

Les analyses qualitatives et quantitatives

1. Analyse qualitative

Elle sert essentiellement à l'identification des composants d'un mélange.

Le pic chromatographique est caractérisé par plusieurs dimensions :

δ : la largeur à mi hauteur (mesurée à 50% de la hauteur totale)

σ : l'écart-type du pic (qui est égal à la demi-largeur du pic à 60,6% de sa hauteur totale)

ω : largeur de la base du pic mesurée à 13,5% de la hauteur totale

Le pic étant gaussien on a $\omega = 4\sigma$

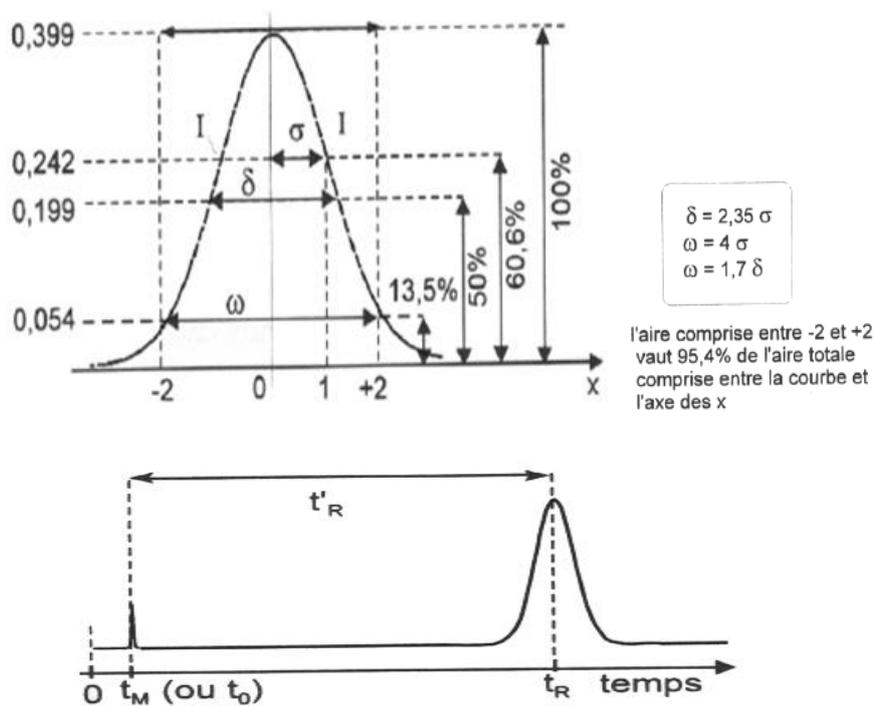


Figure 1. Caractéristiques d'un pic chromatographique

On peut également tracer les tangentes aux points d'inflexion des deux flans du pic. Le triangle formé avec la ligne de base est environ égal à 96% de l'aire totale du pic (2σ (écarts-types)). La largeur W à la base du pic est mesurée à la base du triangle.

La ligne de base correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué.

Le temps de rétention : un constituant est caractérisé par son temps de rétention t_R , temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui déterminé au maximum du pic lui correspondant sur le chromatogramme.

Le temps de rétention est indépendant

- de la quantité injectée,
- de la nature et de l'abondance des autres constituants dans le mélange.

Par contre il dépend :

- de la masse de phase stationnaire dans la colonne,
- du débit de la phase mobile,
- du volume mort du chromatographe (injecteur, détecteur, canalisations..),
- de la nature de la phase stationnaire.

Temps mort : Un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_M , appelé temps mort.

Le temps de rétention corrigé ou réduit t'_R : est obtenu par différence entre le temps de rétention réel et le temps mort. Il est lié uniquement au phénomène de rétention proprement dit.

$$t'_r = t_r - t_m$$

Le volume de rétention : le volume de rétention de chaque soluté représente le volume de la phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Ce volume 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 D est le débit alors:

$$V_r = t_r \times D$$

$$V_r = t_r \times u \cdot s \cdot \epsilon$$

u: vitesse linéaire moyenne

de la phase mobile s :

section droite de la colonne

ϵ : porosité de la phase

stationnaire

($\approx 0,75$ pour la silice poreuse)

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. Cette grandeur est exprimée par :

$$V_m = t_m \times D$$

Le volume de la phase stationnaire désigné par V_s est calculé en

retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile

La vitesse linéaire moyenne de progression du soluté v est égale à :

$$v = L/t_r$$

L : longueur de la colonne

La vitesse linéaire moyenne de la phase mobile u est égale à :

$$u = L/t_m$$

Coefficient de partage

A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K

$$K = C_s / C_m$$

Lorsque le soluté n'a aucune affinité avec la phase stationnaire, C_s est nulle, donc $K=0$.

Le soluté n'est pas retenu dans la colonne si la phase mobile est très différente du solvant d'injection, il y'a un risque de faire précipiter le soluté en tête de colonne, donc de la boucher.

Dans ce cas le soluté peut ne jamais sortir du système chromatographique. Ce qui veut dire que la C_m ne peut pas être nulle. Le coefficient de partage est fonction de trois types d'affinités :

- celle entre le soluté et la phase mobile
- celle entre le soluté et la phase stationnaire
- mais aussi celle entre les phases stationnaire et mobile.

1.2. Performances des colonnes chromatographiques.

1.2.1. Facteur de capacité

Le facteur de capacité K' est le rapport de la quantité d'un même soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = C_s / C_m \times V_s / V_m = K V_s / V_m$$

V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort K' est un paramètre très important en 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.

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. K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile. K' peut être déterminé expérimentalement par l'équation suivante :

$$K' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Le temps de rétention est ainsi lié au facteur de capacité par la relation :

$$t_R = t_M(1 + K')$$

1.2.2. Facteur de sélectivité

Le facteur de sélectivité α décrit la position de deux pics adjacents 1 et 2 situés sur un chromatogramme. Il correspond au rapport des facteurs de rétention de la colonne pour les deux composés.

Il définit si la séparation est chimiquement possible :

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

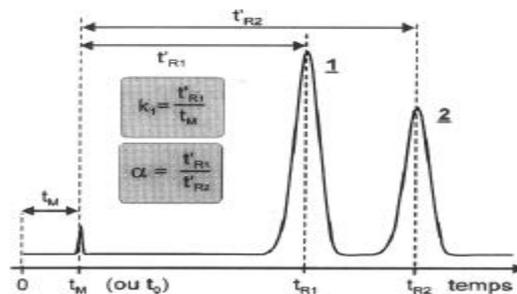


Figure 2 . Selectivite

α est toujours supérieur à 1

1.2.3 Facteur de résolution

La résolution R d'une colonne donne la mesure quantitative de son aptitude à séparer deux solutés. Elle est définie par :

$$R_s = \frac{2[(t_R)_2 - (t_R)_1]}{W_1 + W_2}$$

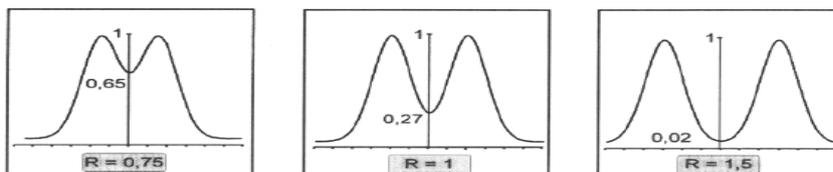


Figure 3. Facteur de Résolution

Une résolution de 1,5 permet la séparation pratiquement complète de 1 et 2.

1.2.4 Facteur de l'efficacité

L'efficacité d'une colonne chromatographique s'évalue généralement soit à partir de la HEPT soit à partir du nombre de plateaux théoriques N. Ces deux grandeurs sont liés par l'équation :

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

L'efficacité de la colonne augmente lorsque le nombre de plateaux théoriques augmente ou si H diminue à longueur L constante. Elle peut varier considérablement selon le type de colonne et la nature des deux phases.

L'efficacité d'une colonne est liée à la largeur des pics et on définit cette efficacité comme étant la variance σ par unité de longueur de colonne soit :

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

Comme H est exprimé en unité de longueur, σ et L sont exprimés en unité de longueur.

Détermination de H ou de N :

On peut déterminer la H ou N graphiquement. On démontre que

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2}$$

On mesure graphiquement t_R et W (en unité de temps). Ce qui permet de déterminer N puis H.

On peut aussi exprimer cette relation en fonction de la largeur à mi-hauteur δ . Elle devient

$$N = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2}$$

Courbe de Van Deemter

L'équation de Van Deemter permet de calculer la HEPT (hauteur équivalente en plateaux théoriques) en fonction de la vitesse de la phase mobile dans les colonnes remplies de CPG.

$$H = A + B/u + C.u$$

Avec A : la diffusion turbulente

B : la diffusion moléculaire

C : la résistance du transfert de masse

U : la vitesse moyenne de la phase mobile

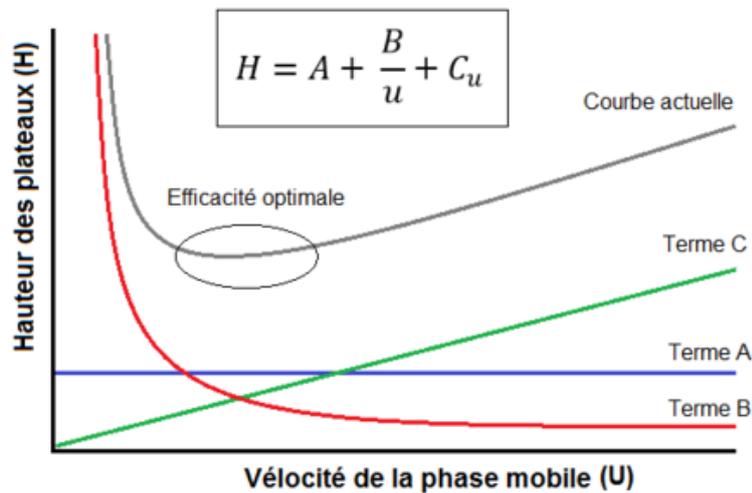


Figure 4. Courbe de Van Deemter

La courbe montre que lorsque le débit augmente, l'efficacité de la colonne. Si ce résultat apparaît comme logique, la courbe montre également que l'efficacité diminue quand le débit est trop faible.

Il existe des équations comparables pour les autres types de colonne :

L'équation de Golay pour les **colonnes capillaires de CPG** et l'équation de Knox pour les colonnes d'HPLC.

En pratique, on cherche à régler le débit de façon à avoir la meilleure séparation possible des produits dans le laps de temps le plus court. La méthode consiste à réaliser plusieurs injections. On débute avec un fort débit ne permettant pas de séparer les produits, puis on le diminue progressivement à chaque nouvelle injection.

L'efficacité est alors déterminée visuellement sur le chromatogramme mais peut-être également mise en évidence par la HEPT.

2. Optimisation d'une analyse chromatographique

La résolution et le temps d'élution 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. Les paramètres qui conditionnent R et tR sont le nombre de plateaux théoriques N, le facteur de capacité α et le facteur de sélectivité $k'B$:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right)$$

2.1 Modification de la hauteur équivalente a un plateau théorique

La résolution d'une colonne est par définition proportionnelle à la racine carrée du nombre de plateaux théoriques qu'elle contient. L'augmentation du nombre de plateaux entraîne un allongement de la durée de la séparation, sauf si cette augmentation est obtenue en réduisant H.

Les méthodes permettant de minimiser H sont la diminution

- du diamètre des particules du support
- du diamètre de la colonne
- de la température (CPG)
- de l'épaisseur du film liquide (HPLC)

On peut optimiser également la vitesse d'écoulement de la phase mobile.

2.2 Modification du facteur de capacité

La séparation peut souvent être améliorée de manière significative en modifiant le facteur de capacité k'_2 . L'augmentation de k'_2 améliore le facteur de résolution au détriment de la durée de l'élution. Pour déterminer le domaine optimale de k'_2 , on trace le graphique RS/Q en fonction de k'_2 , où Q représente les deux premiers termes de l'équation $RS = f(k'_2)$.

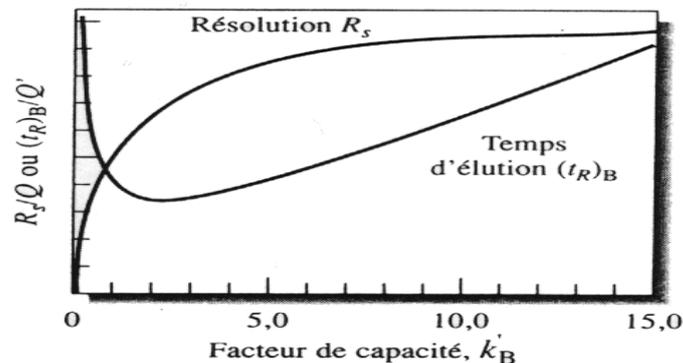


Figure 5. Optimisation d'un analyse chromatographique

On voit sur le graphique que pour :

- $k' > 10$ une faible augmentation de la résolution est observée au détriment de la durée de l'analyse
- $k' < 2$ correspond au minimum de temps pour avoir une élution

Les valeurs optimales de k' sont généralement comprises entre 2 et 10.

Le moyen le plus usuel pour améliorer la résolution est d'optimiser k' :

- pour les phases mobiles gazeuses, k' peut être contrôlé en modifiant la température.
- pour les phases liquides des changements de composition du solvant permettent souvent d'agir sur k' de manière à obtenir de meilleures séparations.

2.3 Modification du facteur de sélectivité

L'optimisation de k' et de N ne suffisent pas pour donner une bonne séparation de deux solutés en un temps raisonnable si α est proche de 1. Dans ce cas on doit chercher à augmenter α tout en maintenant k' entre 1 et 10. Plusieurs options sont possibles, on peut :

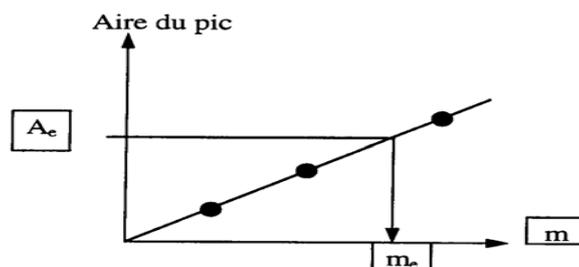
- modifier la phase mobile
- modifier la température de la colonne
- modifier la composition de la phase stationnaire
- utiliser des effets chimiques spéciaux.

Une augmentation de température entraîne également une augmentation de k' mais elle a peu d'effet sur la valeur de α en chromatographie liquide-liquide ou liquide-solide. Par contre la température a une influence sur l'échange d'ions et sera un paramètre à optimiser.

3. Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

3.1 Méthode de l'étalonnage externe :



Il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante du produit afin de faire une courbe d'étalonnage $Aire = f(\text{masse ou concentration du produit})$, pour un volume injecté constant V . L'injection ultérieure du même volume V de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la masse ou la concentration recherchée. Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire qu'une mesure avec l'étalon et à utiliser une règle de trois :

$$A_e/M_e = A_{et}/m_{et}$$

A: Aire des pics

e : échantillon

et : étalon

m : masse du produit remplaçable par la concentration

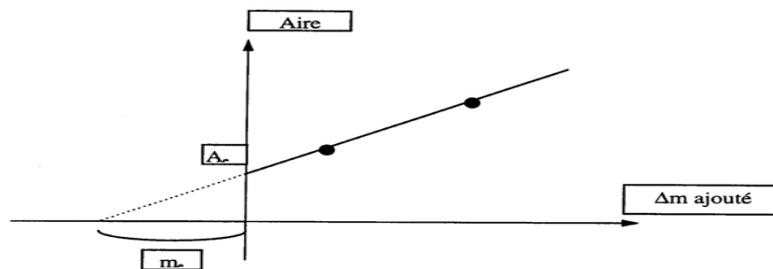
3.2 Méthode des ajouts :

Comme la précédente, cette méthode nécessite de posséder le produit à analyser pur; après avoir analysé l'échantillon, on ajoute à celui-ci des quantités connues Δm du produit avant de le chromatographier à nouveau (faire au minimum deux ajouts), ce qui entraîne une variation de l'aire du pic ΔA .

Si m est la masse contenue dans l'échantillon à analyser,

$$(\Delta A/\Delta m) = a/m \text{ soit } m = A * (\Delta m/\Delta A)$$

Si le produit ajouté est en solution, il faut tenir compte des effets de dilution.



3.3 Méthode de l'étalon interne (utilisée essentiellement en CPG) :

On compare la réponse du ou des produits à analyser à celle d'un étalon interne, donc introduit dans le mélange à doser et convenablement choisi.

Une solution étalon est préparée avec le ou les produits que l'on veut doser. Les masses sont connues $m'1$, $m'2$, et ... $m'e$ pur l'étalon ; à ces masses correspondent les aires $A'1$, $A'2$, ..., $A'e$, sur le chromatogramme.

Dans l'échantillon contenant les masses $m1$, $m2$, ... de solutés on ajoute $m'e$ de l'étalon, ce qui donne les aires $A1$, $A2$, Ae .

On obtient :

$$m'1 = \alpha1 A'1$$

$$m'2 = \alpha2 A'2$$

$$m'e = \alpha e A'e$$

avec α coefficient de proportionnalité

$$\text{et } k1 = (\alpha1/\alpha e) = (m'1 A'e / m'e A'1)$$

d'où la valeur k_1 puisque toutes les données sont connues.

Dans l'échantillon inconnu on aura :

$$m_1 = \alpha_1 A_1$$

$$m_e = \alpha_e A_e$$

$$(m_1/m_e) = (\alpha_1 A_1/\alpha_e A_e) = k_1(A_1/A_e)$$

m_e , k_1 , A_1 , A_e sont connus.