

## Chapitre 3

# MISE AU POINT D'UNE SEPARATION EN CLHP

Dans ce chapitre nous allons décrire simplement la démarche du chromatographe cherchant à mettre au point une séparation et les principes de son optimisation.

Nous nous limiterons au cas le plus courant de la séparation en chromatographie de partage avec un éluant aqueux et au cas de composés présentant des interactions hydrophobes.

La très grande majorité des applications analytiques de la chromatographie sont à classer dans cette catégorie.

Le modèle théorique utilisé sera la relation d'Everet qui n'est utilisable strictement que dans ce cas de figure.

Des démarches similaires pourront être suivies dans les autres cas mais de manière essentiellement qualitative....

La mise au point d'une séparation consiste à déterminer les meilleures conditions expérimentales qui permettent l'analyse quantitative d'un mélange donné dans un temps le plus court possible..

Pour l'utilisateur de base, cette phase est souvent "inutile" en effet les analyses courantes ont déjà été optimisées et décrites avec précision. Il suffit donc dans la plupart des cas de simplement les appliquer.

La chromatographie est une science avant tout expérimentale dans laquelle l'expérience de l'opérateur joue un grand rôle.

Nous allons néanmoins essayer de décrire simplement mais sans trop de développements les points principaux de la démarche à suivre pour mettre au point une séparation utilisable pour un dosage quantitatif.

Nous nous limiterons pour l'instant à la C.L.H.P qui reste de loin la méthode la plus utilisée...

Environ 80 % des analyses chromatographiques concernent des substances de faible masse molaire et impliquent des interactions de type hydrophobiques dont nous avons parlé lors du premier chapitre de ce cours.

**C'est donc essentiellement à ce type de chromatographie de partage que nous allons nous intéresser dans un premier temps.**

La première démarche consiste à choisir le type de phase stationnaire à utiliser.

Si les composés à analyser sont apolaires et donc très peu ou pas solubles dans l'eau, on devra pratiquement utiliser de façon presque obligatoire un solvant organique lui-même apolaire tel que l'hexane par exemple. Nous serons donc orientés vers une chromatographie en phase normale.

Soit simple chromatographie d'adsorption (silice normale).

Soit chromatographie de partage en phase normale avec une silice greffée polaire

- Amine  $\text{NH}_2$

- Nitrile :  $\text{CN}$

- Diols :  $\text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$

La phase stationnaire est très polaire, les substances sont alors éluées en sens inverse de leur polarité propre. Les composants peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement les solutés polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement.

Si les composés à analyser présentent une certaine polarité et sont solubles dans l'eau on dans mélanges eau/solvant organique c'est vers une chromatographie en phase inverse que nous nous dirigerons.

Ce cas est de très loin le cas le plus fréquemment rencontré en analyse de routine

La phase stationnaire est peu polaire ou apolaire (la phase mobile est alors généralement polaire), les substances sont alors élués dans le sens de leur polarité propre.

Les composants polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement.

Inversement les solutés peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement.

### Principaux greffons utilisés en phase inverse :

Il s'agit de greffons comportant des fonctions de nature apolaire :

C<sub>2</sub> : Diméthylsilylile :

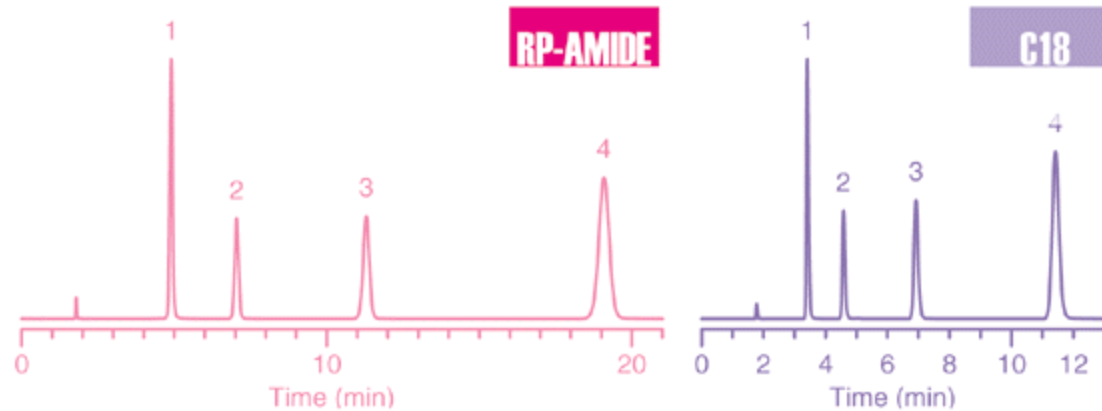
C<sub>8</sub> : Octylsilylile

C<sub>18</sub> : Octadécylsilylile

φ : phénylsilylile

Le choix définitif de la colonne à utiliser se fait souvent par des essais d'optimisation en fin de la phase de mise au point. On commence par utiliser une colonne courante souvent une C18. Les temps de rétentions des divers composés seront légèrement différents selon la nature de la phase stationnaire utilisée. Nous supposons pour l'instant que la nature de la phase mobile reste identique.

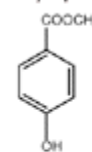
Voici un exemple des modifications observables pour 4 molécules proches et trois colonnes.



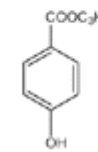
#### Analyte Data

1. Methyl paraben
2. Ethyl paraben
3. Propyl paraben
4. Butyl paraben

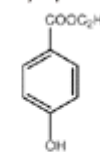
Methyl paraben



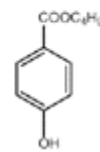
Propyl paraben



Ethyl paraben



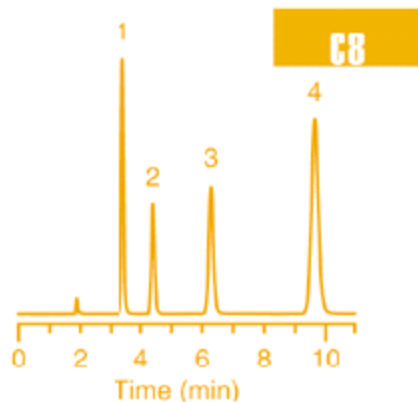
Butyl paraben



Ici c'est la nature de la chaîne carbonée qui varie et on observe l'ordre d'élution prévisible par les interactions hydrophobes, plus la chaîne est longue et plus les composés sont retenus.

On constate logiquement que les temps de rétentions sont légèrement plus importants pour la C18 que pour la C8 (phase inverse).

Les temps de rétentions nettement plus élevés pour la colonne RP amide (phase normale) s'expliquent par la possibilité de formation de liaisons hydrogène entre la fonction amide et la fonction phénol.



Conditions Column: **15cm X 4.6mm conditions for RP-Amide C16, C18, and C8**

Mobile Phase: acetonitrile/water, (40:60)

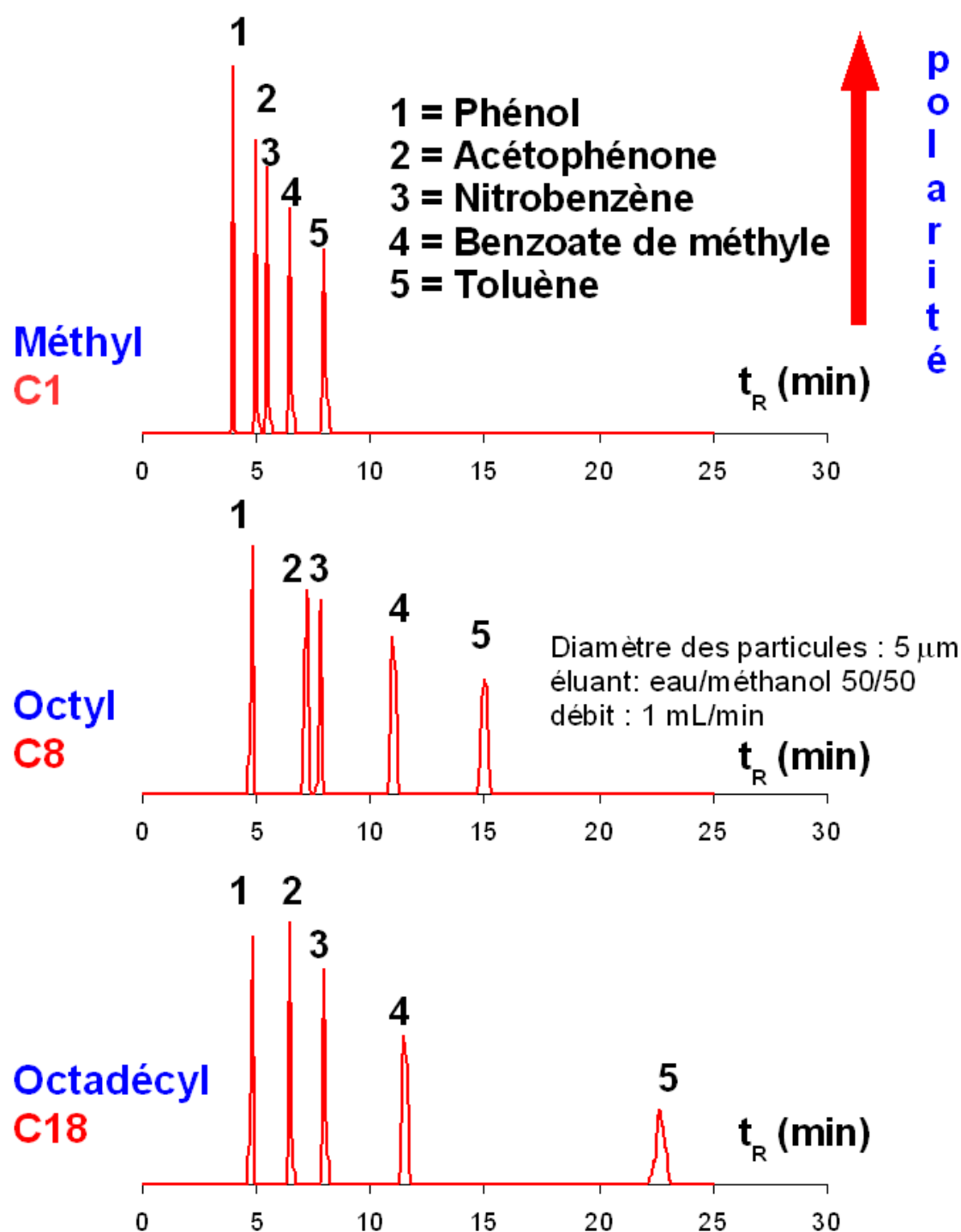
Flow Rate: 1mL/min

Temp: 20°C

Det: UV, 254nm

Inj: 10µL

## Autre exemple



**Influence de la nature de la phase stationnaire**

## Choix de la phase mobile

De très nombreux solvants sont utilisés en chromatographie générale, soit sur colonne ouverte, soit en chromatographie sur couche mince dont nous reparlerons plus tard.

En C.L.H.P ce sont principalement le méthanol et l'acétonitrile qui seront utilisés.

Les solvants utilisés en H.P.L.C doivent être très purs, on utilise des solvants normalisés « pour chromatographie HPLC »

C'est la polarité du solvant qui est sa caractéristique principale au point de vue purement chromatographique, mais d'autres propriétés interviennent telles que la viscosité, la température d'ébullition, l'indice de réfraction et les propriétés spectrales des solvants.

Il faudra en effet que des contraintes physiques liées à ces propriétés soient satisfaites pour que l'analyse soit réalisable en pratique.

Les contraintes principales sont les pressions limites (viscosité), les risques particuliers (inflammabilité etc) et les contraintes liées à la détection:

- \*indices de réfraction

- \*longueur d'onde de coupure UV ou "cut-off" est celle à partir de laquelle l'absorbance du solvant est tellement élevée que l'on ne peut plus l'utiliser en détection U.V car il devient opaque.

Enfin les solvants mélangés doivent être miscibles entre eux en toutes proportions.





Remarque : Nous supposons que les interactions hydrophobes interviennent de manière prépondérante dans le processus chromatographique choisi.

Si les interactions hydrophobes interviennent il existera une relation directe entre la teneur en solvant organique et le facteur de rétention  $k$ .

C'est la relation d'Everet donc avons parlé lors du premier chapitre.

$$\log k = a \log x + b$$

$x$  est la teneur volumique en solvant organique de la phase mobile

$x = 0,5$  pour 50% ;  $x = 0,25$  pour 25% etc...

Les termes  $a$  et  $b$  sont des constantes qui dépendent essentiellement de la nature du soluté et dans une moindre mesure de la nature du solvant organique.

Les trois solvants organiques les plus largement utilisés sont le méthanol, l'acétonitrile et beaucoup moins fréquemment le tétrahydrofurane

Les plages de variation des paramètres a et b sont les suivantes pour des composés ordinaires et des phases stationnaires habituelles (CN; Diol, C18) et solvant eau/méthanol ou eau/acétonitrile: **-3 < a < -0,5** et **-1,5 < b < 0**

Voici à titre d'exemple les valeurs de a et b pour une colonne CN et un éluant eau/méthanol d'après T.J. Janjic (*J.Serb.Chem.Soc* **66(10)671-683(2001)**).

	Pente a	Ordonnée b		Pente a	Ordonnée b
Chlorobenzene	-2,253	-0,7682	Acetophenone	-1,4607	-0,6556
2-chlorophénol	-1,9419	-0,8542	Acétanilide	-1,4124	-0,739
p-crésol	-1,8689	-0,858	Phénol	-1,6162	-0,8152
Nitrobenzene	-1,7947	-0,6251	Benzonitrile	-1,539	-0,647
Anisole	-1,7348	-0,6574	2-phenyléthanol	-1,617	-0,788
Alcool benzylique	-1,4021	-0,7769	Benzaldéhyde	-1,3789	-0,705
Benzamide	-1,1072	-0,7365	2-Hexanone	-0,9733	-0,5465

Autres exemples : Pour une colonne C18 et éluant eau/acétonitrile (détermination "personnelle" voir travaux pratiques)

Composé	Pente a	Ordonnée b
Acide P.H.B	-1,98	-1,3
Acide vanillique	-2,02	-1,24
Aldéhyde P.H.B	-1,6	-0,72
Vanilline	-1,85	-0,79

## Cas des espèces ionisables :

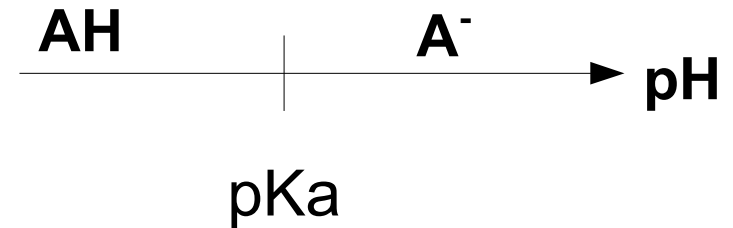
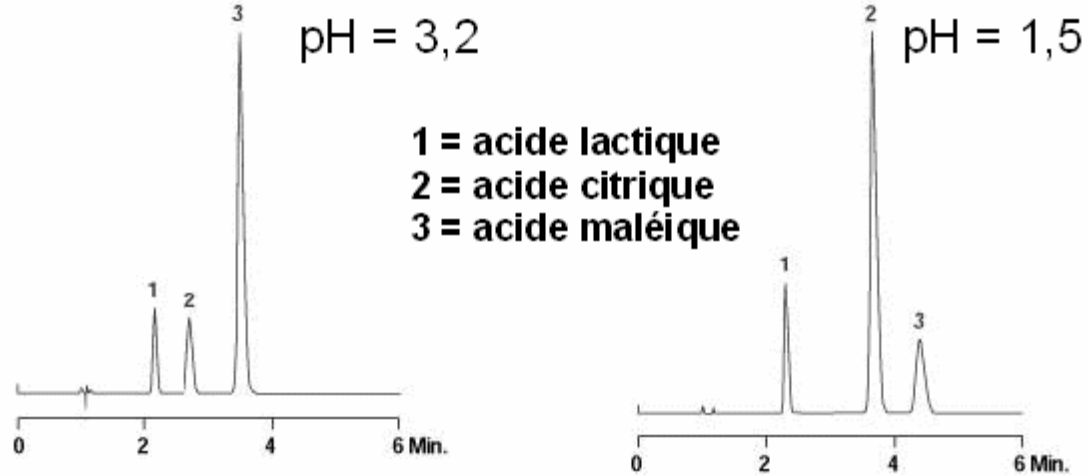
Dans le cas où des substances ionisables sont présentes (acide ou bases faibles) on a tout intérêt à contrôler le pH de la phase mobile. En effet selon le pH du milieu l'espèce sera présente sous forme moléculaire neutre ou sous forme ionique voire si on est à un pH proche du pKa du couple sous les deux formes en proportions similaires.

On pourrait imaginer à la limite que chaque espèce donne son propre pic avec des temps de rétention différents. En fait les deux espèces sont en équilibres rapides et on n'observe qu'un seul pic "moyen" mais le temps de rétention va varier avec le pH de la phase mobile.

L'espèce ionique présente une plus grande affinité avec la phase polaire et l'espèce neutre une plus grande affinité pour la phase apolaire.

Si la phase mobile est polaire et particulièrement si elle est aqueuse les temps de rétention seront sensiblement diminués quand l'espèce ionique sera présente en grande quantité, inversement les temps de rétention seront élevés si l'espèce neutre est majoritaire.

Les facteurs de rétention varieront donc sensiblement avec le pH la détermination des constantes  $a$  et  $b$  devra donc se faire à pH strictement contrôlé si on veut obtenir des résultats reproductibles et de bonnes corrélations entre  $\log k$  et  $\log x$



La phase mobile est purement aqueuse seul son pH est différent.  
La colonne utilisée est la même.

Exemple : Les chromatogrammes concernent la séparation de trois acides faibles avec la même colonne mais des phases mobile 100% aqueuse de pH différents.

Plus le pH est faible et plus l'espèce neutre AH est présente en grande quantité cela se traduit par une augmentation sensible des temps de rétention

Inversement plus le pH est élevé et plus l'espèce ionique A<sup>-</sup> est présente ce qui diminue les temps de rétention.

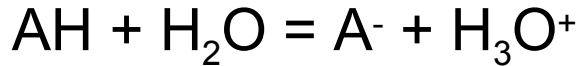
Si la forme ionique est trop largement majoritaire le composé ne sera pas du tout retenu par la colonne et sortira au temps mort de celle-ci, il n'y aura pas de séparation possible.

Pour éviter ce type de problèmes on peut utiliser deux techniques différentes.

## Suppression des ions par contrôle du pH :

On se place à un pH tel que la forme ionisée soit inexistante.

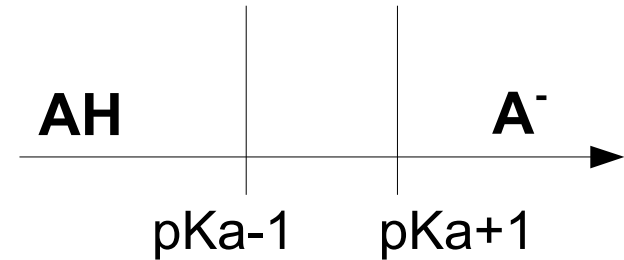
**Exemple 1** : Cas d'un acide faible AH :



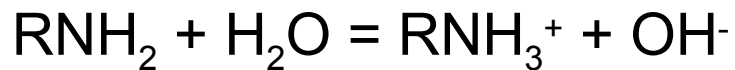
AH : forme moléculaire neutre non gênante

A<sup>-</sup> : forme ionique qu'on désire supprimer

Si  $\text{pH} < \text{pKa} - 1$  l'acide faible sera seul présent en solution la forme ionique étant négligeable.



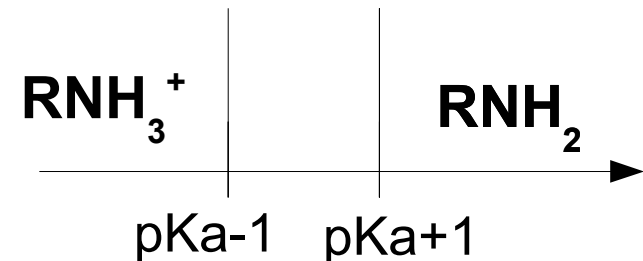
**Exemple 2** : Cas d'une base faible RNH<sub>2</sub> :



RNH<sub>2</sub> : forme moléculaire neutre non gênante

RNH<sub>3</sub><sup>+</sup> : forme ionique qu'on désire supprimer

Si  $\text{pH} > \text{pKa} + 1$  la base faible RNH<sub>2</sub> sera seule présente en solution la forme ionique RNH<sub>3</sub><sup>+</sup> étant négligeable.



## Chromatographie des paires d'ions :

On introduit dans le milieu un contre-ion de charge opposé à l'ion gênant, il se forme une paire d'ion qui va se partager entre les phases mobiles et stationnaire comme un composé non chargé ordinaire.

Le contre ion est choisi de manière à obtenir une espèce hydrophobe car on travaille généralement en phase inverse. On utilise donc une phase mobile constituée d'eau et d'un solvant organique méthanol ou acétonitrile.

Pour « neutraliser » un anion on utilise généralement un contre ion ammonium quaternaire  $N(C_4H_9)_4^+$

Pour « neutraliser » un cation on utilise généralement un contre ion de type sulfonate :  $C_8H_{17}SO_3^-$  ;  $C_{12}H_{25}SO_3^-$  ou docécylsulfate  $CH_3-(CH_2)_{11}-O-SO_3^-$ .

Remarque : ces contre ions sont issus de couples acido-basiques considérés comme forts et existent donc sous cette forme quelque soit le pH.

La variation de la teneur en solvant organique de l'éluant va modifier considérablement les chromatogrammes obtenus et va permettre d'optimiser la séparation.

Nous étudierons plus loin l'aspect théorique mais nous pouvons dès à présent visualiser cet effet en utilisant une version modifiée du simulateur de chromatogramme que nous avons précédemment réalisé.

Il suffira de modifier les formules de calcul des paramètres caractéristiques des pics des deux composés, selon le modèle suivant :

### **Caractéristiques du pic du Composé A :**

Facteur de rétention :  $k_{retA} = 10^{(aA \cdot \log(x_{org}/100) + bA)}$

Constante de partition :  $K_{eqA} = k_{retA} \cdot V_{mort} / V_{stat}$

Volume d'élution en mL :  $V_{RA} = V_{mort} + K_{eqA} \cdot V_{stat}$

temps de rétention en min :  $t_{RA} = V_{RA} / \text{débit}$

Ecart type du pic :  $\sigma_A = t_{RA} / N_{reel}$

Temps de rétention réduit :  $t_{RAred} = t_{RA} - t_{mort}$

Efficacité réelle :  $N_{effA} = t_{RAred}^2 / \sigma_A^2$

Nous ne développerons pas ici toutes les modifications à faire, vous les trouverez décrites en détail dans l'article suivant.

## **Article : Simulation des effets de solvant**

Cette version simple vous permettra de faire varier la composition de l'éluant et de visualiser l'effet sur le chromatogramme.

Vous devrez fixer les paramètres physiques habituels et choisir également les paramètres d'Everet a et b pour deux composés

## **Activité N°13 : Simulation simple de l'effet de solvant**

En utilisant ce simulateur vous constaterz visuellement les points suivants :

**Une augmentation de la teneur en solvant organique diminue sensiblement les temps de rétention, mais souvent au détriment de la résolution.**

**On observe souvent une inversion de l'ordre d'élution des composés  
Pour une certaine composition du solvant les deux pics sont confondus.  
La résolution et la sélectivité sont alors nulles.**

**De part et d'autre de cette composition particulière les pics sortent dans un ordre inversé et Sélectivité et Résolution augmentent quand on s'éloigne de cette composition particulière.**

**Remarque : Les effets décrits ne sont pas systématiques, ce sont les valeurs de paramètres d'Everet des deux composés qui en sont l'origine, nous allons étudier cela plus en détail...**



**x = 20 %**

$t_{R,A} = 10,75 \text{ min}$

$t_{R,B} = 17,42 \text{ min}$

$\alpha = 1,82$

$R = 8,67$

**A B**



**x = 50 %**

$t_{R,A} = 4,64 \text{ min}$  **B A**

$t_{R,B} = 4,34 \text{ min}$

$\alpha = 1,18$

$R = 1,23$



**x = 30 %**

$t_{R,A} = 7,01 \text{ min}$

$t_{R,B} = 8,33 \text{ min}$

$\alpha = 1,30$

$R = 3,15$

**A B**



**x = 70 %** **B A**

$t_{R,A} = 3,83 \text{ min}$

$t_{R,B} = 3,40 \text{ min}$

$\alpha = 1,55$

$R = 2,19$



**x = 40 %**

$t_{R,A} = 5,45 \text{ min}$

$t_{R,B} = 5,52 \text{ min}$

$\alpha = 1,02$

$R = 0,23$



**x = 100 %** **B A**

$t_{R,A} = 3,32 \text{ min}$

$t_{R,B} = 2,95 \text{ min}$

$\alpha = 2,09$

$R = 2,14$



## Exemple d'évolution

$$a_A = -1,52$$

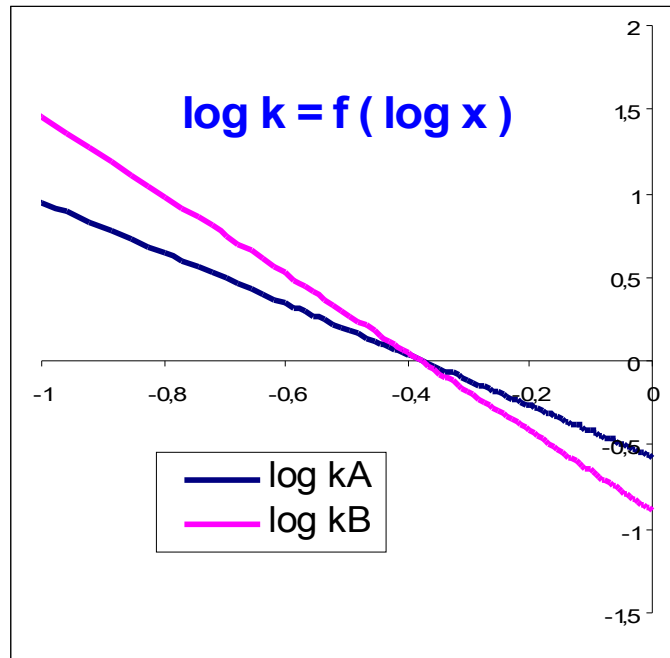
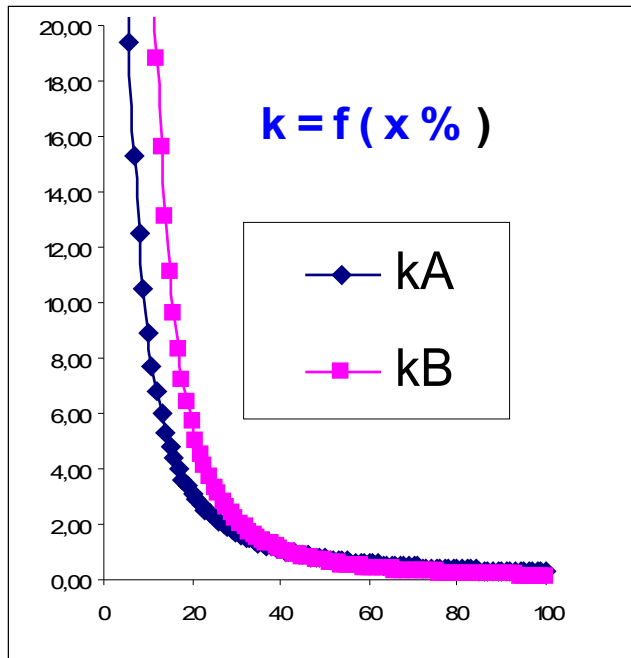
$$b_A = -0,57$$

$$a_B = -2,35$$

$$b_B = -0,89$$

On observe souvent une inversion des temps de rétention

**CHROMATOGRAMMES**



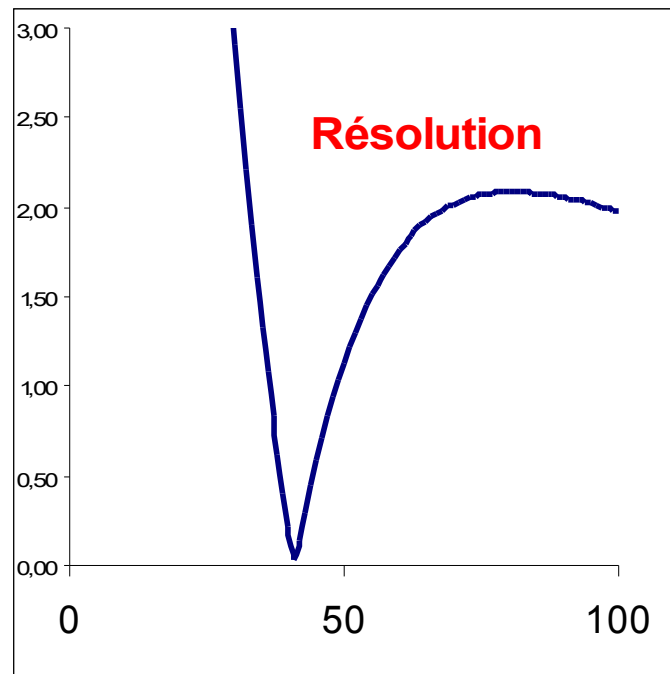
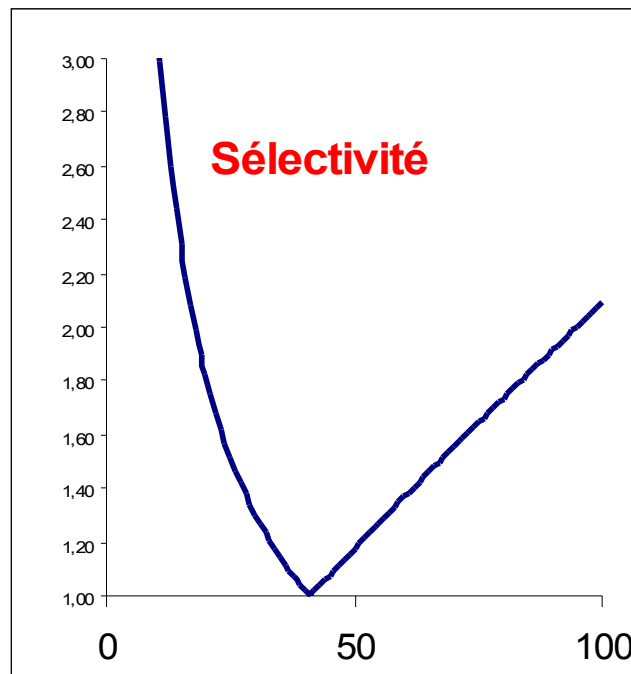
## Exemple d'évolution

$$a_A = -1,52$$

$$b_A = -0,57$$

$$a_B = -2,35$$

$$b_B = -0,89$$



Résolution et sélectivité passent par un minimum

Paramètres principaux

Nous allons maintenant étudier de façon théorique l'effet de la teneur en solvant organique sur les paramètres principaux de la chromatographie,

N : efficacité de la colonne,

$\alpha$  : sélectivité de la séparation

R : résolution du chromatogramme.

L'efficacité N de la colonne, par définition ne dépend pas du solvant utilisé et sera donc constante, en revanche la sélectivité et la résolution seront fortement modifiées par une variation de composition de l'éluant.

Les paramètres de départ se divisent en deux catégories :

Paramètres "physiques" : Porosité, longueur et diamètre interne de la colonne, diamètre des particules de phase stationnaire, débit de l'éluant. Ces paramètres "physiques" n'affectent que l'efficacité de la colonne.

Paramètres "chimiques" : nature de la phase stationnaire et de la phase mobile. Ces paramètres chimiques n'affectent pas l'efficacité de la colonne mais agissent sur l'équilibre de partition et donc sur les facteurs de rétention et la sélectivité.

Le paramètre le plus important, la résolution R est affectée à la fois par les paramètres "physiques" et les paramètres "chimiques".

Rappelons la relation de Purnell qui relie R à N,  $\alpha$  et  $k_2$  :

$$R_{\text{Purnell}} = \frac{1}{4} N^{0,5} \left[ \frac{1 - \alpha}{\alpha} \right] \left[ \frac{k_2}{1+k_2} \right]$$

## Variation des facteurs de rétention k1 et k2 :

$$\log k = a \log x + b \text{ et } k = 10^{(a \log x + b)}$$

Il sera intéressant de représenter graphiquement les variations de k et log k avec x.

Selon les valeurs de a1, b1, a2 et b2, plusieurs cas de figure sont possibles :

On pose  $\Delta a = a1 - a2$  et  $\Delta b = b1 - b2$

➤ Si  $a1 = a2$  et  $\Delta a = 0$ , les deux droites  $\log k = f(\log x)$  sont parallèles, les valeurs de k1 et k2 seront toujours différentes et le phénomène d'inversion des pics ne pourra se produire.

➤ Si a1 et a2 sont différents les deux droites se couperont et le phénomène d'inversion des pics se produira pour une certaine teneur x1 en solvant organique.

Au point d'intersection, les deux facteurs de rétention k1 et k2 sont égaux et les deux pics sont confondus ce qui correspond à  $\alpha = 1$  et  $R = 0$ , pour cette composition du solvant la résolution est nulle. et donc minimale, c'est pourquoi nous la désignerons sous l'appellation  $x_{\text{mini}}$  :

## Détermination de $x_{\text{mini}}$

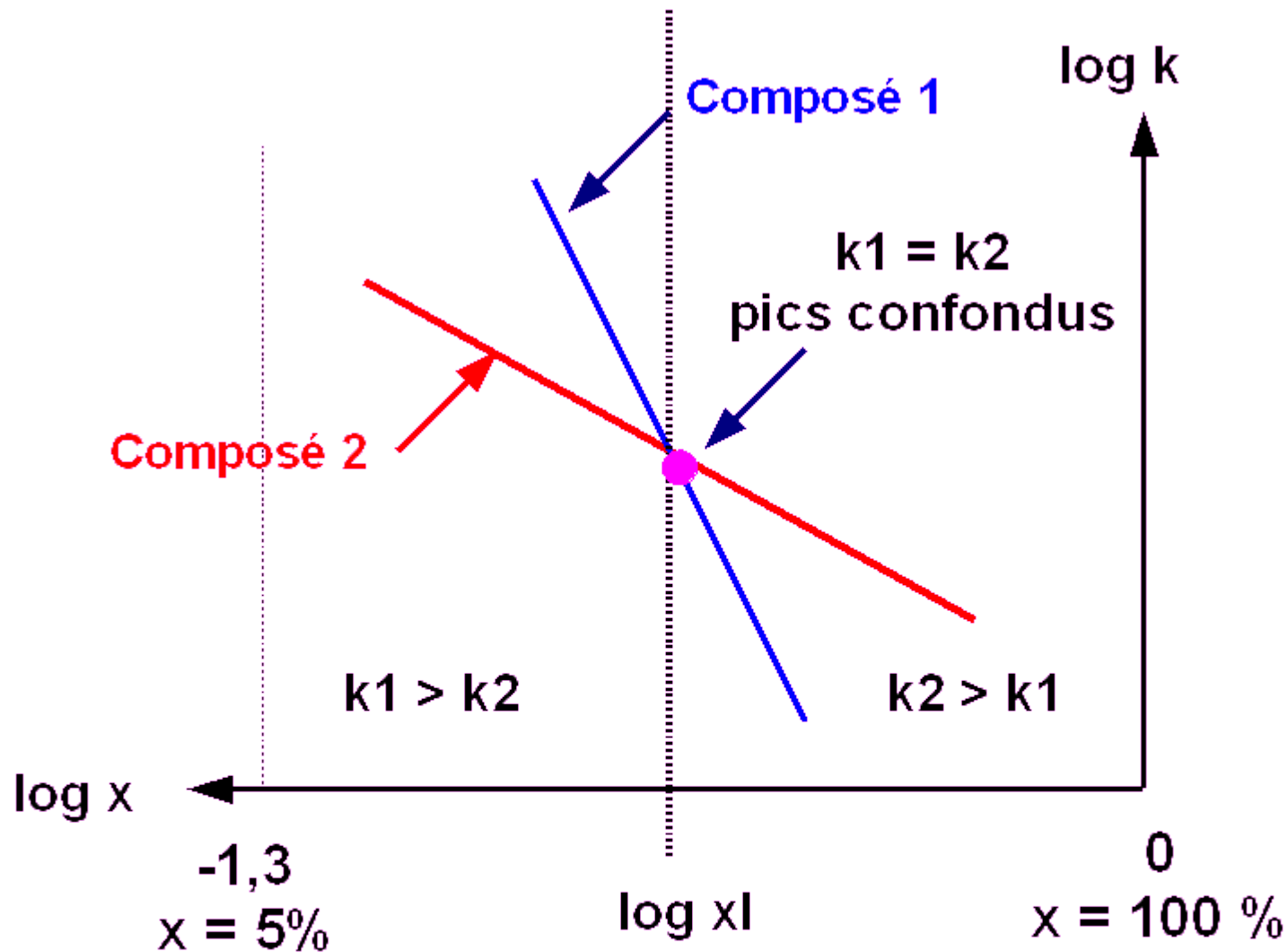
$$a_1 \log x_{\text{mini}} + b_1 = a_2 \log x_{\text{mini}} + b_2$$

$$(a_1 - a_2) \log x_{\text{mini}} = b_2 - b_1$$

$$\log x_{\text{mini}} = (b_2 - b_1) / (a_1 - a_2) = - \Delta b / \Delta a$$

$$x_{\text{mini}} = 10^{-\Delta b / \Delta a}$$

- Si  $\Delta b$  et  $\Delta a$  sont de même signe alors  $\log x_{\text{mini}}$  sera négatif et  $x_{\text{mini}}$  sera inférieur à 1, le phénomène d'inversion des pics sera observable.
- Si  $\Delta b$  et  $\Delta a$  sont de même différents alors  $\log x_{\text{mini}}$  sera positif et  $x_{\text{mini}}$  sera supérieur à 1, le phénomène d'inversion des pics ne sera pas observable pratiquement, puisqu'il se produirait pour une teneur en solvant organique supérieure à 100%.
- Si  $\Delta b = 0$ ,  $\log x_{\text{mini}} = 0$ ,  $x_{\text{mini}} = 1$ , les deux pics sont confondus pour  $x = 100\%$ , le phénomène d'inversion des pics ne sera pas observable pratiquement.



**Phénomène d'inversion des pics  
si  $\Delta b$  et  $\Delta a$  sont de signes différents**

## Variation de la sélectivité $\alpha$ :

Si le phénomène d'inversion est observable (  $x_{\text{mini}} < 1$  ) la sélectivité sera minimale et égale à l'unité (  $\alpha = k_2 / k_1 = 1$  ) pour  $x = x_{\text{mini}}$

## Variation de la résolution R :

La résolution R est le paramètre le plus important en chromatographie, on considère que la séparation est correcte et utilisable pour un dosage quantitatif si  $R > 1,5$ .

On devra donc trouver la composition du solvant optimale qui conduira à une résolution supérieure à  $R = 1,5$  avec un temps d'analyse le plus court possible, c'est le principe même de l'optimisation de la séparation chromatographique.

La résolution R est définie mathématiquement par :

$$R = \frac{1}{2} ( t_{R2} - t_{R1} ) / ( \sigma_1 + \sigma_2 ) \text{ avec } t_{R2} > t_{R1}$$

On considère pour simplifier que l'efficacité est la même pour les deux composés, dans ces conditions on peut écrire plus simplement :

$$R = \text{ABS} ( \frac{1}{2} * N_{\text{vrai}}^{0,5} * ( t_{R1} - t_{R2} ) / ( t_{R1} + t_{R2} ) )$$

Remarque : L'utilisation de la valeur absolue prend en compte une éventuelle inversion de deux pics.

Exprimons cette résolution en fonction de x

On sait que :  $k = (t_R - t_M) / t_M$

soit  $t_R = t_M + k t_M = t_M (1+k)$

$t_{R1} - t_{R2} = t_M + k_1 t_M - t_M - k_2 t_M = t_M (k_1 - k_2)$

$t_{R1} + t_{R2} = t_M + k_1 t_M + t_M + k_2 t_M = t_M (2 + k_1 + k_2)$

$R = \text{ABS} [ 1/2 * N^{0,5} * t_M (k_1 - k_2) / t_M (2 + k_1 + k_2) ]$

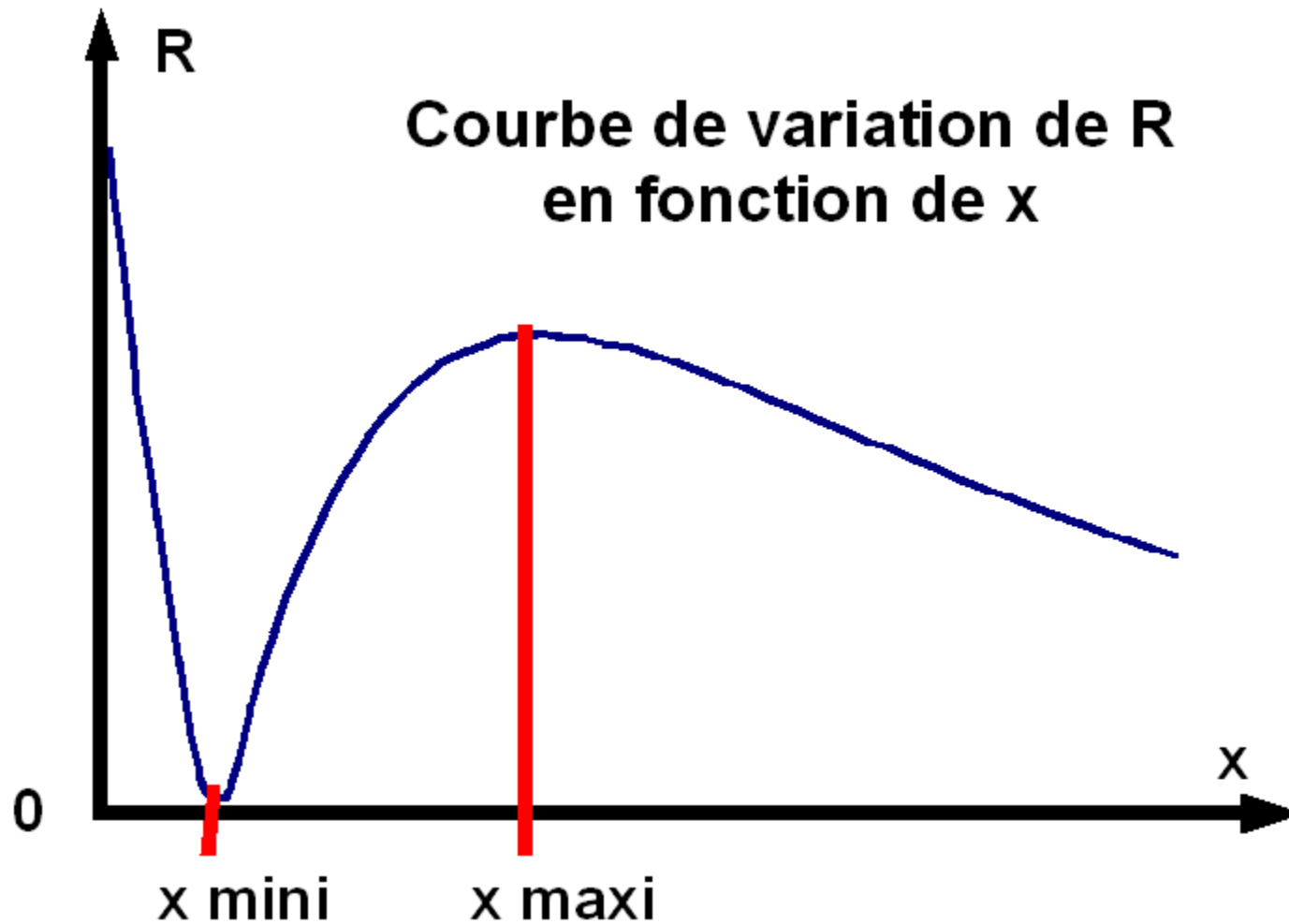
$$R = \text{ABS} [ 1/2 * N^{0,5} * (k_1 - k_2) / (2 + k_1 + k_2) ]$$

On sait exprimer  $k_1$  et  $k_2$  en fonction de x et on peut donc exprimer  $R = f(x)$ .

On peut donc tracer facilement la courbe de variation de la résolution en fonction de la teneur en solvant x.



On obtient toujours une courbe dont la forme est la suivante :



La position relative des extrema  $x_{\text{mini}}$  et  $x_{\text{maxi}}$  sont fonctions des paramètres  $a_1$ ,  $b_1$ ,  $a_2$  et  $b_2$  des deux composés à séparer.

## Position du minimum de la courbe $x_{\text{mini}}$ :

La résolution minimale correspond évidemment à la superposition des deux pics pour laquelle  $k_1 = k_2$  ;  $\alpha = 1$  et  $R = 0$

Nous avons déjà déterminé sa position :  $x_{\text{mini}} = 10^{-\Delta b / \Delta a}$

## Position du maximum de la courbe $x_{\text{maxi}}$ :

Pour déterminer la position de ce point nous allons dériver la fonction  $R = f(x)$ .

$$R = \text{ABS} \left[ \frac{1}{2} * N_{\text{vrai}}^{0,5} * (k_1 - k_2) / (2 + k_1 + k_2) \right]$$

Pour simplifier cette expression nous allons supprimer la valeur absolue qui n'est là en fait que pour rendre  $R$  positif en cas d'inversion des pics, pour situer le maximum elle n'interviendra pas, on pourrait la garder pour pouvoir déterminer le minimum de la courbe mais cela est inutile puisque nous connaissons déjà ce résultat.

$$R = \frac{1}{2} * N_{\text{vrai}}^{0,5} * (k_1 - k_2) / (2 + k_1 + k_2)$$

Le premier terme  $\frac{1}{2} * N_{\text{vrai}}^{0,5}$  ne dépend pas de  $x$  et nous pouvons donc l'éliminer.

Nous devons donc dériver la fonction :  $g(x) = (k_1(x) - k_2(x)) / (2 + k_1(x) + k_2(x))$

avec  $k_1(x) = 10^{(a_1 * \log(x) + b_1)}$  et  $k_2(x) = 10^{(a_2 * \log(x) + b_2)}$

Nous ne développerons pas ici la résolution exacte du problème, elle est donnée dans l'[article](#). Seule une résolution de type numérique est possible.

Une résolution approximative est en revanche obtenue simplement.

### Résolution simplifiée :

On peut simplifier quelque peu le problème en faisant une approximation sur la valeur de la fonction  $s(x) = 2 + k_1(x) + k_2(x)$ . Si on est en solvant à forte teneur en solvant organique, les composés hydrophobes n'auront pas une grande affinité avec la phase stationnaire, les facteurs de rétention seront très petits et on pourra simplifier  $s(x)$  en  $s(x) = 2$ , les termes  $k_1$  et  $k_2$  étant négligeable devant 2.

Résolution approchée pour de fortes teneurs en solvant organique :

$$\text{Posons : } d(x) = k_1(x) - k_2(x) = 10^{b_1} x^{a_1} - 10^{b_2} x^{a_2}$$

$$\text{Dérivons : } d'(x) = a_1 10^{b_1} x^{a_1-1} - a_2 10^{b_2} x^{a_2-1}$$

$$\text{Posons } s(x) = 2 + k_1(x) + k_2(x) = 2$$

$$\text{Dérivons : } s'(x) = 0$$

$$g'(x) = d'(x) \cdot s(x) - s'(x) \cdot d(x) / (d(x))^2$$

$$g'(x) = d'(x) \cdot 2 / 4 = d'(x) / 2$$

Nous devons pour trouver le maximum de la courbe déterminer la valeur de  $x$  pour laquelle cette fonction  $g'(x)$  est nulle.

Il nous suffit donc de résoudre l'équation  $d'(x) = 0$

$$\text{soit } a_1 10^{b_1} x^{a_1-1} - a_2 10^{b_2} x^{a_2-1} = 0$$

$$a_1 10^{b_1} x^{a_1-1} = a_2 10^{b_2} x^{a_2-1}$$

$$a_1 10^{b_1} / a_2 10^{b_2} = x^{a_2-1} / x^{a_1-1}$$

$$a_1 / a_2 10^{b_1 - b_2} = x^{a_2 - a_1}$$

$$a_1 / a_2 10^{\Delta b} = x^{-\Delta a}$$

$$\log(a_1 / a_2) + \Delta b = -\Delta a * \log x$$

$$\log x = - ( \log (a_1 / a_2) + \Delta b ) / \Delta a$$

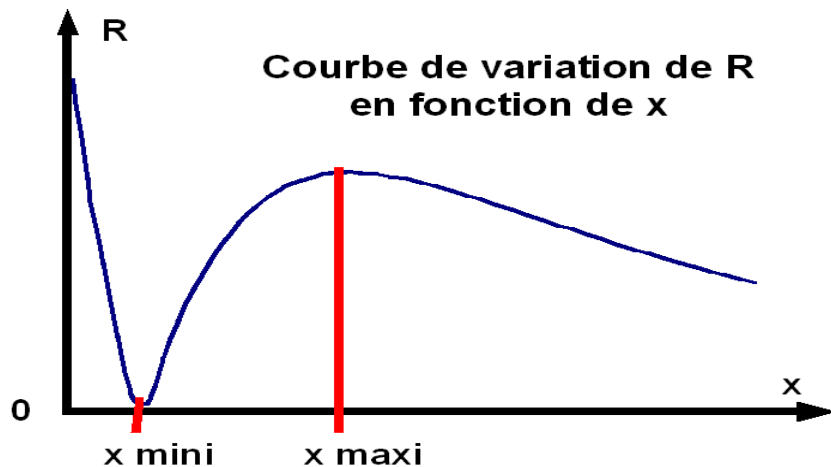
**Valeur approchée de  $x_{\text{maxi}}$**

$$x_{\text{maxi}} = 10^{- ( \log ( a_1 / a_2 ) + \Delta b ) / \Delta a}$$

La valeur approximative obtenue par cette méthode servira de point de départ pour la résolution exacte par une méthode numérique.

Pour des teneurs en solvant organique faibles, aucune approximation simple n'est possible, mais cela n'est pas gênant puisque le maximum sera visible directement, seuls les cas extrêmes pour lesquels ce maxima sera trop proche de  $x=0$  ne pourront être décelés mais ces cas ne sont de toute manière pas exploitables en pratiques car ils conduisent à des temps d'analyse prohibitifs.

Il est donc possible de visualiser toute la courbe de variation théorique de la résolution et de vérifier que sa forme est bien celle décrite plus haut.



$$x_{\text{mini}} = 10^{-\Delta b / \Delta a}$$

$$x_{\text{maxi}} \text{ (approché)} = 10^{-(\log(a1 / a2) + \Delta b) / \Delta a}$$

L'étude théorique précédente va nous permettre de réaliser un simulateur permettant la visualisation complète de ces effets de solvant et leur influence sur la séparation.

Deux versions différentes vous en sont proposées

Nous ne développerons pas ici leur conception mais celle-ci est décrite en détail dans l'[article](#) déjà cité.

## **Version 1 : simsolvR.xls**

Cette feuille toute prête permet de bien visualiser l'influence de la teneur en solvant organique sur la résolution R.

Les paramètres principaux sont les constantes  $a_1$ ,  $b_1$ ,  $a_2$  et  $b_2$  caractéristiques des deux composés à séparer et l'efficacité N de la colonne utilisée. On ne se préoccupe donc pas de l'influence des paramètres "physiques" qui sont globalement inclus par le paramètre N.

Pédagogiquement, cette séparation des facteurs permet une grande simplification en allant à l'essentiel.

Des boutons utilisant des macros permettent d'un simple clic de modifier rapidement la feuille ou de faire certains calculs.

**Boutons de changement de plage de variation de x** : en cliquant sur ces boutons on se placera soit sur une plage normale de variation de x :  $0 < x < 1$  (bouton “x normal”) soit sur une plage étendue de x permettant la visualisation complète de la courbe :  $\frac{1}{2} x_{\text{mini}} < x < 2 x_{\text{maxi}}$  (bouton “x maximal”).

**Boutons de calculs :**

**bouton “Calcul xmax vrai”** : permet le calcul du vrai maximum de la courbe  $R = f(x)$ ,

Remarque : En pratique si on clique sur le bouton “x maximal” ce calcul se fera automatiquement même sans cliquer sur “calcul xmax vrai”.

**Tableau de calcul pour x quelconque** : Introduire une valeur pour x et les valeurs de  $k_A$ ,  $k_B$ ,  $\alpha$  et R seront automatiquement calculées.

**Bouton “Calcule R = 1,5”** : Ce bouton permet le calcul automatique de la teneur en solvant “idéale” pour laquelle  $R = 1,5$  et temps de rétention minimal (voir plus loin).

**Boutons “voir R=1,5” et “supprimer x=1,5”** : font apparaître ou disparaître l'horizontale de la résolution limite  $R = 1,5$  du graphique  $R = f(x)$  (voir plus loin).

## Optimisation de la séparation :

On peut se placer dans deux cas limites :

Si on est en phase de mise au point de la séparation on aura intérêt à avoir la résolution la plus élevée possible, en effet il se peut que d'autres composés viennent s'intercaler entre les deux pics étudiés, on a donc intérêt à avoir des pics très écartés. Dans ce cas on cherchera à se placer au maximum de la courbe de résolution. Comme les temps de rétention sont très élevés pour des teneurs en eau élevées c'est à  $x = x_{\text{maxi}}$  qu'il faudra se placer ( si toutefois  $x_{\text{maxi}} < 1$  !), la détermination de la position de ce point est alors indispensable.

Si la séparation est déjà bien au point et qu'aucun autres composés n'est susceptible de s'intercaler on pourra alors rechercher une optimisation visant à réduire le temps d'analyse et à se placer vers  $R=1,5$ .

Il convient de déterminer la composition du solvant permettant d'obtenir une résolution supérieure à  $R = 1,5$  avec un temps d'analyse le plus court possible.

Le temps d'analyse sera d'autant plus court que la teneur en solvant organique sera importante, le problème revient donc à trouver la teneur en solvant organique la plus élevée conduisant à  $R > 1,5$ .

Le premier calcul à effectuer sera celui de la résolution pour le solvant organique pur, si celle-ci est supérieure à 1,5, le problème est résolu.



## Calcul de la résolution pour x = 1 :

$$R = \text{ABS} \left[ \frac{1}{2} * N_{\text{vrai}}^{0,5} * (k_1 - k_2) / (2 + k_1 + k_2) \right]$$

pour x=1

$$\log k_1 = a_1 * \log 1 + b_1 = b_1 \text{ soit : } k_1 = 10^{b_1}$$

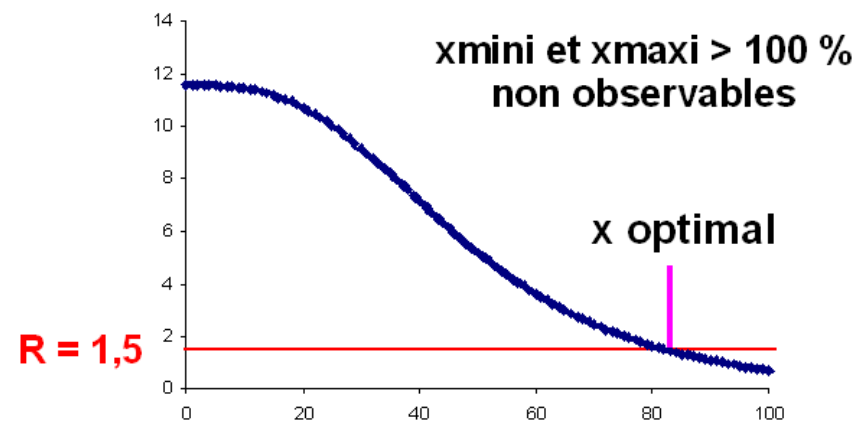
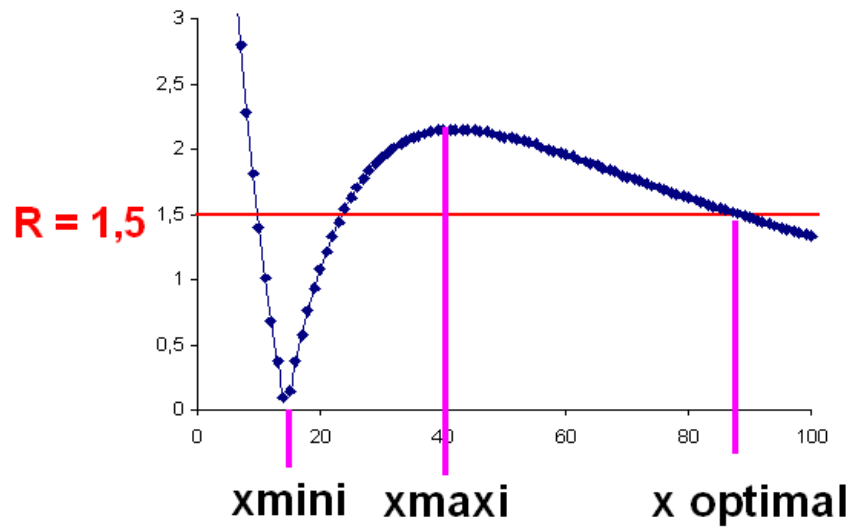
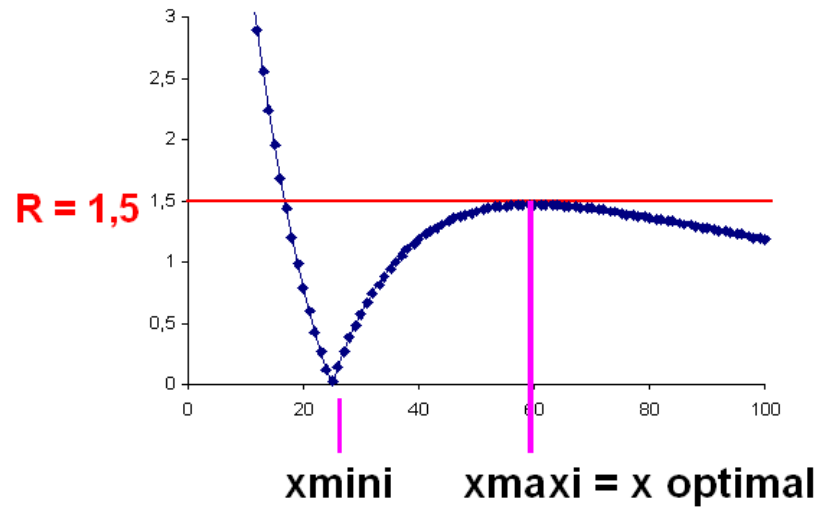
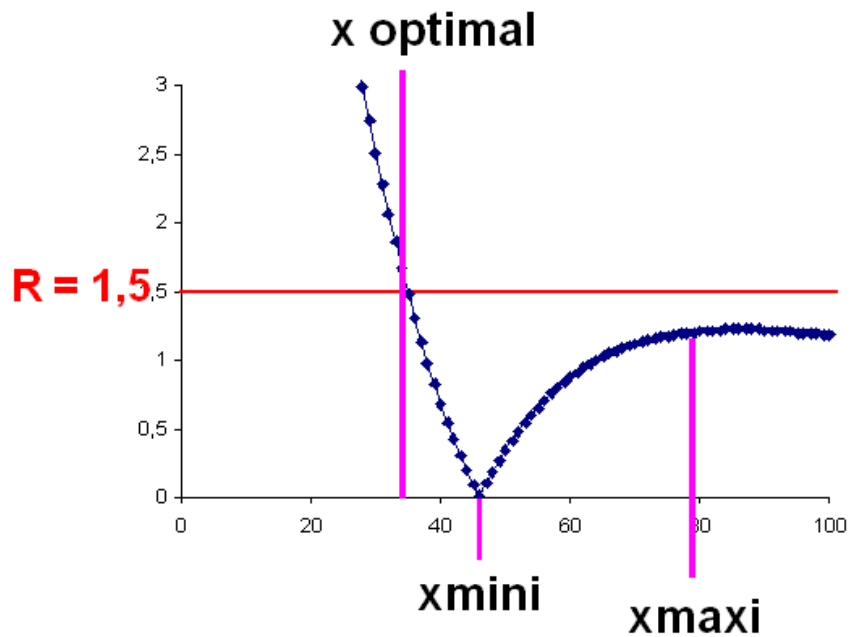
$$\text{et } \log k_2 = a_2 * \log 1 + b_2 = b_2 \text{ soit : } k_2 = 10^{b_2}$$

$$R_{100} = \text{ABS} \left[ \frac{1}{2} * N_{\text{vrai}}^{0,5} * (10^{b_1} - 10^{b_2}) / (2 + 10^{b_1} + 10^{b_2}) \right]$$

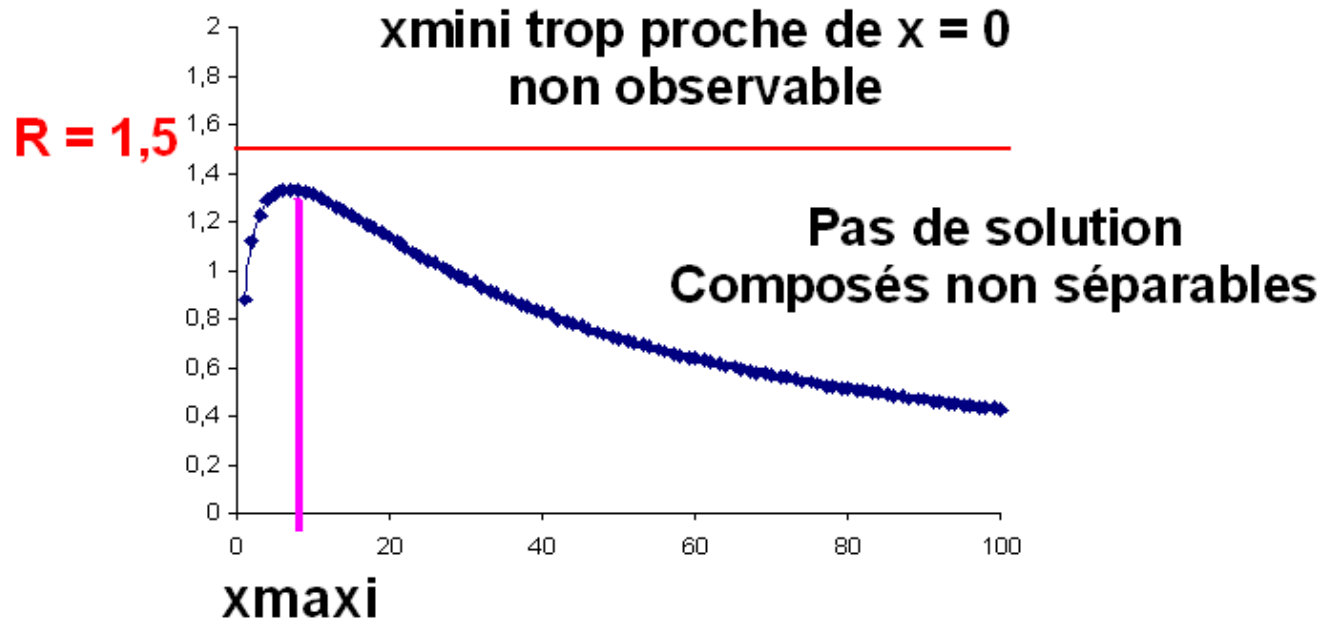
Si la résolution pour x = 100% est inférieure à 1,5 on diminuera la teneur en solvant organique jusqu'à obtenir R = 1,5.

Pour visualiser cette résolution limite de 1,5 nous tracerons l'horizontale correspondante.

Plusieurs cas de figures sont possibles qui sont résumées dans les figures suivantes.



Il est enfin possible que la séparation des deux composés soit impossible à réaliser.



**Activité N° 14** : Utilisation de la feuille [SimsolvR.xls](#)

Enfin, une version complète permettant de faire varier à la fois les paramètres physiques et la composition du solvant et la visualisation des chromatogrammes vous est également fournie.

**Activité N°15** : Utilisation de la feuille [Simsolv2.xls](#)

Un programme équivalent pour calculatrice est décrit dans l'[article](#).

Cette étude théorique montre qu'il est possible si les paramètres  $a$  et  $b$  d'Everet sont connus de prévoir la composition idéale du solvant à utiliser. Il suffira donc a priori de tracer les chromatogrammes pour deux compositions différentes, on en déduira les valeurs de  $a$  et  $b$  pour les divers composés et on pourra ensuite en déduire la composition de l'éluant à utiliser.

L'utilisation d'un simulateur tel que celui décrit plus haut sera particulièrement efficace à cet égard et permettra de partir directement avec une composition proche de la composition idéale, il suffira d'affiner un peu celle-ci.

La méthode plus pragmatique et empirique classiquement utilisée consiste à procéder dans un premier temps sur une colonne classique de type C18 et une phase mobile eau/méthanol.

On fera un premier essai avec une teneur importante en méthanol 90% par exemple.

On diminuera ensuite progressivement cette teneur 70 % puis 50 % etc.

L'exploitation des chromatogrammes permettra de vérifier si la loi d'Everet est bien vérifiée et la détermination expérimentale des constantes  $a$  et  $b$ . On pourra ensuite passer à la simulation...

On peut également se contenter du simple aspect visuel du chromatogramme pour voir si la séparation se fait ou non par le nombre de pics observés.

Quand la séparation est partiellement obtenue, on peut affiner celle-ci en modifiant la teneur en méthanol de manière plus fine.

Nous verrons tout cela en T.P...

On peut ensuite optimiser la séparation obtenue en changeant de solvant organique.

Le méthanol est surtout intéressant de part son prix de revient nettement moins élevé que celui de l'acétonitrile, mais il présente l'inconvénient de former très facilement des bulles gênantes pour la reproductibilité et d'avoir en moyenne une sélectivité moins bonne que l'acétonitrile.

L'acétonitrile conduit généralement à de meilleurs résultats mais est d'un coût de revient sensiblement plus élevé.

Dans un premier temps de la mise au point on utilise donc généralement le méthanol et on affine ensuite en utilisant l'acétonitrile.

Une fois que la séparation est obtenue on peut optimiser et chercher à diminuer le temps d'analyse en jouant sur les paramètres physique qui vont modifier l'efficacité de la colonne essentiellement sur la longueur de la colonne, le débit de l'éluant et la finesse des particules de phase stationnaire utilisée.

On peut également modifier la nature de la phase stationnaire pour affiner ou si on n'a pas obtenu de séparation correcte avec la C18

De manière idéale, les facteurs de rétention  $k$  doivent être d'environ 2 à 10, mais en pratique on peut utiliser la fourchette 1 et 20. Des valeurs de  $k$  trop élevées conduisent à des temps de rétention prohibitifs, mais des valeurs trop faibles limitent sensiblement la résolution.

Dans les cas où la séparation est difficile à obtenir on pourra utiliser des mélanges ternaires de solvants Eau/Acétonitrile/THF mais cela est relativement rare.

Dans la pratique, avant de se lancer dans la partie chromatographique proprement dite, il faudra s'interroger sur les propriétés physico-chimiques des composés du mélange à séparer et tout particulièrement des substances que l'on veut doser quantitativement. En particulier leur propriétés spectroscopiques qui détermineront le mode de détection utilisé et pour les détecteurs UV/visible la longueur d'onde à utiliser pour faciliter leur détection et si possible "masquer" les substances dont on ne cherche pas à déterminer les quantités présentes.

Il est enfin possible d'affiner encore par l'utilisation de gradients de solvant qui permettront d'optimiser l'analyse. Nous consacrerons un chapitre à ces gradients de solvant...

La méthode finalement retenue sera telle que tous les pics intéressants seront résolus. Le couple limitant ayant une résolution  $R$  de 1,5 ou plus. Idéalement une résolution de  $R=1,5$  est suffisante mais il est néanmoins préférable de prévoir jusqu'à  $R = 2$  car la performance d'une colonne évolue dans le temps et son efficacité diminuera au fil des injections successives.

Un dernier paramètre physique peut enfin intervenir pour finaliser l'optimisation chromatographique, il s'agit de la température.

C'est surtout en chromatographie gazeuse que la température joue un grand rôle mais elle intervient également en chromatographie liquide.

# Chromatographie et thermodynamique

Comme tous les équilibres chimiques les équilibres utilisés en chromatographie obéissent aux lois de la thermodynamique.

Nous allons ici parler de chromatographie de partage mais il en sera de même pour toutes les formes de chromatographie.

Equilibre de partage :

$S(\text{phase mobile}) = S(\text{phase stationnaire})$

Constante de partage :  $K = C_S / C_M$

On a donc toutes les relations classiques :

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

$$\Delta_R G^0 = - RT \ln K$$

$\Delta_R G^0$  : Variation d'enthalpie libre de l'équilibre de partage entre phase mobile et phase stationnaire.

$\Delta_R H^0$  : Variation d'enthalpie de l'équilibre de partage entre phase mobile et phase stationnaire.

$\Delta_R S^0$  : Variation d'entropie de l'équilibre de partage entre phase mobile et phase stationnaire.

$\Delta_R G^0 = 0$ ,  $K = 1$  le soluté est présent en concentration égale dans les deux phases.

Si  $\Delta_R G^0 < 0$  transformation spontanée, l'équilibre est favorisé dans le sens 1,  $K > 1$ . L'affinité pour la phase stationnaire est importante et le soluté sera retenu sur la colonne.

Si  $\Delta_R G^0 > 0$  transformation non spontanée, thermodynamiquement défavorisée l'équilibre est déplacé dans le sens 2,  $K < 1$ . L'affinité pour la phase mobile est importante et le soluté sera peu retenu sur la colonne.



## Variation de $K_R$ avec $T$ :

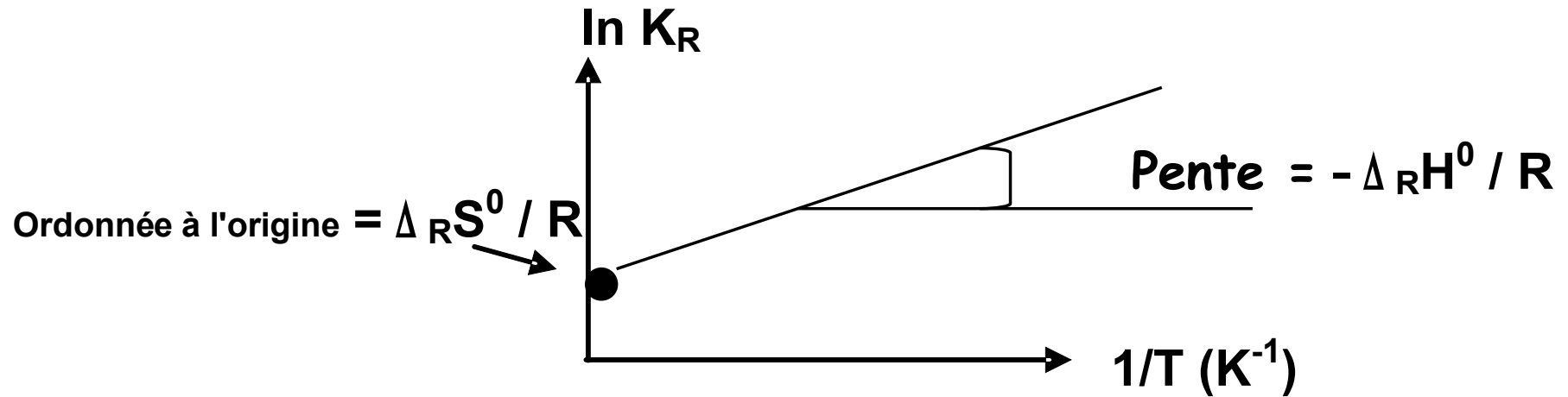
$$\Delta_R G^0(T) = \Delta_R H^0 - T \Delta_R S^0 = -R T \ln K_R$$

$$\ln K_R = - \Delta_R H^0 / R T + \Delta_R S^0 / R$$

Si on porte  $\ln K_R$  en fonction de  $1/T$  on obtient les valeurs de  $\Delta_R H^0$  et  $\Delta_R S^0$

Cela n'est vrai que dans un domaine de température restreint pour lequel on peut considérer que les enthalpie et entropie restent sensiblement constantes.

Si la plage de variation de la température est trop importante, il faudra tenir compte des variations de  $H$  et  $S$ .



## Variation de k (facteur de rétention) avec T :

$$\text{On a : } k = K V_S / V_M$$

$V_S$  et  $V_M$  sont caractéristiques de la colonne utilisée et on peut considérer que le rapport  $V_S/V_M$  ne varie pas avec la température.

$$k = K V_S / V_M$$

$$V_S = V_{\text{int}} - V_M$$

$$V_S / V_M = ( V_{\text{int}} - V_M ) / V_M = ( V_{\text{int}} / V_M ) - 1$$

$$\varepsilon = V_M / V_{\text{int}}$$

$$V_{\text{int}} / V_M = 1 / \varepsilon$$

$$V_S / V_M = 1 / \varepsilon - 1 = ( 1 - \varepsilon ) / \varepsilon$$

$$\text{Posons } V_S / V_M = ( 1 - \varepsilon ) / \varepsilon = \phi$$

$$k = K V_S / V_M$$

$$k = K \phi$$

$$\ln k = \ln K + \ln \phi$$

$$\ln K_R = - \Delta_R H^0 / R T + \Delta_R S^0 / R$$

$$\ln k = - \Delta_R H^0 / R T + \Delta_R S^0 / R + \ln \phi$$

On voit donc que le facteur de sélectivité  $k$  dépend de la température et que sa variation est la même que celle de  $K$ .

Si on porte  $\ln k$  en fonction de  $1/T$  on obtient donc une droite.

$$\ln k = a / T + b$$

$$k = \exp (a/T+b)$$

$$\text{avec } a = - \Delta_R H^0 / R \text{ et } b = \Delta_R S^0 / R + \ln \phi$$

### Variation de $\alpha$ avec $T$ :

$$\alpha = k_2/k_1$$

$$\ln \alpha = \ln (k_2/k_1) = \ln k_2 - \ln k_1 = a_2 / T + b_2 - ( a_1 / T + b_1 ) = (a_2 - a_1) / T + b_2 - b_1$$

Les termes  $b_2$  et  $b_1$  sont souvent du même ordre de grandeur pour des composés proches, en première approximation on a donc :

$$\ln \alpha = (a_2 - a_1) / T = c / T$$

$$\alpha = \exp (c / T)$$

En portant  $\ln \alpha$  en fonction de  $1/T$  on obtient une droite passant généralement près de l'origine.

## Variation de l'efficacité N avec T :

La température joue simultanément sur plusieurs facteurs et son effet est assez complexe à analyser. Nous ne rentrerons donc pas dans le détail ici.

Des modèles théoriques sont développés pour expliquer son effet sur les paramètres A, B et C de la courbe de Van Deemter Knox et expliquer ainsi son effet sur l'efficacité de la colonne.

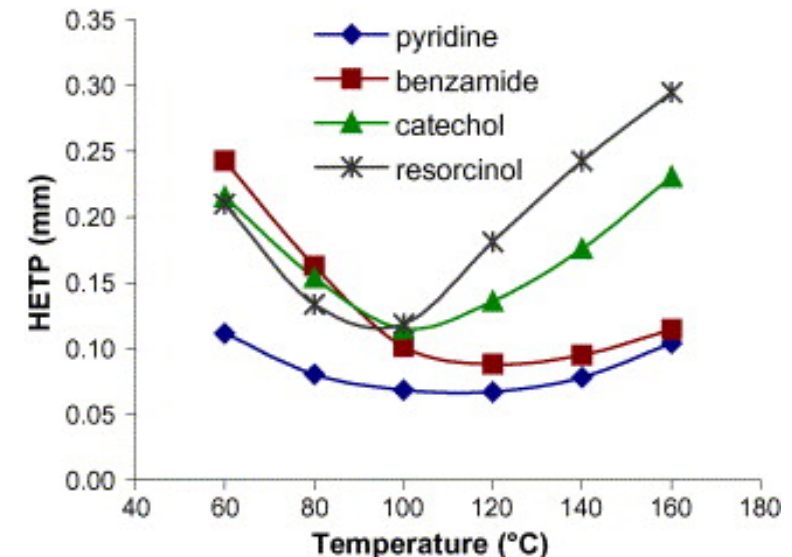
L'expérience montre que pour de nombreux composés il existe une température optimale pour laquelle, l'efficacité de la colonne sera maximale à un débit donné

Nous admettrons que l'efficacité d'une colonne est ainsi fonction de la température avec une loi de variation du même type que celle de Van Deemter pour le débit.

$$h = A + B / T + C * T$$

Il existe donc une valeur optimale de la température pour laquelle l'efficacité est maximale et h minimale.

**Exemples de l'influence de la température sur l'efficacité pour quelques composés en phase inverse d'après Yu Wang ; Analytica Chimica Acta ; N°558 ; Février 2006**



## Variation de la résolution R avec T :

$$R = \frac{1}{4} N^{1/2} [ (\alpha - 1) / \alpha ] [ k / ( 1 + k ) ]$$

La variation de la résolution avec la température est difficile à analyser en raison des trois facteurs N,  $\alpha$  et k qui interviennent simultanément. Si on considère que N ne varie pas avec T, on peut montrer que R doit être une fonction linéaire de 1/T. Dans la pratique, comme N varie, la variation de R avec 1/T n'est qu'approximativement linéaire.

## Variation du temps de rétention avec T :

$$k = ( t_R - t_M ) / t_M$$

$$t_R = t_M ( k + 1 )$$

On considère que  $t_M$  ne varie pas avec T et donc  $t_R$  varie sensiblement comme k.

On pourra donc améliorer la séparation en jouant sur la température de la colonne.

Dans la pratique ce facteur joue peu mais il peut néanmoins être utilisé pour optimiser une analyse. En particulier la finesse des pics peut être améliorée en se plaçant à la température optimale d'utilisation qui correspond à la plus grande efficacité de la colonne.

Il peut être intéressant de travailler à température régulée pour améliorer la reproductibilité des chromatogrammes obtenus, on s'affranchit ainsi des variations locales de température qui induisent de petites modifications des chromatogrammes.

Rappelons que certains détecteurs comme les détecteurs réfractométriques sont très sensibles aux variations de températures.

Les colonnes courantes sont limitées par une plage de température aux environs de la température ambiante et ne sont plus utilisables pour des températures trop basses ou trop élevées. Mais il existe des colonnes spéciales permettant un travail à des températures plus élevées (150°C), l'utilisation de telles colonnes permet parfois d'obtenir de nettes améliorations...

La chromatographie liquide haute pression et haute température est amenée à se développer rapidement dans l'avenir.

En travaillant à haute température on observe généralement des améliorations tant au niveau de la résolution qui est augmentée qu'à celui du temps d'analyse qui est sensiblement raccourci. Par ailleurs la viscosité des solvants diminuant à température élevée, on pourra avoir des pressions moins élevées et donc augmenter les débits.

Comme en chromatographie en phase gazeuse des programmes de gradient de température sont parfois utilisés pour optimiser les analyses...

**Activité N°15** : Température et chromatographie