

Mettre de l'ordre dans les espèces

Résumé La chromatographie en phase liquide à polarité de phases inversée en mode gradient d'élution est largement utilisée pour la séparation d'espèces chimiques. Le développement d'une méthode de ce type inclut naturellement une étape d'optimisation pour accroître la résolution entre les espèces à séparer ou pour réduire le temps d'analyse. Deux paramètres opératoires (la teneur initiale en solvant organique et la pente du gradient d'élution) doivent alors être simultanément ajustés. Une approche didactique basée sur les modèles de rétention est présentée dans cet article permettant d'appréhender les conséquences de chaque paramètre opératoire. Cette approche est ensuite mobilisée dans un outil d'aide au développement de méthodes développé en Python.

Mots-clés Chimie analytique, HPLC, UPLC, gradient, enseignement, didactique, optimisation.

Abstract **Sorting chemical species**

Reverse-phase liquid chromatography in gradient elution mode is widely used for the separation of chemical species. Method development for such technique always includes an optimization step to increase resolution between chemical species, or to reduce analysis time. Two operating parameters (initial content of organic solvent and slope of elution gradient) have to be simultaneously adjusted. A didactic approach based on retention models is proposed in this article to gain more insight on the consequences of each operating parameter. Such approach is subsequently implemented in a method development tool written in Python.

Keywords Analytical chemistry, HPLC, UPLC, gradient, teaching, didactic, optimization.

La chromatographie en phase liquide dans le mode à polarité de phases inversée est largement utilisée pour la séparation d'espèces chimiques dans des échantillons très variés, pouvant être issus d'un procédé de synthèse ou d'origine biologique, environnementale... Si un chromatogramme est certes toujours obtenu, la séparation chromatographique observée nécessite bien souvent une optimisation, que ce soit pour accroître la résolution entre les espèces à séparer ou pour réduire le temps d'analyse. Les concepts fondamentaux de la chromatographie sont alors mobilisés dans cet objectif, et une description détaillée des conséquences de chaque paramètre opératoire a été publiée dans un article récent de *L'Actualité Chimique* [1] pour les analyses réalisées en mode isocratique (composition constante de la phase mobile). Or bien souvent, pour permettre la séparation d'espèces chimiques ayant des polarités très variées, il s'avèrera nécessaire de réaliser l'analyse en mode dit « gradient » (composition de la phase mobile variable dans le temps). Si le mode isocratique nécessitait l'optimisation d'un seul paramètre opératoire (la teneur en solvant organique dans une phase mobile hydro-organique), deux paramètres opératoires doivent être simultanément ajustés dans le mode gradient : la teneur initiale en solvant organique dans la phase mobile hydro-organique, ainsi que la variation de la teneur en solvant organique au cours du temps, pendant l'analyse elle-même. Appréhender les conséquences de chaque paramètre devient alors plus complexe et les outils d'aide au développement de méthode s'avèrent alors nécessaires.

On se propose ici de discuter des paramètres à considérer pour comprendre le déplacement des espèces et de fournir des éléments permettant de répondre à des interrogations légitimes des chimistes :

- Est-ce que l'ordre de sortie des espèces, observé sur le chromatogramme, peut changer en fonction des conditions opératoires du gradient ?
- Est-ce que je peux contrôler la position relative des espèces en changeant les conditions de gradient ?

- Est-ce que je peux trouver facilement les conditions optimales de gradient à programmer pour séparer toutes les espèces de mon mélange dans un temps d'analyse le plus court possible ?

- Est-ce que des composés peuvent changer d'ordre à l'intérieur même de la colonne pendant l'analyse en mode gradient ?

- Comment se peut-il, alors que je programme le même gradient que celui qui est donné dans une publication et que j'utilise exactement la même colonne, que je n'obtienne pas le même chromatogramme ?

Un petit retour sur l'instrumentation

Pour décrire complètement un système chromatographique que l'on utilise en mode gradient d'élution, il est nécessaire de préciser les caractéristiques de la colonne (longueur, diamètre interne, diamètre des particules, type de greffon, porosité, bien souvent le nom du fabricant), les caractéristiques de la phase mobile (la nature du solvant organique, méthanol ou acétonitrile, la composition de chacune des solutions dans les réservoirs A et B, éventuellement le pH, les additifs...), mais aussi les caractéristiques du système de pompage.

En effet, en mode gradient d'élution, deux solutions A et B vont être mélangées pour préparer, en amont de l'injecteur et de la colonne, une phase mobile de composition voulue qui va servir d'éluant aux espèces à analyser. La configuration la plus simple consiste à mettre de l'eau dans le réservoir A et un solvant organique (aussi appelé quelquefois modificateur organique, du méthanol ou de l'acétonitrile par exemple) dans le réservoir B. Il sera ainsi possible de préparer dynamiquement une phase mobile initiale contenant une teneur particulière en méthanol (par exemple 5 % de méthanol et 95 % d'eau) mais aussi de faire varier la teneur en méthanol pendant l'analyse elle-même.

Deux types de systèmes de pompes dits « haute pression » et « basse pression » sont commercialement disponibles

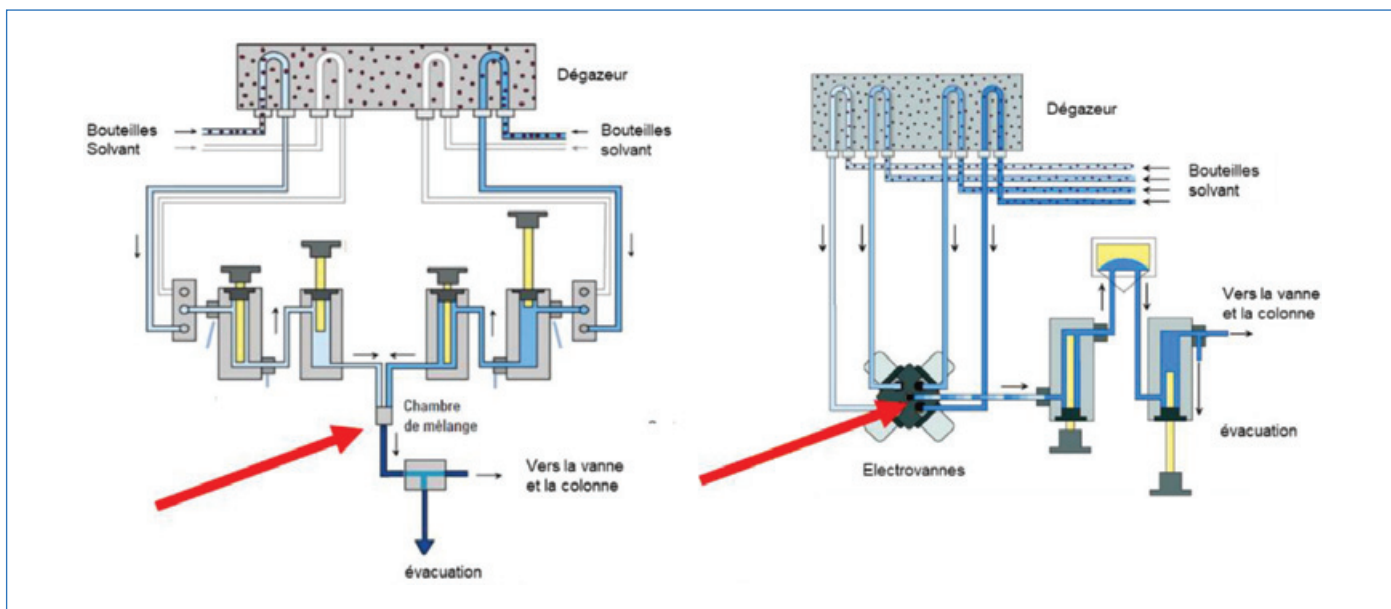


Figure 1 - Point de mélange dans des systèmes HPLC/UPLC gradient haute pression (à gauche) et basse pression (à droite) (adapté de la documentation technique Agilent [2]).

(figure 1). Ces deux systèmes se distinguent par la façon dont les mélanges sont réalisés avec un point de mélange des solutions A et B qui se situe respectivement en aval ou en amont des têtes de pompe.

Dans un système « haute pression », deux pompes indépendantes sont utilisées pour déplacer les solutions A et B avec un débit contrôlé pour chacune de ces pompes. Ainsi pour produire une phase mobile contenant 30 % de méthanol avec un débit total de $1,00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, avec un réservoir A contenant de l'eau et un réservoir B contenant du méthanol, la pompe A va fonctionner à un débit de $0,70 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, et la pompe B va fonctionner à un débit de $0,30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ [3]. Les deux solutions sont mélangées après les pompes, sous haute pression, avant d'être dirigées vers la vanne d'injection et la colonne.

Dans un système « basse pression », une seule pompe est utilisée pour déplacer les différentes solutions, et en amont de la pompe, un système d'électrovannes permet d'ajuster la composition de la phase mobile. Dans cette configuration, pour produire une phase mobile contenant 30 % de méthanol avec un débit total de $1,00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, la pompe fonctionne à un débit de $1,00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et les électrovannes associées aux réservoirs A et B vont être ouvertes et refermées successivement et rapidement, de telle sorte que la voie A soit ouverte 70 % du temps et la voie B 30 % du temps.

Ces deux types de système peuvent indifféremment être utilisés pour réaliser des analyses chromatographiques en mode gradient. Toutefois, les systèmes de pompage proposés par les fabricants d'instrumentation présentent une caractéristique majeure, et variable de modèle à modèle, qui est liée à la position du point de mélange des solutions par rapport à la vanne d'injection. En effet, le volume de solution situé entre le point de mélange et la vanne d'injection (que l'on peut assimiler à l'entrée de la colonne) n'est pas identique d'un modèle à un autre. Or, lorsque la composition de la phase mobile doit changer, et c'est le cas en mode gradient, le changement de composition se réalise effectivement au niveau du point de mélange, mais cette nouvelle composition de phase mobile n'arrive en tête de colonne qu'une fois qu'un volume correspondant au volume entre le point de mélange et la tête de colonne (volume de délai) aura été déplacé par la pompe. Il existe ainsi un temps de délai qui correspond au temps

nécessaire pour que la composition modifiée arrive en tête de colonne, ce temps étant dépendant du débit et du volume de délai du système. Le volume de délai, volume entre le point de mélange et la tête de colonne, est donc une caractéristique très importante du système lorsque l'on réalise des analyses en mode gradient d'élution. En effet, suivant les systèmes, les espèces injectées en tête de colonne ne vont pas être entraînées par une phase mobile correspondant à la teneur initiale en solvant pendant le même temps. Et ceci peut induire des modifications des positions relatives des pics chromatographiques, voire des changements d'ordre d'élution des espèces, nous y reviendrons !

Il convient donc à l'expérimentateur de déterminer lui-même le volume de délai de son système chromatographique. Avec un détecteur UV-visible, une simple expérience en mode gradient utilisant une solution A constituée de méthanol et une solution B contenant du méthanol et 0,1% d'acétone (espèce qui absorbe dans le domaine UV) permet d'obtenir cette grandeur essentielle (voir annexe 1*). Il est à ce jour très étonnant de constater que le volume de délai n'est quasiment jamais documenté lors de la description d'une analyse en mode gradient. Et malheureusement, c'est l'absence de connaissance de ce volume qui conduit bien souvent à des problèmes lorsque l'on essaye de reproduire une expérience publiée dans la littérature scientifique.

Finalement, pour décrire une expérience en mode gradient (figure 2), outre les caractéristiques géométriques de la

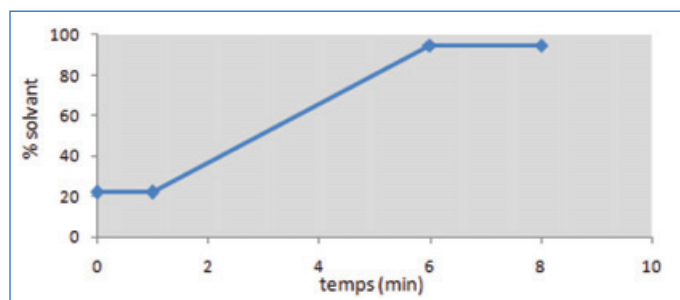


Figure 2 - Description et programmation d'un gradient : composition initiale $C_i = 20 \%$ méthanol ; temps de palier $t_{\text{palier}} = 1 \text{ min}$; composition finale $C_f = 95 \%$; temps de gradient $t_G = 5 \text{ min}$ (pente de gradient $B_G = 15 \%\cdot\text{min}^{-1}$), temps final de palier 2 min.

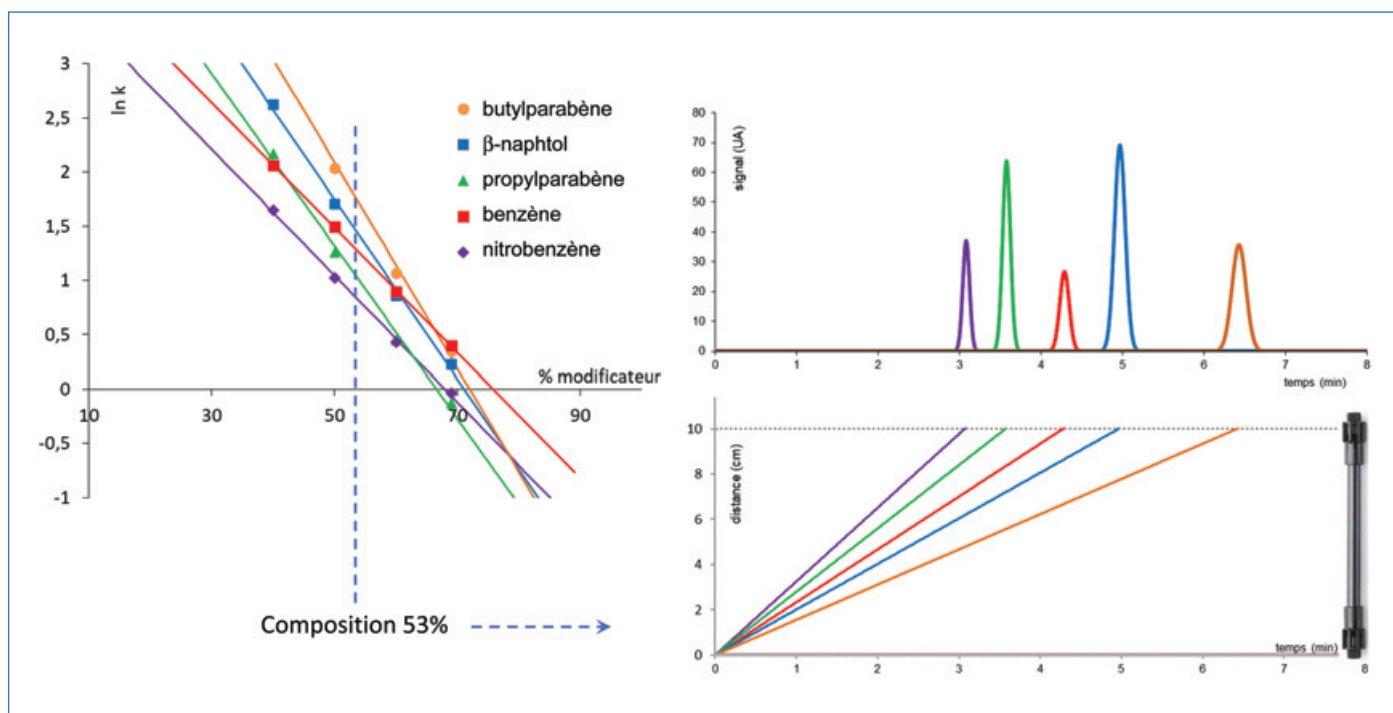


Figure 3 - Graphe de gauche : modèles de rétention obtenus sur une colonne HPLC-C₁₈ (modificateur = méthanol) pour cinq composés. À droite : progression des différentes espèces dans la colonne chromatographique pour une analyse en mode isocratique réalisée avec une teneur en méthanol de 53 % (longueur colonne 10 cm ; diamètre interne 4,6 mm ; diamètre particule 5 μm ; porosité 0,7 ; débit 1,3 mL.min⁻¹) et chromatogramme résultant.

colonne (longueur L , diamètre interne d_i et porosité ε), le volume de délai du système V_D et le débit D de la phase mobile (qui permettront de retrouver le temps de délai t_D et le temps mort t_m de la colonne), il sera nécessaire d'expliciter la composition initiale C_i en modificateur organique de la phase mobile, le temps pendant lequel cette composition est maintenue (temps de palier t_{palier} , qui peut être égal à 0), ainsi que la composition finale C_f de la phase mobile et le temps de gradient t_G nécessaire pour réaliser cette modification. Suivant les usages, on peut aussi choisir d'expliciter la pente du gradient B_G qui est reliée aux autres grandeurs suivant la relation $B_G = (C_f - C_i)/t_G$.

Tout est dans les modèles de rétention

Pour connaître les modèles de rétention d'une espèce chimique en mode isocratique pour une phase stationnaire donnée et un solvant organique particulier (par exemple du méthanol), on réalise plusieurs expériences en mode isocratique à différentes teneurs en solvant organique, et on relève le temps de rétention $t_{r,i}$ de chaque espèce i . Pour chaque teneur en solvant organique, le facteur de rétention expérimental k_i de l'espèce i est calculé à partir de la relation :

$$t_{r,i} = t_m(1 + k_i) \quad (1)$$

La représentation de $\ln(k_i)$ en fonction de la teneur en modificateur organique permet ensuite de construire un modèle pour chaque espèce au travers de l'équation 2 (modèle dénommé « linear solvent-strength » ou modèle exponentiel, voir figure 3) :

$$\ln(k_i) = \ln(k_{w,i}) - S_i \cdot \varphi_{\text{modif}} \quad (2)$$

Une fois les modèles de rétention connus, ceux-ci peuvent être utilisés pour rechercher la teneur en modificateur qui permet l'obtention d'une résolution satisfaisante avec un temps d'analyse le plus court possible (voir [1] et annexe 2*).

Si on s'intéresse à la progression de chaque espèce chimique dans la colonne (figure 3, en bas à droite), chaque espèce i progresse dans la colonne de façon régulière, à une vitesse proportionnelle à la vitesse de la phase mobile et inversement proportionnelle à $1 + k_i$:

$$u_i = \frac{u_{\text{phase mobile}}}{1 + k_i} \quad (3)$$

Dans l'exemple présenté ici sur la figure 3, pour une teneur de 53 % de méthanol, le propylparabène (\blacktriangle) a un facteur de rétention plus faible que celui du benzène (\blacksquare), sa vitesse de progression est plus grande, et son temps de rétention est plus faible que celui du benzène. Par contre, si on travaillait avec une teneur en méthanol inférieure à 40 %, le propylparabène (\blacktriangle) aurait un facteur de rétention plus grand que celui du benzène (\blacksquare), et son temps de rétention serait plus grand que celui du benzène (voir annexe 2*).

Gradient et modèles de rétention

Ce mélange de cinq espèces chimiques peut aussi être séparé en mode gradient ; la figure 4 représente les chromatogrammes obtenus dans deux conditions de gradient se différenciant par la composition initiale de la teneur en méthanol (30 et 50 % de méthanol), tout en conservant une pente de gradient identique. Force est de constater que l'ordre d'élution des espèces n'est pas le même dans ces deux cas, et nous allons essayer d'interpréter les chromatogrammes observés en s'appuyant sur les modèles de rétention présentés sur la figure 3.

• Premier cas, figure 4, partie gauche : si nous débutons l'analyse avec une teneur de 30 % de méthanol, et que nous faisons augmenter la teneur en méthanol de 2,33 % par minute, nous observons le chromatogramme avec l'ordre d'élution des espèces : nitrobenzène, benzène, propylparabène, β -naphtol et butylparabène. Pouvait-on prévoir cet

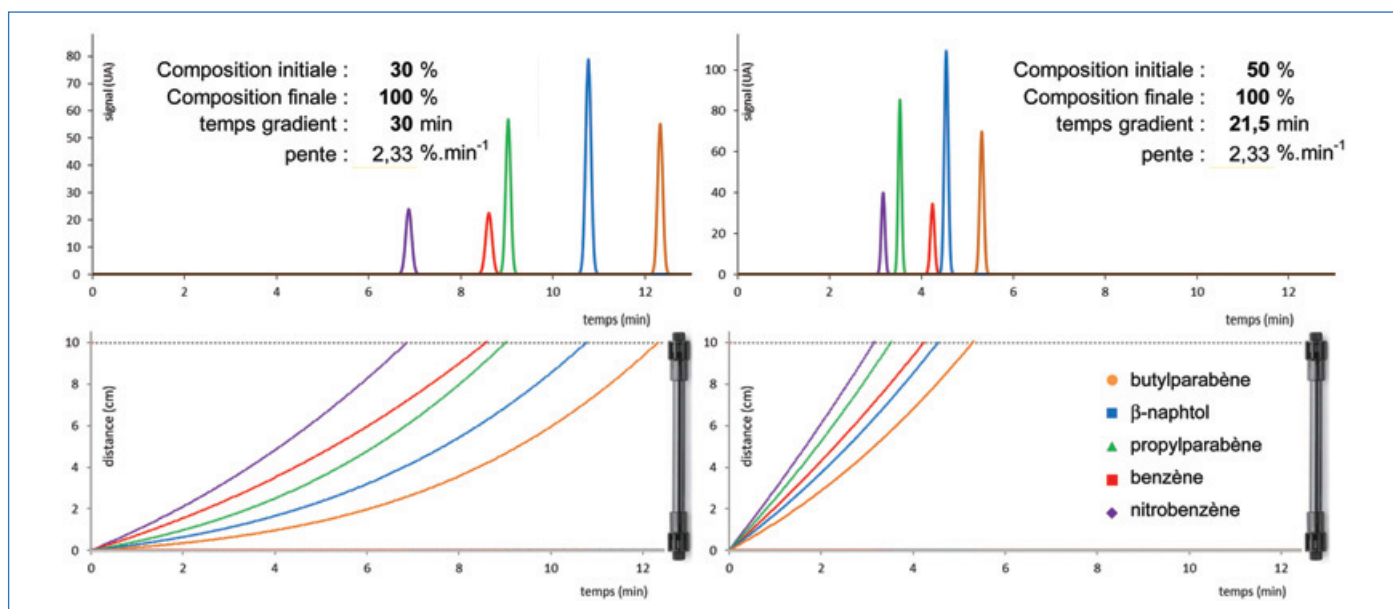


Figure 4 - Chromatogrammes obtenus en mode gradient : teneur initiale de 30 % en méthanol à gauche, de 50 % à droite ; pente de gradient $2,33 \text{ \%} \cdot \text{min}^{-1}$ (longueur colonne 10 cm ; diamètre interne 4,6 mm ; diamètre particule $5 \mu\text{m}$; porosité 0,7 ; débit $1,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; solvant A : H_2O ; solvant B : MeOH ; volume de délai $500 \mu\text{L}$). En bas : progression des solutés dans la colonne chromatographique en fonction du temps.

ordre de sortie ? Juste après avoir été injecté en tête de colonne, le mélange échantillon se trouve dans une phase mobile contenant 30 % MeOH et les différentes espèces i progressent chacune à une vitesse u_i qui dépend de leurs facteurs de rétention respectifs à cette teneur de 30 % : sur le modèle de rétention représenté sur la figure 3, on peut observer que le nitrobenzène présente le plus petit facteur de rétention des cinq espèces considérées, et qu'il va donc progresser rapidement dans la colonne (relation 3, figure 4 graphe du bas, couleur violet). Ainsi au bout de 6,87 min, le nitrobenzène aura parcouru les 10 cm de colonne et aura été détecté par le spectrophotomètre. De façon symétrique, le butylparabène (représenté en orange) possède le facteur de rétention le plus grand, et on peut observer sur le graphe du bas que cette espèce n'aura que très peu progressé dans la colonne, même au bout de 2 min. Mais comme la teneur en solvant organique augmente pendant l'analyse, chaque espèce chimique se retrouve alors dans une phase mobile de plus en plus éluante... ; son facteur de rétention diminue et sa vitesse de progression dans la colonne augmente au cours du temps. Alors que la vitesse d'avancement d'un soluté en mode isocratique était constante tout au long de l'analyse (pente des droites, figure 3), la vitesse de progression des espèces (pente des courbes, figure 4) augmente pendant l'analyse en mode gradient !

• Deuxième cas : en débutant le gradient à 50 % de méthanol et en conservant la même pente de gradient (figure 4, partie droite), on constate une inversion de l'ordre de sortie du benzène et du propylparabène par rapport à celui observé précédemment en débutant le gradient à 30 % de méthanol. Cette observation peut être interprétée à l'aide des modèles de rétention : à 30 % de méthanol, le facteur de rétention du benzène est plus petit que celui du propylparabène et le benzène sort avant le propylparabène ; tandis qu'à 50 % de méthanol, c'est le facteur de rétention du propylparabène qui est plus petit que celui du benzène et le propylparabène sort avant le benzène.

D'accord, cela peut paraître être assez logique mais une autre expérience, représentée sur la figure 5, pourrait nous inviter à

revisiter cette interprétation. En débutant à 30 % de méthanol, mais cette fois-ci en utilisant un temps de gradient plus petit (10 min au lieu de 30 min), c'est le propylbenzène (représenté en vert sur les graphes) qui est élué avant le benzène (représenté en rouge). Or nous avons vu qu'à 30 % de méthanol, le facteur de rétention du benzène est bien plus petit que celui du propylparabène et que le benzène progresse plus vite dans la colonne (la courbe rouge est alors au-dessus de la courbe verte dans le graphique en bas à droite de la figure 5).

Mais attention, la composition de la phase mobile va dans ce dernier cas être plus rapidement modifiée dans la colonne après l'injection de l'échantillon car le temps du gradient est cette fois plus court ! Les différentes espèces vont ainsi subir un changement de leur facteur de rétention d'autant plus important que la pente du modèle de rétention est grande. On va donc voir le propylparabène accélérer dans la colonne de façon plus importante que le benzène, et 4 minutes après l'injection, le propylparabène (en vert) va même dépasser le benzène dans la colonne pour se retrouver finalement élué plus tôt que le benzène (en rouge) ! La position relative des espèces les unes par rapport aux autres en sortie de colonne dépend donc de la composition initiale mais aussi de la pente du gradient. Il ne reste qu'à mettre tout ceci en équation pour prévoir les temps de rétention des espèces et ainsi pouvoir optimiser d'une façon raisonnée une séparation chromatographique.

Mais avant de passer à cette étape, il y a encore une différence notable entre les chromatogrammes obtenus en mode isocratique et en mode gradient. Vous avez vu la largeur des pics et la variation de cette largeur tout au long d'un chromatogramme ? Jetez un coup d'œil aux figures 3 et 4 si vous êtes passé un peu vite... En mode isocratique, la largeur des pics augmente avec le temps de rétention, alors que ce n'est pas le cas en mode gradient.

L'écart-type d'un pic chromatographique peut être décrit par la relation (4) :

$$\sigma_{(t)obs} = \frac{t_m(1+k_e)}{\sqrt{N_{col}}} \quad (4)$$

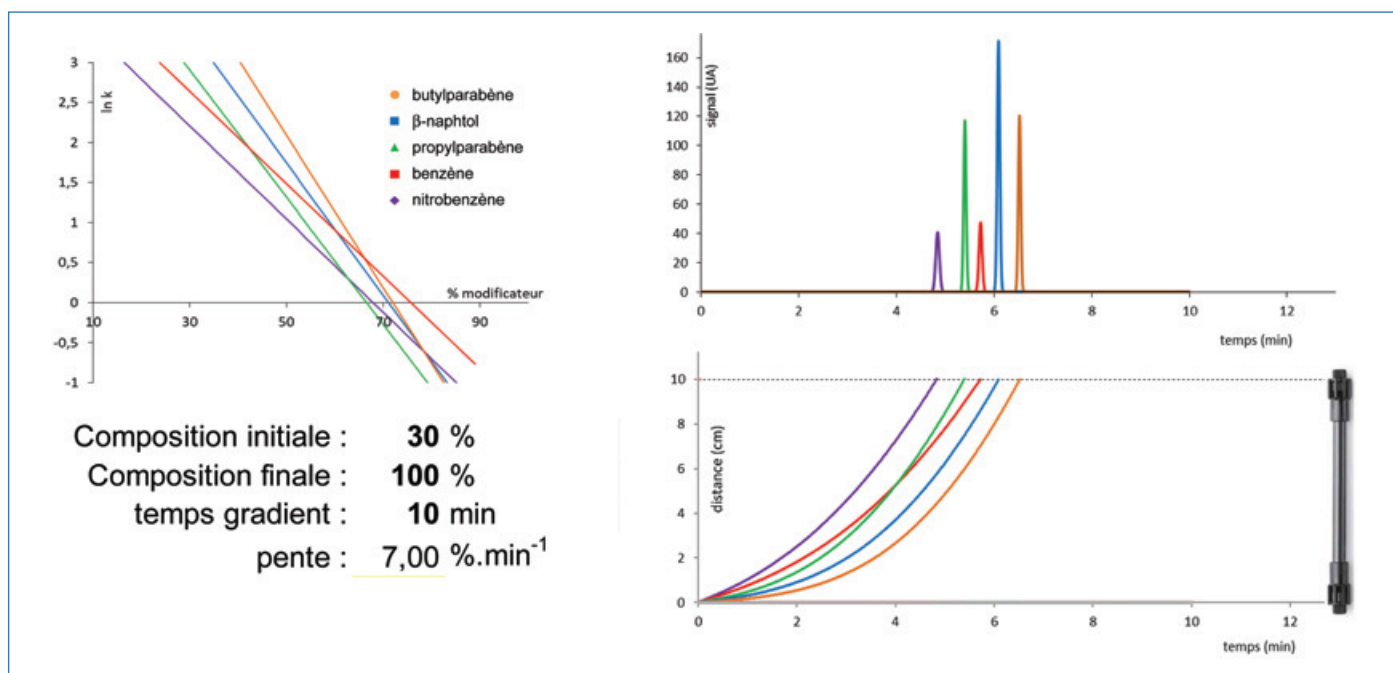


Figure 5 - Modèles de rétention de cinq solutés sur colonne silice greffée C18. Chromatogrammes obtenus en mode gradient ; teneur initiale de 30 ; en méthanol ; temps de gradient 10 min (autres paramètres identiques à la figure 4).

où N_{col} est l'efficacité de la colonne et k_e le facteur de rétention de l'espèce au moment de son élution, c'est-à-dire le facteur de rétention à la teneur en solvant organique au moment où l'espèce sort de la colonne – que l'on peut calculer à partir du modèle de rétention représenté par la relation 2, connaissant la composition à l'élution $C_e = C_i + B_G \cdot (t_r - t_m - t_{délai} - t_{palier})$. Or, il s'avère que le facteur de rétention à l'élution k_e est sensiblement constant pour toutes les espèces éluées au cours d'un même gradient. De ce fait, chaque espèce apparaît dans un pic chromatographique avec une largeur quasi identique ! Et se rajoute donc un point de vigilance lorsque l'on consulte un rapport chromatographique : on ne peut pas, à partir d'un chromatogramme expérimental, calculer directement l'efficacité de la colonne. C'est-à-dire que même si votre logiciel fétiche calcule une valeur correspondant soi-disant à l'efficacité, la valeur numérique obtenue ne représente pas l'efficacité chromatographique, car la formule utilisée par le logiciel est du type $N = (t_r/\sigma)^2$ qui n'est équivalente à la relation 4 que si l'on opère en mode isocratique (dans ce cas seulement $k_e = k = t_r/t_m - 1$ et la valeur calculée est bien l'efficacité colonne). Ne faites donc pas confiance à la valeur d'efficacité retranscrite sur le rapport d'analyse en mode gradient, ce n'est pas l'efficacité de la colonne !

Si je peux prévoir, je peux optimiser !

Grâce à une modélisation de la rétention des solutés par la relation 2, il est possible de résoudre analytiquement les équations permettant de calculer le temps de rétention [4] et d'obtenir une relation « simple » permettant de prédire les temps de rétention si on connaît le modèle de rétention et les caractéristiques du gradient et du système chromatographique :

$$t_R = \frac{1}{B_G \cdot S} \cdot \log \left(1 + 2,3 \cdot k_0 \cdot B_G \cdot S \cdot \left(t_m - \frac{t_D + t_{palier}}{k_0} \right) \right) + t_m + t_D + t_{palier} \quad (5)$$

avec B_G la pente du gradient, k_0 le facteur de rétention de l'espèce à la composition initiale et S la pente du modèle

de rétention de l'espèce. Si les modèles de rétention des espèces ne sont pas connus de l'expérimentateur (ce qui est quasiment toujours le cas), la réalisation de deux analyses en mode gradient avec des pentes différentes permet de connaître les temps de rétention des espèces pour deux conditions connues, et ainsi d'ajuster les paramètres du modèle pour retrouver les termes $\ln(k_{w,i})$ et S_i de l'équation associée de chaque espèce.

Une fois que les modèles de rétention sont connus, il devient alors possible de calculer le temps de rétention de chaque espèce chimique quelles que soient les conditions opératoires (éq. 5), de calculer l'écart-type de chaque pic chromatographique (éq. 4), et donc de calculer la résolution entre les pics chromatographiques consécutifs. À travers la relation 5, on peut ici appréhender l'effet du temps de délai (donc du volume de délai et du débit) sur les temps de rétention. Une variation de temps de délai ne conduit pas uniquement à un simple décalage temporel comme le laisse apparaître la partie droite de la relation, mais la position relative de deux pics chromatographiques va aussi être affectée (le t_D à l'intérieur de la fonction logarithmique) par un changement de temps de délai. On retrouve ici la nécessité de bien connaître son système pour pouvoir optimiser une séparation en mode gradient (voir illustration en annexe 3*). À l'issue de tous les calculs de résolution dans l'espace de recherche, il est pour habitude de représenter la résolution minimale observée sur le chromatogramme (la plus petite des résolutions observées entre deux pics consécutifs) pour différentes teneurs initiales en modificateur organique et différentes pentes de gradient afin de pouvoir déterminer les conditions qui conduisent à la plus grande résolution possible... ou celles qui conduisent à un temps d'analyse le plus petit possible tout en ayant une résolution minimale supérieure à une valeur seuil que l'on s'est fixée... ou tout autre critère que l'on jugerait pertinent.

À titre d'exemple, la figure 6 représente les modèles de rétention d'un mélange de dix composés (fénuron, o-crésol, métouuron, monuron, éthylparabène, chlortoluron, monolinuron,

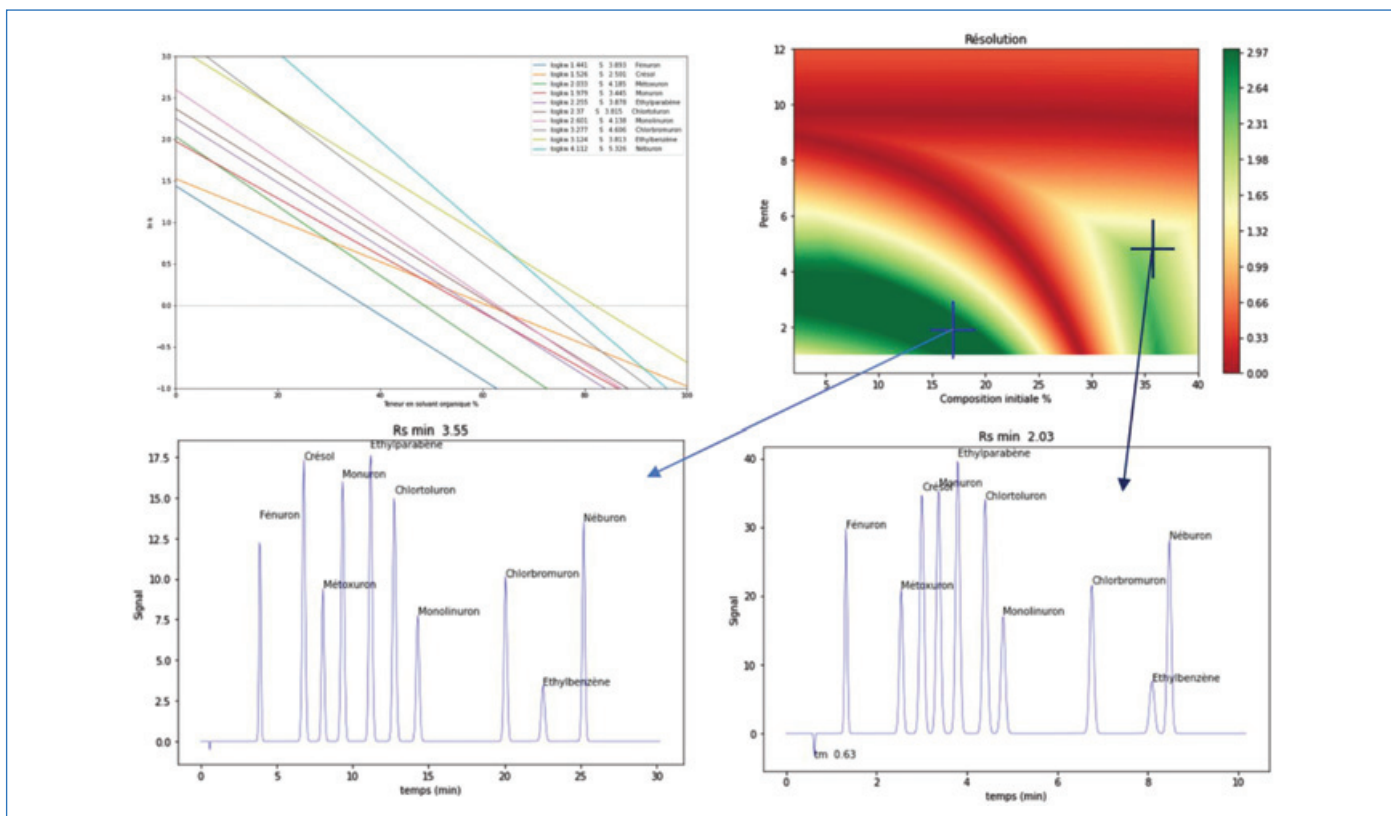


Figure 6 - Modèles de rétention et chromatogrammes pour dix composés (fénuron, o-crésol, métoxuron, monuron, éthylparabène, chlortoluron, monolinuron, chlorbromuron, éthylbenzène, néburon) obtenus sur une colonne HPLC-C₁₈ Accucore ; longueur 5 cm ; diamètre interne 4,6 mm ; diamètre particule 4 µm ; porosité 0,53 ; débit 0,7 mL.min⁻¹ ; solvant A : H₂O ; solvant B : MeOH ; volume délai 670 µL.

chlorbromuron, éthylbenzène, néburon) obtenus sur une colonne HPLC-C₁₈ Accucore.

Le diagramme d'optimisation (en haut à droite) représente la résolution chromatographique minimale codée en couleur (la couleur verte apparaît pour une résolution minimale supérieure à 1,5, la couleur rouge correspond à une très faible résolution c'est-à-dire à une coélution de deux espèces chimiques) pour des teneurs initiales en méthanol variant de 2 à 40 %, et des pentes de gradient variant de 1 à 12 %·min⁻¹. Le chromatogramme de gauche est obtenu dans les conditions de plus grande résolution ($R_s, \min = 3,55$), tandis que le chromatogramme de droite est obtenu pour une résolution minimale égale à 2 et le temps d'analyse le plus petit parmi toutes les conditions testées. Il est intéressant de noter que l'ordre de sortie des espèces n'est pas le même dans les deux cas, mais peu importe pour l'analyste qui se doit seulement d'avoir des espèces parfaitement séparées pour une analyse quantitative la plus exacte possible.

Sans connaître cette procédure de développement de méthode, un chimiste inexpérimenté aurait pu, par hasard, réaliser une analyse débutant à 10 % de méthanol avec une pente de 3 %·min⁻¹ et obtenir une séparation satisfaisante (la résolution serait égale à 3,3, le temps d'analyse serait de 20 min). Après avoir légèrement modifié les conditions, il aurait pu gagner un peu de temps, mais il n'aurait probablement pas osé changer fortement les conditions de composition initiale et n'aurait probablement jamais atteint un temps d'analyse inférieur à 10 minutes. Est-ce si important de passer de 20 à 10 minutes ? Aujourd'hui, avec des spectromètres très coûteux utilisés comme détecteur, le temps machine doit être économisé pour pouvoir réaliser le plus d'analyses possibles par unité de temps. Alors oui, gagner du temps tout en obtenant une bonne séparation est toujours utile, et ceci

même avec un spectromètre de masse qui ne peut pas forcément lever les interférences isobariques ou gérer les effets de suppression d'ionisation si deux espèces chimiques sont simultanément présentes dans la source. Alors optimisons ! Pour ceci, un programme en langage Python peut largement faciliter la tâche, et une version libre de droit peut être utilisée en ligne [5].

Et puis, il restera peut-être à transférer notre méthode optimisée vers un autre laboratoire qui n'aura peut-être pas la même colonne, ou le même volume de délai dans son système chromatographique. Là encore, avec deux ou trois règles simples, tout se passera bien. Prochaine histoire...

* Le fichier des annexes est téléchargeable librement sur www.lactualitechimique.org (page liée à cet article).

[1] J. Randon, V. Dugas, C. Demesmay, Le bon sens de la chromatographie en phase liquide, *L'Act. Chim.*, **2022**, 469, p. 36-40.

[2] Documentation HPLC Agilent, www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography/hplc-systems (consultée le 01/03/2022).

[3] Certaines pompes modernes utilisent des débits légèrement différents pour tenir compte de l'effet de compression de volume lié au mélange de deux solvants différents, effet particulièrement marqué dans le cas des mélanges eau-méthanol.

[4] L.R. Snyder, J.W. Dolan, High performance gradient elution. The practical application of the linear-solvent-strength model, Wiley, **2006**.

[5] <https://new.societechimiquedefrance.fr/divisions/enseignement-formation/article-ac-mettre-de-lordre-dans-les-especes>

Jérôme RANDON*, professeur, Vincent DUGAS, maître de conférences, et Claire DEMESMAY, professeure, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, CNRS, UMR 5280, Villeurbanne.

* randon@univ-lyon1.fr

Compléments à l'article « Mettre de l'ordre dans les espèces », par J. Randon, V. Dugas et C. Demesmay (*L'Act. Chim.*, 2022, 475, p. 48)

Annexe 1 - Détermination d'un volume de délai

Pour un système chromatographique disposant d'un détecteur UV-visible et d'une colonne remplie de particules de silice greffées C₁₈, après avoir choisi un débit de travail, le temps mort est déterminé grâce à l'injection d'une solution de thiourée, composé non retenu et détectable en spectroscopie UV.

Une expérience utilisant un système à deux solvants (A : MeOH ; B : MeOH + 0,1 % acétone) est ensuite réalisée pour déterminer le temps de délai, ce qui conduira à la valeur du volume de délai (*figure 1*).

Dans cet exemple, le volume de délai est de 440 µL.

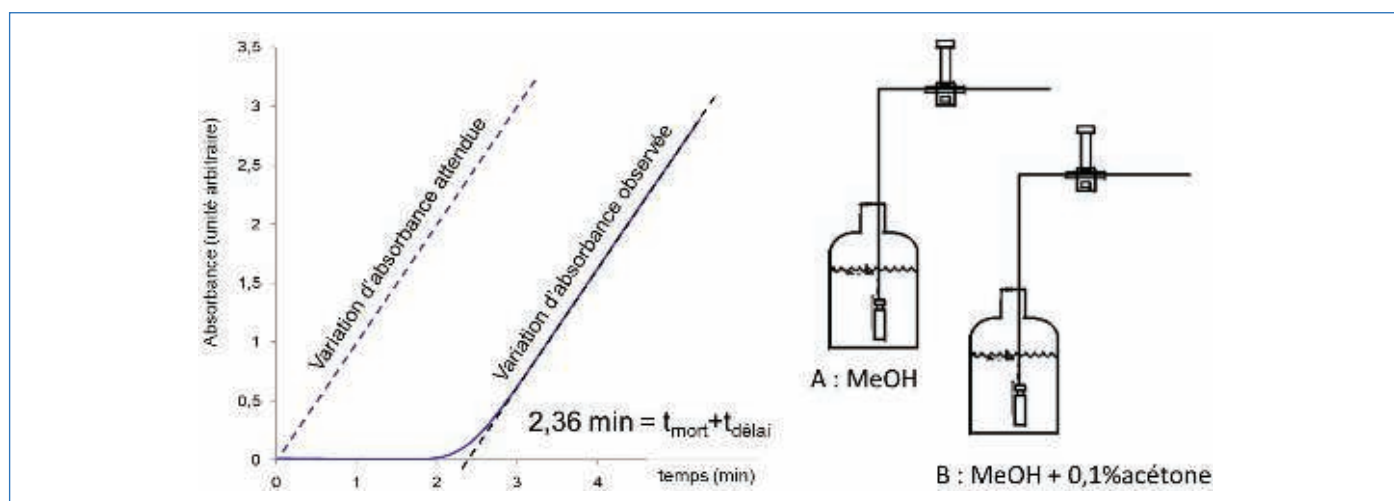


Figure 1 - Variation du signal du détecteur en fonction du temps pour un système chromatographique équipé d'un détecteur UV-visible et d'une colonne de longueur 10 cm ; diamètre interne 4,6 mm ; débit 0,7 ml.min⁻¹ ; temps mort 1,73 min. Gradient programmé : 5 % de B à 0 min ; 99 % de B à 20 min.

Annexe 2 - Modèle de rétention et séparation en mode isocratique

Construction des modèles de rétention en mode isocratique : on réalise plusieurs expériences en mode isocratique à différents teneurs en modificateur organique, et on relève le temps de rétention $t_{r,i}$ de chaque espèce i . Pour chaque teneur en modificateur organique, le facteur de rétention expérimental k_i de l'espèce i est calculé à partir de la relation :

$$t_{r,i} = t_m(1 + k_i)$$

On trace ensuite $\ln(k_i)$ en fonction de la teneur en modificateur organique pour chaque espèce (*figure 2*).

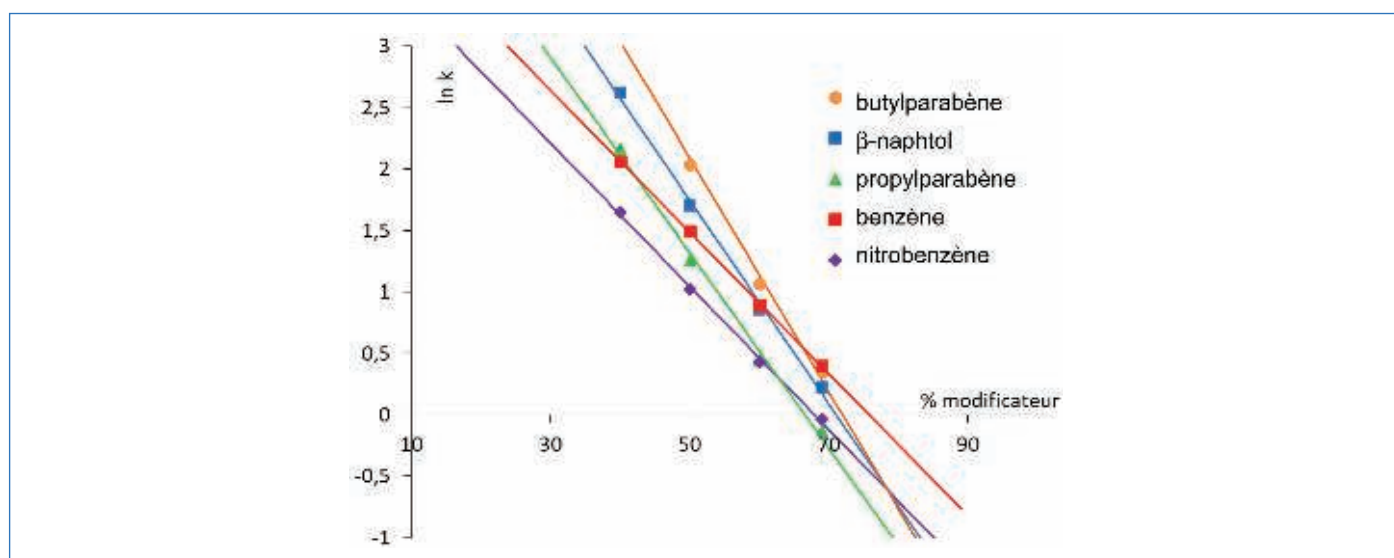


Figure 2 - Exemple de modèles de rétention obtenus sur une colonne HPLC-C₁₈ (modificateur = méthanol).

Le logarithme du facteur de rétention de chaque espèce i peut être modélisé par une relation linéaire en fonction de la teneur en modificateur organique :

$$\ln(k_i) = \ln(k_{w,i}) - S_i \cdot \varphi_{modif}$$

À certaines compositions, les droites modélisant la rétention se croisent. À ces compositions, les facteurs de rétention de deux espèces sont identiques (donc les temps de rétention sont aussi identiques), et il y a coélution des deux espèces. Par exemple, à une teneur en modificateur de 42 % en méthanol, le propylparabène (en vert ▲) et le benzène (en rouge ■) sont coélusés (figure 3).

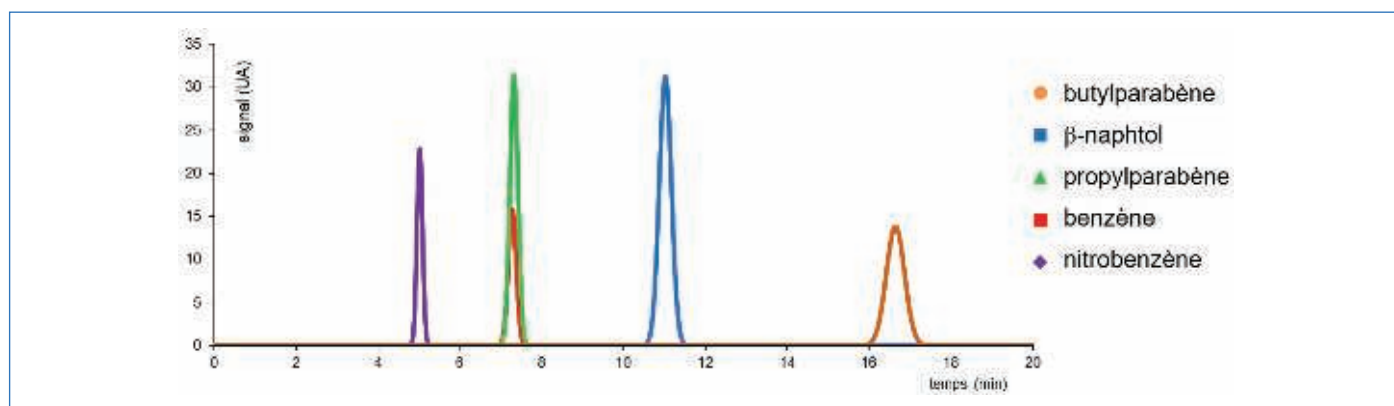


Figure 3 - Chromatogramme du mélange avec une teneur en méthanol de 42 % (longueur colonne 10 cm ; diamètre interne 4,6 mm ; diamètre particule 5 μm ; porosité 0,7 ; débit 1,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

Si on s'intéresse à la progression de chaque espèce chimique dans la colonne (graphe à droite en bas des figures 4 et 5), chaque espèce i progresse dans la colonne de façon régulière, à une vitesse proportionnelle à la vitesse de la phase mobile et inversement proportionnelle à $1 + k_i$:

$$u_i = \frac{u_{phase\ mobile}}{1 + k_i}$$

Suivant les valeurs des facteurs de rétention des différentes espèces chimiques pour la composition en modificateur organique choisi, l'ordre d'élution des espèces ne sera pas le même. Ainsi, le benzène sera élué plus tôt que le propylparabène si la composition de la phase mobile est de 30 % en méthanol (figure 4). En effet, à cette teneur en méthanol, le facteur de rétention du benzène (ou son logarithme sur le graphe ■) est plus faible que celui du propylparabène (▲), sa vitesse de progression est plus grande, son temps de rétention est plus faible.

À 53 % de méthanol (figure 5), l'ordre d'élution de ces deux espèces est inversé. À cette teneur, le propylparabène (▲) a un facteur de rétention plus faible que celui du benzène (■), sa vitesse de progression est plus grande et son temps de rétention est plus faible.

Ainsi, la connaissance des modèles de rétention permet de prédire les temps de rétention des espèces chimiques, aussi bien pour la colonne qui a été utilisée pour déterminer les équations des modèles de rétention, que pour une colonne de géométrie différente (longueur, diamètre interne, diamètre des particules) et/ou dans des conditions différentes de débit (voir [1]).

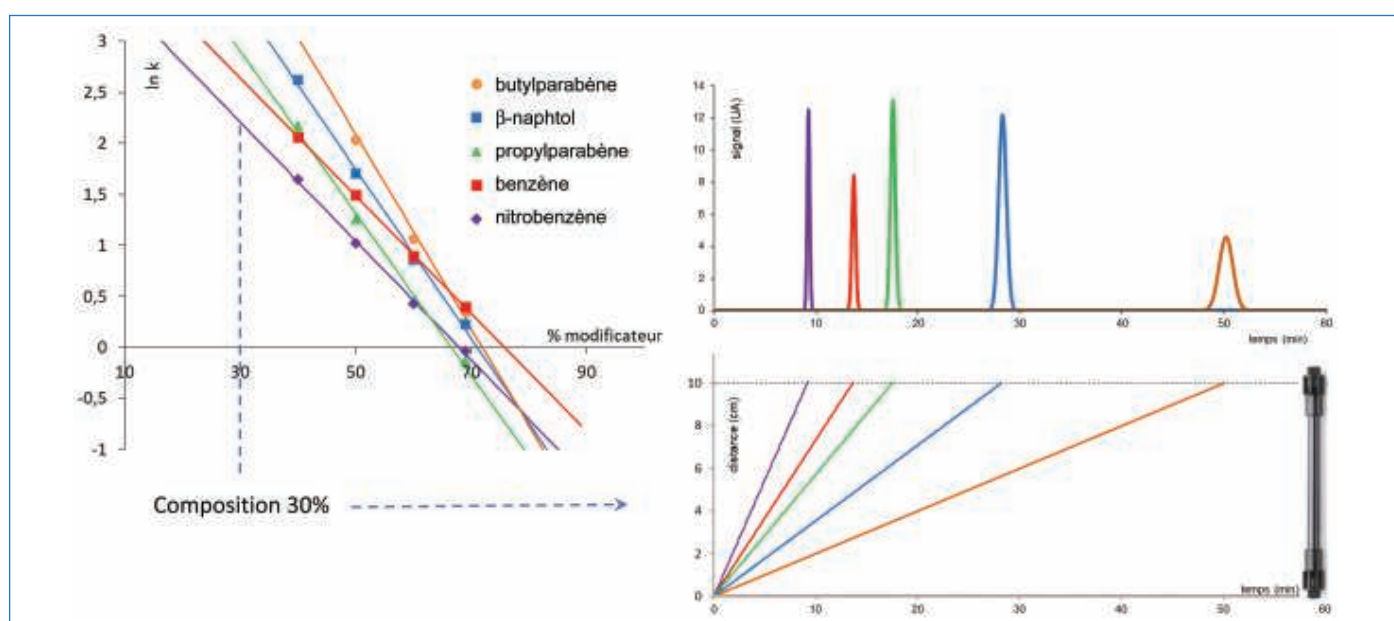


Figure 4 - Graphe de gauche : modèles de rétention obtenus sur une colonne HPLC- C_{18} (modificateur = méthanol) pour cinq composés. À droite : progression des différentes espèces dans la colonne chromatographique pour une analyse en mode isocratique réalisée avec une teneur en méthanol de 30 % (longueur colonne 10 cm ; diamètre interne 4,6 mm ; diamètre particule 5 μm ; porosité 0,7 ; débit 1,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

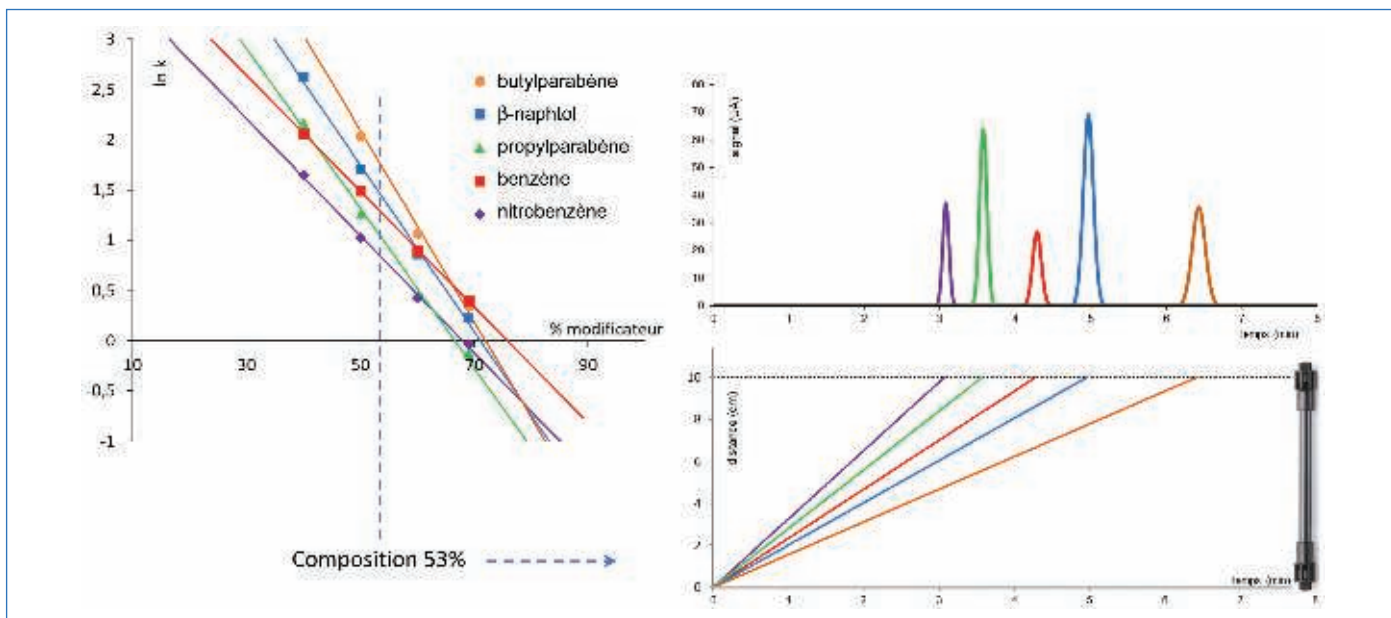


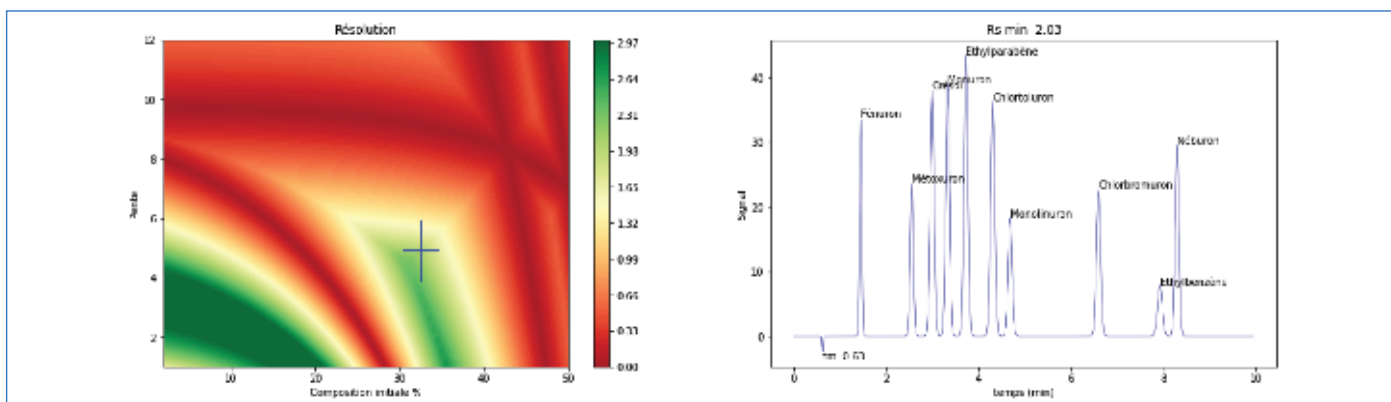
Figure 5 - Graphe de gauche : modèles de rétention obtenus sur une colonne HPLC- C_{18} (modificateur = méthanol) pour cinq composés. À droite : progression des différentes espèces dans la colonne chromatographique pour une analyse en mode isocratique réalisée avec une teneur en méthanol de 53 % (longueur colonne 10 cm ; diamètre interne 4,6 mm ; diamètre particule 5 μm ; porosité 0,7 ; débit 1,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

Annexe 3 - Illustration d'un effet de volume de délai sur une séparation chromatographique

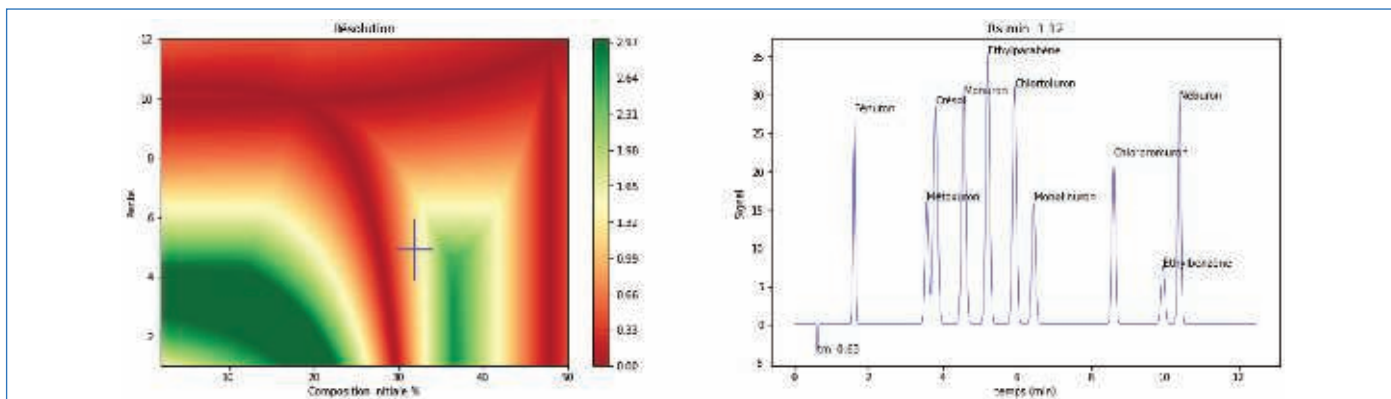
Séparation de dix composés (fécuron, o-crésol, métoxuron, monuron, éthylparabène, chlortoluron, monolinuron, chlorbromuron, éthylbenzène, néburon) obtenus sur une colonne HPLC- C_{18} Accucore, longueur 5 cm ; diamètre interne 4,6 mm ; diamètre particule 4 μm ; porosité 0,53 ; débit 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; solvant A : H_2O ; solvant B : MeOH.

Situation 1 : volume délai 100 μL .

Composition initiale 32,5 % ; pente 4,89 %/min (analyse la plus rapide avec $R_s > 2,00$).



Situation 2 : volume de délai 1 500 μL . Le diagramme d'optimisation a changé. Et si on conserve les mêmes conditions de gradient : composition initiale 32,5 % ; pente 4,89 %/min...



La séparation qui était optimisée sur le système avec un volume de délai de 100 μL n'est plus satisfaisante en se plaçant dans les mêmes conditions de gradient sur un système chromatographique présentant un volume de délai de 1 500 μL .