomètre* comportant deux thermistors identiques, placés dans deux minuscules cavités d'un bloc métallique thermostaté à une température supérieure à celle de la colonne (fig. 3.12). L'un d'eux est baigné par le gaz vecteur prélevé en amont de l'injecteur et l'autre par le gaz vecteur en aval de la colonne.

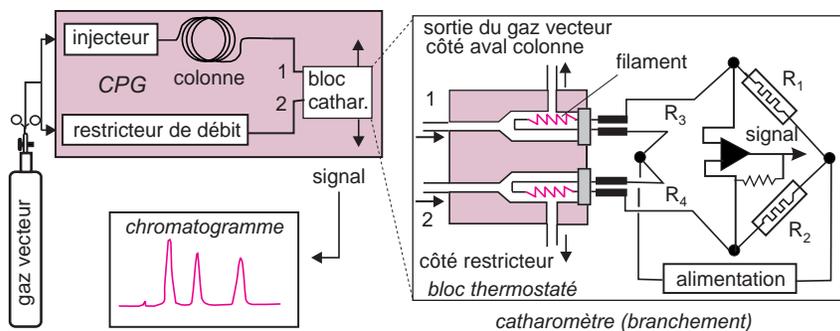


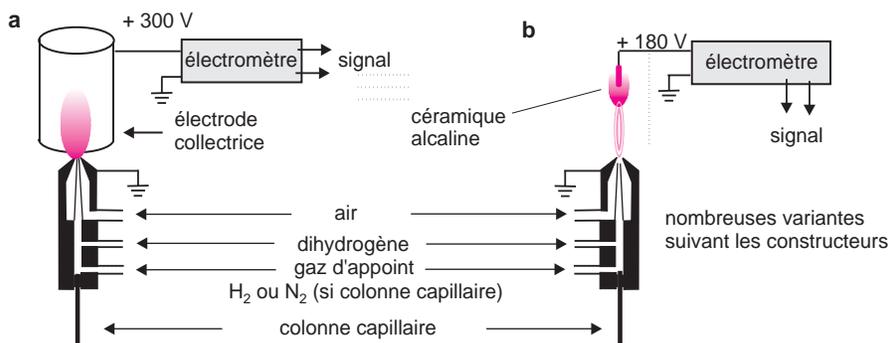
Figure 3.12 Détecteur à conductibilité thermique.

À gauche agencement montrant la circulation du gaz vecteur. À droite schéma d'un bloc catharométrique classique avec le principe de son raccordement électrique dans un montage du type pont de Wheatstone (équilibré si  $R_1/R_2 = R_3/R_4$ ). En régime stationnaire il s'établit un équilibre de température, donc de résistance, fonction de la conductibilité thermique du gaz vecteur et de l'intensité électrique. Lorsqu'un soluté est élué, le changement de composition de la phase gazeuse modifie sa conductibilité. L'équilibre thermique est rompu, d'où il résulte une variation de la résistance du filament, proportionnelle à la concentration du composé dans le gaz vecteur (en général la résistance diminue si la température augmente).

### 3.7.2 Détecteur à ionisation de flamme (FID)

Considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques, c'est le détecteur par excellence de la CPG actuelle. Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans la flamme d'un petit brûleur alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées, responsables

du passage d'un courant ionique extrêmement faible ( $10^{-12}$  A) entre deux électrodes ( $ddp$  de 100 à 300 V). L'extrémité du brûleur sert d'électrode de polarisation (masse). La seconde électrode, de forme annulaire, entoure la flamme. Le signal est amplifié par un électromètre en une tension mesurable (fig. 3.13). Pour les composés organiques, l'intensité du signal est sensible au *débit massique* de l'échantillon, sachant bien que la présence de certains hétéroéléments tels les halogènes, peut modifier notablement la réponse. L'aire du pic reflète donc la masse du composé élué ( $dm/dt$  intégré entre les instants de début et de fin de pic dont la masse totale est  $m$ ). Le FID est donc à l'abri des variations de débit qui peuvent conduire à des erreurs avec les détecteurs du type TCD. Pour les composés organiques, la sensibilité, très grande, s'exprime en C/g de l'élément carbone. La limite de détection est de 2 ou 3 pg/s. et la linéarité atteint  $10^8$  (8 décades). Cependant la linéarité ne doit pas faire oublier que c'est avec les solutions les plus diluées que la résolution est la meilleure.



**Figure 3.13** Détecteurs FID (a) et NPD (b).

Les électromètres que l'on utilise pour ces détecteurs sont des dispositifs qui permettent de mesurer des intensités très petites, trop faibles pour un galvanomètre.

- Pour évaluer la quantité globale de composés organiques volatils présents dans l'air pollué (les COV), il existe des petits instruments portables constitués, pour l'essentiel, par un détecteur à ionisation de flamme, ce qui permet de faire une mesure, sans séparation chromatographique préalable, du facteur carbone de l'atmosphère testée.

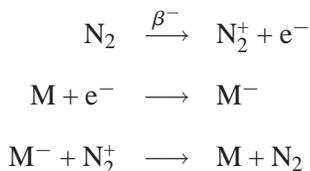
### 3.7.3 Détecteur thermoionique (NPD)

Ce détecteur est très sensible aux composés azotés (N) ou phosphorés (P). Il comporte un petit cylindre en céramique dopée avec un sel alcalin (ex. sulfate de rubidium) auquel on applique une tension électrique pour entretenir un petit plasma (800 °C) alimenté par combustion d'un mélange air/hydrogène (fig. 3.13). À la différence du FID la flamme est plus petite. Les composés contenant N ou P donnent, assez spécifiquement, des fragments de décomposition transformés en ions négatifs. Ces ions sont recueillis sur une électrode collectrice. Le diazote de l'air est inactif. La sensibilité est typiquement de 0,1 pg/s pour N ou P et l'étendue dynamique de 5 décades, mais elle varie beaucoup avec les réglages.

### 3.7.4 Détecteur à capture d'électrons (ECD)

Il s'agit d'un détecteur considéré comme sélectif car il est beaucoup plus sensible aux dérivés halocarbonés. Un courant d'azote, ionisé par un flux d'électrons généré au moyen

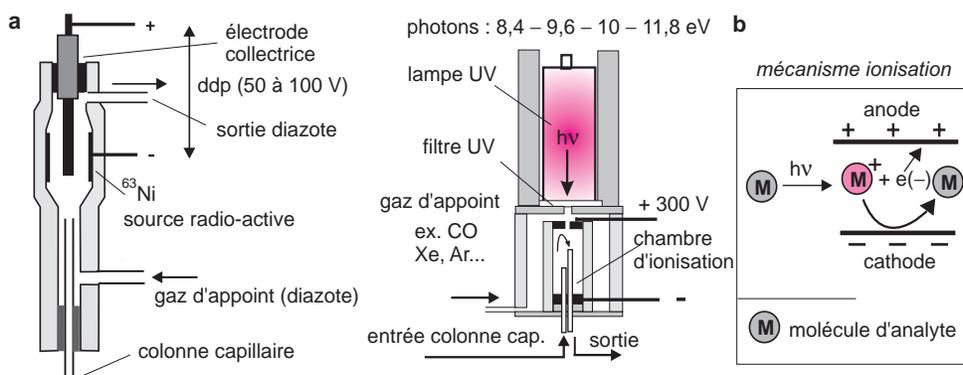
d'une source radioactive  $\beta^-$  de faible énergie (quelques mCi de  $^{63}\text{Ni}$ ), circule entre deux électrodes soumises à une ddp pulsée d'une centaine de volts (fig. 3.14), de telle sorte qu'il s'établit, au repos, un courant de base  $I_0$  dû essentiellement aux électrons libres, très mobiles. Si des molécules  $M$ , contenant un halogène (F, Cl ou Br), traversent la zone entre les deux électrodes, elles captent une partie des électrons thermiques pour former des ions négatifs lourds, donc moins mobiles.



L'intensité recueillie suit une loi exponentielle décroissante du type  $I = I_0 \exp[-kc]$ . On considère cependant que la réponse varie linéairement sur une gamme dynamique de 4 décades avec le diazote comme gaz d'appoint). La présence d'une source radioactive dans ce détecteur le soumet à une réglementation particulière (visites d'inspection, localisation, maintenance). Il est souvent utilisé dans l'analyse des pesticides chlorés.

■ **Make-up.** Par nature, ces trois derniers détecteurs doivent être alimentés avec un débit gazeux de 20 mL/min au minimum, bien supérieur au débit réel des colonnes capillaires, pour donner une réponse correcte et augmenter leur sensibilité. Ce débit est atteint en mélangeant en sortie de colonne un gaz d'appoint, identique ou différent (tel le diazote) de celui qui sert de phase mobile. Cette opération est désignée par le terme make-up.

### 3.7.5 Détecteur à photo-ionisation (PID)



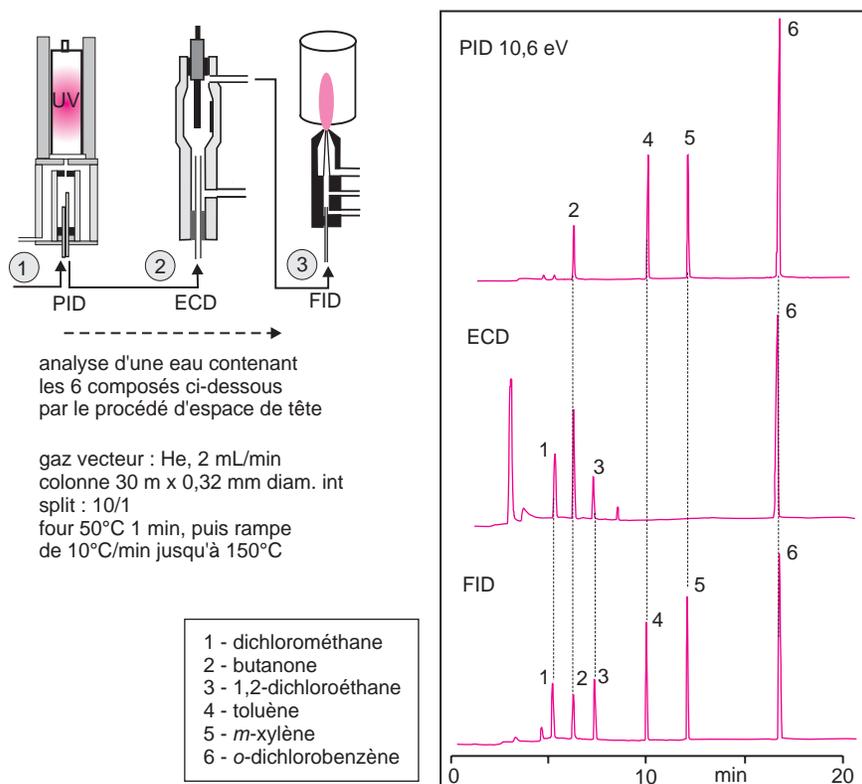
**Figure 3.14** Détecteurs à capture d'électrons (a) et détecteur à photo-ionisation (b).

Le détecteur à capture d'électrons doit être installé dans un emplacement ventilé par suite de la présence de la source radioactive. Le détecteur à photoionisation comporte une source UV dont on peut sélectionner l'énergie des photons émis par un filtre adéquat de façon à ne pas ioniser le gaz vecteur, mais les seules molécules du composé élué ( $M + h\nu \rightarrow M^+ + e^-$ ), par exemple LiF pour 11,8 eV,  $\text{MgF}_2$  pour 9,6 – 10 eV, saphir pour 8,4 eV. Au contact des électrodes les molécules redeviennent neutres. Cette ionisation est donc réversible. Le gaz d'appoint permet une circulation optimale.

Ce détecteur assez sélectif mais peu répandu, convient aux hydrocarbures ainsi qu'aux dérivés contenant S ou P. Le principe consiste à irradier le composé élué avec une lampe UV émettant des photons très énergétiques (de 8,4 à 11,8 eV). La photo-ionisation se produit quand l'énergie du photon est supérieure à l'énergie de 1<sup>re</sup> ionisation du composé (fig. 3.14). Ainsi un photon de 9,6 eV pourra ioniser le benzène ( $PI_1 = 9,2$  eV) mais non l'isopropanol ( $PI_1 = 10,2$  eV) qui sera donc peu visible sur le chromatogramme. La collecte des électrons libérés par une électrode reliée à la borne d'un électromètre permet des mesures de concentrations.

Il s'agit d'un détecteur qui peut fonctionner à plus de 400 °C et qui n'est pas destructif, l'ionisation étant réversible et ne touchant qu'une faible fraction des molécules de chaque composé.

### 3.8 DÉTECTEURS CONDUISANT À DES DONNÉES STRUCTURALES



**Figure 3.15** Association de trois détecteurs en série.

À la sortie d'une colonne capillaire on peut installer en série ou en parallèle, selon que le détecteur détruit ou non l'échantillon, plusieurs détecteurs de principes différents. Chromatogrammes du mélange injecté, obtenus en sortie de chaque détecteur. On remarquera que la sélectivité varie beaucoup d'un détecteur à un autre.

Les détecteurs précédents ne donnent pas d'informations sur la nature des composés élués, tout au plus sont-ils sélectifs. L'identification repose donc sur un étalonnage préalable des temps de rétention ou sur l'utilisation des indices de rétention (*cf.* § 3.10). Lorsque le chromatogramme présente des pics rapprochés, des confusions de composés peuvent se produire. Pour y remédier, on peut soit associer plusieurs détecteurs complémentaires (fig. 3.15), soit choisir des détecteurs permettant d'avoir des informations spectrales ou relatives à la composition élémentaire des analytes. On dispose alors à la fois du temps de rétention et de caractéristiques propres aux composés. Ces détecteurs reposent sur des méthodes indépendantes d'analyse, dont les résultats sont d'autant plus fiables que les composés ont été bien séparés par la colonne.

### 3.8.1 Détecteur à émission atomique

Les composés en sortie de colonne débouchent dans un plasma à micro-ondes dont la température est suffisante pour créer les conditions rencontrées dans un appareil à émission atomique (*cf.* chapitre 14). Chaque atome présent dans les solutés élués donne des radiations caractéristiques qui permettent de l'identifier (fig. 14.8).

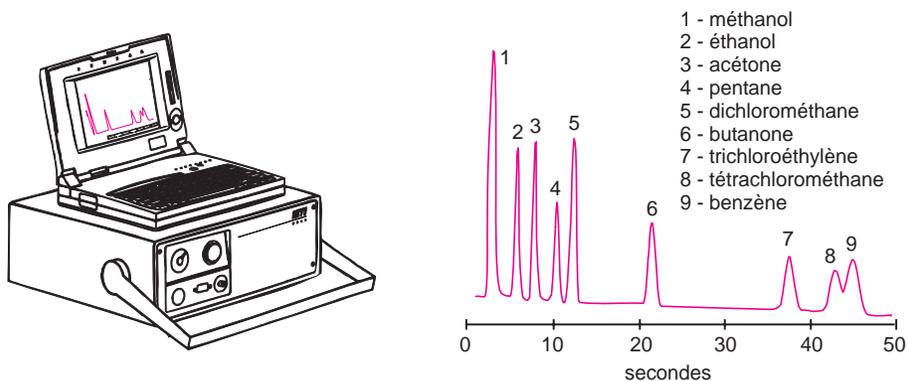
### 3.8.2 Autres détecteurs

En adaptant en sortie de colonne un *détecteur de masse* (spectromètre de masse basse résolution, *cf.* chapitre 16), on obtient le spectre de fragmentation de chacun des composés élués. À partir du courant ionique total (*TIC*), on peut tracer le chromatogramme représentatif des composés élués. En sélectionnant un ion particulier (technique *SIM*), on obtiendra un chromatogramme sélectif. Bien que cette méthode conduise à une sensibilité moindre qu'avec les détecteurs classiques, elle est devenue irremplaçable dans nombre de dosages actuels, notamment dans les analyses de l'environnement. Elle exige néanmoins l'utilisation de colonnes performantes ( $DI = 0,1$  à  $0,2$  mm) et à ressuage ultrafaible. De même, avec un *détecteur infrarouge*, on obtient le spectre du moyen infrarouge (*cf.* chapitre 10) et avec un *détecteur ultraviolet*, un spectre ultraviolet (*cf.* chapitre 9) de chaque composé élué.

On entre ici dans le domaine des méthodes couplées, largement utilisées pour doser les traces. Les deux modes de détection ci-dessus peuvent être réunis dans une même installation à la suite d'une CPG à colonne capillaire.

## 3.9 CHROMATOGRAPHIE RAPIDE

D'une manière générale, la chromatographie est une méthode lente d'analyse. Les temps de rétention dépassent encore souvent une heure quand on cherche à séparer tous les constituants des mélanges complexes. Pour raccourcir ces temps on peut agir sur différents paramètres. Le plus évident consiste à utiliser une colonne plus courte et pour ne pas perdre en efficacité, diminuer le diamètre de la colonne capillaire (*cf.* relation 1.33). On choisit de plus un film de phase stationnaire de faible épaisseur ( $0,1 \mu\text{m}$ ) et on opère en programmation de température avec une rampe importante (ex.  $100 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ), ce qui est possible avec les instruments et les colonnes actuels. On passe ainsi dans le domaine de la *chromatographie rapide*.

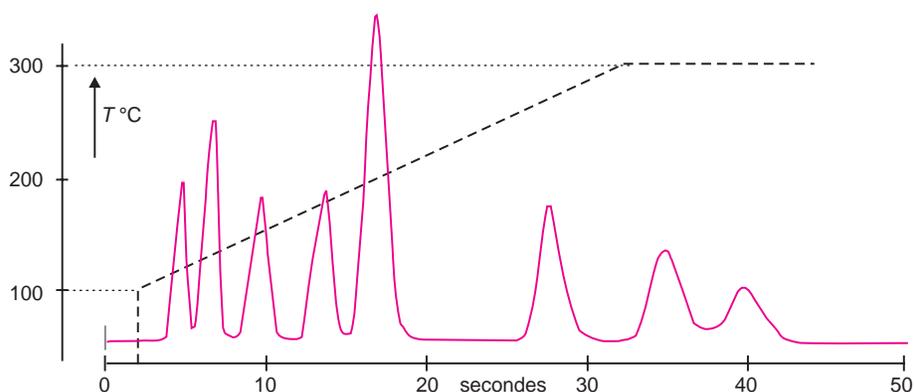


**Figure 3.16** Chromatographes miniaturisés.

En haut : micro-chromatographe conçu pour les analyses sur le terrain des gaz et autres composés volatils. Exemple de chromatogramme obtenu avec cet appareil (reproduit avec l'autorisation de la société SRA (Agilent-Technologies)). En bas : appareil à colonne capillaire et détecteur par photo-ionisation, d'un poids de 4 kg environ avec la réserve incorporée de gaz vecteur (CO<sub>2</sub>). Cet appareil est principalement destiné aux analyses de la pollution de l'air par les composés organiques volatils (les COV). (reproduit avec l'autorisation de la société Photovac).

Pour les composés volatils et avec des conceptions différentes de colonne, recouverte d'une gaine faisant office de résistance, on peut augmenter encore plus rapidement la température (200 °C/20 s). Les temps de rétention diminuent fortement (fig. 3.17). Ce type de *chromatographie à très grande vitesse* est utilisée dans les analyses de contrôle.

■ Le détecteur doit pouvoir suivre sans retard les variations rapides de concentration au moment de l'élution de chaque analyte. Pour la détection par spectrométrie de masse, il y a lieu d'être attentif à la vitesse de balayage du rapport  $m/z$ , un balayage séquentiel trop lent aboutissant à un document sur lequel la concentration dans la chambre d'ionisation n'est pas la même d'une extrémité à l'autre de l'enregistrement. Les TOF (cf. 16.5) ne présentent pas cet inconvénient.



**Figure 3.17** Chromatogramme à grande vitesse.

Sur le graphe figure également la programmation de température de la colonne.

■ Il existe des micro-chromatographes portatifs pour l'analyse rapide des gaz et produits volatils d'un poids de quelques kg seulement. Bien que comportant une réserve de gaz vecteur pour assurer leur autonomie, leur encombrement reste faible (fig. 3.16). Certaines pièces sont obtenues par micro-usinage d'éléments en silicium. Une courte colonne capillaire (5 m) est insérée dans une gaine métallique servant de résistance qui permet une montée en température rapide pouvant atteindre 20 °C/s. L'efficacité ( $N$ ) est assez faible mais le gradient de température permet d'optimiser la sélectivité entre les composés.

### 3.10 INDICES DE RÉTENTION ET CONSTANTES DES PHASES STATIONNAIRES

L'introduction de ces paramètres a au moins trois objectifs :

- Caractériser tout composé par une grandeur plus générale que son temps de rétention dans des conditions définies. Il en résulte le *système des indices de rétention* qui est un moyen efficace et peu coûteux pour éviter certaines erreurs d'identification.
- Suivre l'évolution dans le temps des colonnes et par suite leurs performances.

► Classer entre elles les phases stationnaires connues pour faciliter le choix d'une colonne bien adaptée pour tout problème nouveau de séparation, sachant que la polarité ou la nature chimique d'une phase stationnaire ne permet pas, seules, de prévoir sa réelle aptitude séparatrice. On examine pour cela le comportement des phases stationnaires vis-à-vis de quelques composés de référence. On aboutit aux *constantes des phases stationnaires*.

### 3.10.1 Droite de Kovats

Pour déterminer les indices de rétention on met à profit la propriété générale suivante :

Quand on injecte un mélange constitué de composés appartenant à une série homologue de  $n$ -alcanes sur une colonne maintenue en régime isotherme, le chromatogramme qui en résulte est tel que les logarithmes des temps de rétention réduits  $t'_{R(n)}$  croissent linéairement avec le nombre  $n$  d'atomes de carbone des  $n$ -alcanes correspondants (fig. 3.18). En reportant sur un graphe  $n$  et  $\log t'_{R(n)}$  on obtient, en effet, des points bien alignés :

$$\log (t_R(n) - t_M) = \log t'_{R(n)} = a \cdot n + b \quad (3.3)$$

$t'_{R(n)}$  correspond au temps de rétention de l'alcane ayant  $n$  atomes de carbone, diminué du temps mort  $t_M$  ;  $a$  et  $b$  sont des coefficients numériques. La pente de la droite obtenue dépend de la colonne dans sa globalité et des conditions de réglage du chromatographe

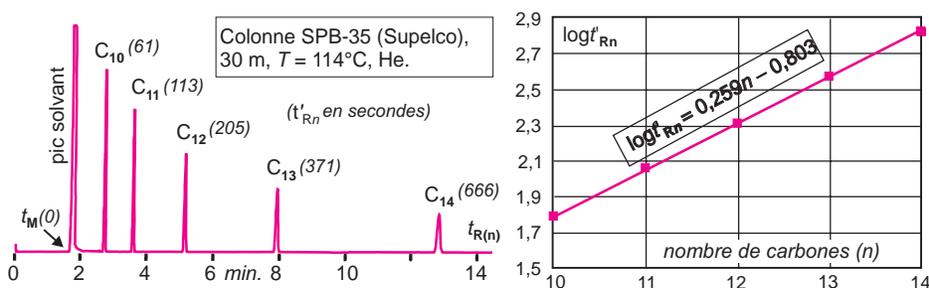


Figure 3.18 Droite de Kovats.

Chromatogramme en régime isotherme d'une série de 5  $n$ -alcanes ( $C_{10} - C_{14}$ ) et droite de Kovats correspondante dans les conditions d'analyse précisées.

■ Cette relation découle d'une autre relation linéaire connue en thermodynamique entre la variation de l'énergie libre et la constante d'équilibre  $K$ , ( $\Delta G = -RT \ln K$ ), pour une famille homologue de composés, dont chaque terme diffère du précédent par un  $\text{CH}_2$  supplémentaire. Sachant que  $K = k\beta$ , soit  $t'_R = K t_M / \beta$ , il en résulte que  $\log t'_R$  croît comme  $\ln K$  au sein de la famille homologue :  $\ln t'_R = \ln K + (\ln t_M / \beta)$ .

### 3.10.2 Indice de rétention de Kovats d'un composé.

Sans changer les conditions de réglage de l'appareil, on injecte ensuite un composé ( $X$ ). Le nouveau chromatogramme obtenu va permettre de calculer  $I_X$ , *indice de rétention de Kovats* de ( $X$ ) sur la colonne considérée : celui-ci est égal au produit par 100 du nombre apparent d'atomes de carbone de l'« alcane théorique » ayant le même temps de rétention réduit.

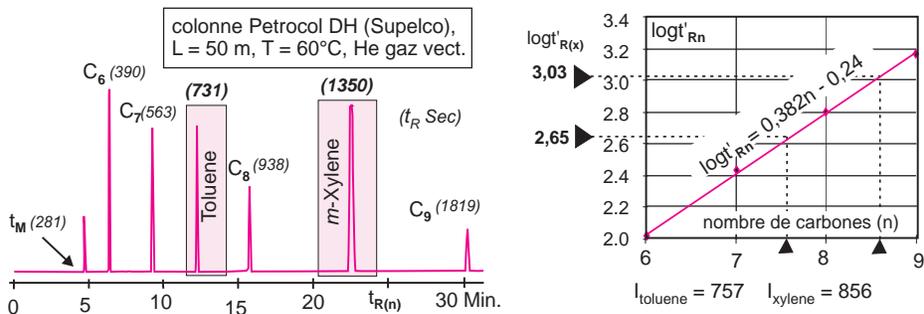
Deux méthodes sont utilisées pour trouver le nombre  $n_X$  de carbones équivalents de ( $X$ ) :

- ▶ La première qui repose sur l'équation de la droite de Kovats obtenue précédemment (fig. 3.18) et permet de calculer  $n_X$  (donc  $I_X$ ) par utilisation d'un tableur par exemple.
- ▶ La seconde, qui permet de calculer directement  $I_X$  à partir des temps de migration réduits des deux  $n$ -alcane (à  $n$  et  $n + 1$  C) qui encadrent ( $X$ ) sur le chromatogramme :

$$I_X = 100n + 100 \frac{\log t'_{R(X)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \quad (3.4)$$

À la différence de la droite de Kovats, les indices de rétention ne dépendent que de la phase stationnaire et non des conditions de réglage du chromatographe. Ils s'affranchissent en particulier des temps de rétention.

Pratiquement, pour s'assurer de l'identité des conditions expérimentales pour les deux injections, on co-injecte le composé  $X$  avec le mélange des  $n$ -alcane (fig. 3.9 et 3.19).



**Figure 3.19** Indices de rétention de Kovats ( $I = 100 n_X$ ) sur une colonne en régime isotherme.

Le nombre de carbones équivalent  $n_X$ , est trouvé à partir du logarithme du temps de rétention réduit  $t'_{R(X)}$ . Le chromatogramme correspond à l'injection d'un mélange de 4  $n$ -alcane et 2 hydrocarbures aromatiques. Les valeurs en italiques correspondent aux temps de rétention en secondes. En injectant périodiquement ce même mélange, la modification des indices de Kovats de ces hydrocarbures permet de suivre l'évolution des performances d'une colonne. En programmation de température on peut encore tracer cette droite en utilisant une formule corrigée, mais la précision est moins bonne.

■ Le chromatogramme, qui permet d'obtenir la droite de Kovats de la phase stationnaire étudiée, peut servir accessoirement à juger des performances que l'on peut attendre de la colonne. On utilise pour cela le nombre de séparation, paramètre encore appelé trenzahl ( $TZ$ ), calculé à partir des formules 3.5 ou 3.6. Les deux temps de rétention se rapportent à deux alcane successifs ( $n$  et  $n + 1$  atomes de carbone), ou à deux composés de même type. Le nombre de séparation indique combien de composés seraient convenablement séparés par la colonne dans l'intervalle arbitraire d'éluion de ces deux composés. On choisit les alcane qui encadrent le temps d'éluion du composé à analyser. Sur le chromatogramme de la fig. 3.19, le  $TZ$  est de l'ordre de 30.

$$TZ = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\delta_1 + \delta_2} - 1 \quad (3.5)$$

ou encore :

$$TZ = \frac{R}{1,18} - 1 \quad (3.6)$$

Il existe quelques tables des indices de rétention des composés courants sur les phases les plus connues. Si on dispose de plusieurs indices de rétention d'un même composé, obtenus avec des phases différentes, on a alors un ensemble unique de valeurs qui permet de le caractériser de manière plus certaine. Cependant, de ce point de vue, les indices de rétention n'ont pas la fiabilité de la méthode couplée CPG/SM (cf. § 3.8.2) très générale d'emploi, mais en revanche demandant un matériel plus coûteux.

■ **Temps de rétention imposé.** L'identification des composés dont les temps de rétention sont voisins et les spectres de masse presque identiques (certains types d'isomères) est évidemment difficile. Une méthode actuelle consiste à choisir un standard interne ou un composé dont on sait qu'il est présent dans tous les échantillons à analyser et par l'intermédiaire du logiciel d'analyse on bloque la valeur de son temps de rétention pour les différentes analyses, mêmes si elles sont effectuées avec des appareils différents. Ceci a pour effet de conserver également les temps de rétention des autres composés du mélange, facilitant leur identification. Cette approche qui évite de recourir aux indices de rétention est possible avec les appareils modernes. Elle est connue du sigle RTL (Retention Time Locking).

### 3.10.3 Constantes de McReynolds des phases stationnaires

Pour caractériser le comportement d'une phase stationnaire on compare les indices de Kovats de cinq composés témoins appartenant à des types structuraux différents sur la phase étudiée d'une part et sur le squalane d'autre part, phase qui a été choisie comme référence pour ce calcul. Les cinq indices pour la colonne au squalane, la seule phase apolaire qui soit reproductible car formée d'un produit pur, ont été établis une fois pour toutes (tab. 3.1).

Les cinq constantes de McReynolds pour une phase donnée, s'obtiennent en calculant les différences observées pour chacune des substances testées entre l'indice de Kovats sur squalane ( $I_{\text{Squalane}}$ ) et l'indice sur la phase étudiée ( $I_{\text{phase}}$ ) :

$$\text{Constante de McReynolds} = \Delta I = (I_{\text{phase}} - I_{\text{Squalane}}) \quad (3.7)$$

La somme de ces 5 valeurs calculées d'après 3.7, a été retenue pour définir la polarité globale de la phase testée.

■ On admet que chacun des composés test apporte une information particulière sur la phase stationnaire. Le benzène pour l'effet inducteur, la pyridine pour l'effet accepteur  $H^+$ , le butanol pour les liaisons hydrogène, le nitropropane pour les interactions dipolaires...

Ces constantes, qui dépendent des structures moléculaires, permettent d'apprécier les forces d'interaction soluté/phase stationnaire en fonction de quelques grandes classes de composés. Un indice dont la valeur est élevée indique que la phase étudiée retient fortement les composés porteurs de la fonction organique correspondante, ce qui normalement conduit à une sélectivité accrue. Ainsi, pour séparer un hydrocarbure aromatique d'un mélange contenant des cétones, on choisira une colonne pour laquelle la constante pour le benzène est assez différente de celle de la butanone. Ces différences d'indices de rétention figurent dans la plupart des catalogues des fabricants à l'usage des chromatographistes (tab. 3.1). Les constantes de McReynolds ont remplacé les constantes de Rohrschneider, basées sur le même principe mais utilisant certains composés de référence différents.

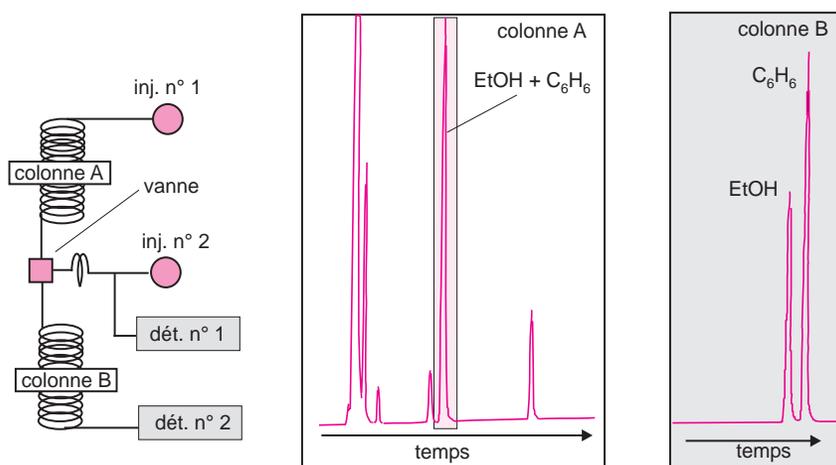
**Tableau 3.1** Constantes de McReynolds ( $\Delta$ ) de quelques phases stationnaires.

Phase stat.	benzène	1-butanol	2-pentanone	nitropropane	pyridine
Squalane	0	0	0	0	0
SPB-Octyl	3	14	11	12	11
SE-30 (OV-1)	16	55	44	65	42
Carbowax 20M	322	536	368	572	510
OV-210	146	238	358	468	310
<b>indice de Kovats des 5 composés témoins (X' Y' Z' U' S') sur squalane</b>					
/squalane	653	590	627	652	699

■ Les calculs précédents des indices de rétention impliquent que les mesures soient effectuées dans des conditions isothermes. En programmation de température, ils donnent encore de bons résultats en substituant, dans la formule 3.7, les temps de rétention aux logarithmes correspondants.

### 3.11 CHROMATOGRAPHIE « MULTIDIMENSIONNELLE »

En réunissant dans un montage particulier deux colonnes ayant des sélectivités différentes on peut associer des mécanismes de séparation distincts (fig. 3.20). Le dispositif permet de recueillir une fraction non résolue à l'issue de la première colonne pour la ré-injecter dans la seconde colonne. L'installation comporte donc deux détecteurs et une vanne d'introduction entre les deux colonnes.



**Figure 3.20** Chromatographie bidimensionnelle et exemple de séparation en suivant ce procédé.

Agencement des deux colonnes avec les deux détecteurs et la vanne d'injection intermédiaire. Dans l'exemple ci-dessus, la colonne A, polaire, ne sépara pas l'éthanol du benzène. La fraction correspondante est ré-injectée dans la colonne B, non polaire, dans laquelle la séparation a lieu (d'après un document Thermoquest).

## QUELQUES SITES SUR INTERNET

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

[www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)

[www.shimadzu.com](http://www.shimadzu.com)

[www.thermo.com/finnigan](http://www.thermo.com/finnigan)

[www.varianinc.com](http://www.varianinc.com)

[www.chromatosud.com](http://www.chromatosud.com)

## EXERCICES

*Solutions en fin d'ouvrage*

### Exercice 3.1

La méthode la plus connue d'estimation du temps mort  $t_M$  consiste à mesurer le temps de rétention d'un composé non retenu. On propose ici une autre méthode de calcul du temps mort  $t_M$  faisant appel à la relation utilisée dans l'établissement des indices de rétention, à savoir que dans une série homologue de composés organiques on peut écrire, si la température de la colonne ne varie pas :

$$\log(t_R - t_M) = a \cdot n + b$$

$t_R$  représente le temps de rétention du composé à  $n$  atomes de carbone,  $a$  et  $b$  sont des constantes qui dépendent de la classe des solutés et de la phase stationnaire choisie.

- Rappeler les paramètres de caractérisation chromatographiques qui exigent de connaître  $t_M$ . Quel est le composé habituellement utilisé pour déterminer  $t_M$  ?
- Calculer, avec la méthode ci-dessus,  $t_M$  à partir de l'expérience suivante : on injecte un mélange des alcanes linéaires à 6, 7 et 8 atomes de carbone. Les temps de rétention sont respectivement de 271, 311 et 399 s en régime isotherme à 80 °C (longueur de la colonne 25 m,  $d_C = 0,2$  mm,  $e_f = 0,2$  µm, phase stationnaire à base de polysiloxanes).
- Connaissant l'indice de Kovats de la pyridine sur squalane qui est de 695, quelle est la constante de McReynolds de ce composé sur la colonne étudiée, sachant que dans les conditions de l'expérience, son temps de rétention est de 346 s ?

### Exercice 3.2

Dans une expérience de CPG, on injecte un mélange de  $n$ -alcanes (à  $n$  atomes de carbone,  $n$  étant variable) et de 1-butanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) sur une colonne en régime isotherme comportant une phase stationnaire de type diméthylpolysiloxane. L'équation de la droite de Kovats déterminée à partir du chromatogramme est :

$$\log t'_R = 0,39 n - 0,29 \quad (t'_R \text{ exprimé en secondes}).$$

Le butanol a un temps de rétention corrigé de 168 s. Sachant que son indice de rétention (de Kovats) sur colonne squalane est de 590, en déduire la constante de McReynolds du butanol sur cette colonne.

**Exercice 3.3**

Montrer que, pour une colonne capillaire, le débit moyen peut être calculé à partir de la formule suivante :

$$D_{\text{mL/min}} = \bar{u}_{\text{cm.s}} \times 0,47 d_C^2 (\text{mm})$$

$\bar{u}$  représente la vitesse linéaire de la phase mobile dans la colonne de diamètre interne  $d_C$ .

**Exercice 3.4**

On donne ci-après un tableau des valeurs du facteur de capacité  $k$  (en italiques) pour quatre gaz de raffinerie, étudiés à trois températures différentes sur une même colonne capillaire ( $L_C = 30$  m, diam. int.  $DI = 250 \mu\text{m}$ ) dont la phase stationnaire est du type SE-30. Le chromatographe est muni d'un accessoire cryogénique.

composé	temp. Eb. (°C)	température de la colonne (°C)		
		-35	25	40
éthylène	- 104	<i>0,249</i>	<i>0,102</i>	<i>0,0833</i>
éthane	- 89	<i>0,408</i>	<i>0,148</i>	<i>0,117</i>
propène	- 47	<i>1,899</i>	<i>0,432</i>	<i>0,324</i>
propane	- 42	<i>2,123</i>	<i>0,481</i>	<i>0,352</i>

- D'après l'ordre d'éluion peut-on dire si la phase si la phase SE-30 est polaire ou non ?
- Calculer le facteur de sélectivité pour le couple propène-propane aux trois températures indiquées.
- Pourquoi  $k$  diminue-t-il lorsque la température croît, pour un même composé ?
- Quel est le nombre de plateaux théoriques de la colonne pour le propane à 40 °C, sachant qu'à cette température le facteur de résolution pour le couple propène-propane est égal à 2 ? Calculer la HEPT correspondante.
- Quelle serait la valeur théorique minimale de l'HEPT pour le propane à 40 °C ?

**Exercice 3.5**

Dans une série d'analyses par CPG, on cherche à déterminer l'influence de la longueur de la colonne sur certains paramètres du chromatogramme. Toutes les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions de température et de débit du gaz vecteur.

$L$ (m)	$a = \sqrt{L}$	$T_R$ (min)	$T_R / L$	$R$	$R/a$
15		3,7		2,05	
30		7,5		2,91	
60		15,3		4,15	

- Compléter le tableau.
- Quelle relation simple peut-on, aux incertitudes de mesures près, envisager entre temps de rétention et longueur de la colonne ?
- Quelle relation simple peut-on, aux incertitudes de mesures près, envisager entre résolution et racine carrée de la longueur de la colonne ?

- d) En admettant que les deux pics utilisés pour déterminer la résolution ont pratiquement même largeur à mi-hauteur déduire des questions précédentes une relation entre largeur à mi-hauteur d'un pic et longueur de la colonne et une relation entre efficacité théorique de la colonne et longueur de celle-ci.
- e) Les deux pics utilisés pour calculer  $R$  ont des temps de rétention respectivement égaux à 8,3 min et 9,7 min avec la colonne de longueur égale à 60 m. Calculer la largeur à mi-hauteur de ces pics (même approximation qu'à la question d), ainsi que l'efficacité théorique de la colonne pour le soluté dont le temps de rétention est de 8,3 min.
- f) Calculer l'efficacité théorique des colonnes de 15 et 30 m pour le même soluté.