

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Djillali LIABES Sidi-Bel-Abbès

Faculté de technologie

Département des énergies et de génie des procédés

POLYCOPIE DE COURS

Techniques d'analyse

**Polycopié destiné pour les étudiants
de la 3^{ème} année Licence
génie des procédés**

(2020-2021)

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

NOTATION

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

AVANT PROPOS	1
CHAPITRE 1 : METHODES CHROMATOGRAPHIQUES	2
1. GÉNÉRALITÉS SUR LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES	3
1.1. INTRODUCTION	3
1.2. DEFINITION	3
1.3. CLASSIFICATION DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES	6
1.3.1. Classification selon la nature des phases	6
1.3.2. Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu	7
1.3.3. Classification selon la technique mise en jeu	8
2. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE	8
2.1. GRANDEURS FONDAMENTALES ET DEFINITIONS	9
2.1.1. Notion de temps	9
2.1.2. Notion de volume	10
2.1.3. Notion de concentration	11
2.1.4. Notion d'efficacité	13
2.2. QUALITE DE LA SEPARATION	19
2.3. NOTION DE PRESSION	21
3. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE	22

3.1. INTRODUCTION	22
3.2. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	23
3.2.1. Principes de la séparation chromatographique	23
3.2.2. Classification des techniques de chromatographie en phase liquide	28
3.3. INSTRUMENTATION	31
3.3.1. Système de distribution de solvant	31
3.3.2. Système d'injection d'échantillon	33
3.3.3. Colonne	34
3.3.4. Système de détection	37
3.4. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	40
4. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	43
4.1. INTRODUCTION	43
4.2. DESCRIPTION DE L'ÉQUIPEMENT	44
4.3. SYSTÈMES D'INTRODUCTION DES ÉCHANTILLONS	46
4.3.1. Injecteurs pour colonnes garnies	46
4.3.2. Injecteurs de colonne capillaire	48
4.3.3. Autres systèmes d'injection	52
4.4. DETECTEURS	54
4.4.1. Paramètres caractéristiques d'un détecteur	55
4.4.2. Types de détecteurs	58
4.5. COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE	70
4.5.1. Colonnes garnies	70
4.5.2. Colonnes tubulaires ouvertes	71
4.5.3. Un support solide	73
4.5.4. La phase stationnaire	75
4.5.5. Caractérisation des phases stationnaires	76
4.5.6. Caractéristiques de quelques phases stationnaires	79

4.5.7. Phases stationnaires liées	83
4.5.8 Absorbants pour la chromatographie gaz-solide	
4.6. CHOIX DE LA COLONNE	85
4.6.1. Recherche de méthodologies existantes	85
4.6.2. Utilisation de colonnes capillaires	86
4.6.3. Utilisation de colonnes garnies	86
4.6.4. Utilisation de phases mixtes	86
4.7. SELECTION DES CONDITIONS DE TRAVAIL	87
CHAPITRE 2 : SPECTROSCOPIE MOLECULAIRE UV – VISIBLE	91
1. INTRODUCTION	92
2. PRINCIPE	93
2.1. SPECTRE D'ABSORPTION	94
2.2. LES DIFFERENTS TYPES DE TRANSITIONS ELECTRONIQUES	95
2.2.1. Electrons engagés dans une liaison sigma.	96
2.2.2. Electrons engagés dans une liaison non liante	96
2.2.3. Electrons engagés dans une liaison pi	97
2.3. TERMINOLOGIE	97
3. APPAREILLAGE	99
3.1. Composition d'un spectromètre d'absorption moléculaire	99
3.2. Différents types de spectrophotomètres	100
4. ASPECT QUANTITATIF	101
4.1. LOI DE L'ABSORPTION	101
4.2. VALIDITE DE LA LOI	103
4.3. APPLICATION A L'ANALYSE QUANTITATIVE : LE DOSAGE	104
4.3.1. Le choix de la longueur d'onde	104
4.3.2. L'étalonnage	104
4.3.3. Les solvant	106
4.3.4. Les espèces dosables	106

5. ASPECT QUALITATIF	106
5.1. EFFET DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES TRANSITIONS	106
5.1.1. Effet de la substitution	106
5.1.2. Effet de la conjugaison	107
5.1.3. Effet de solvant	108
6. PRINCIPAUX CHROMOPHORES	110
6.1. CHROMOPHORE ETHYLENIQUES	110
6.2. CHROMOPHORE CARBONYLE	113
6.3. COMPOSES BENZENIQUES	116
7. APPLICATIONS DE LA SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE	118
CHAPITRE 3 : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE	119
1. INTRODUCTION	120
2. PRINCIPE	121
3. THEORIE	123
3.1. MODES DE VIBRATION	123
3.1.1. Vibration d'allongement (vibration de valence) ou (étirement)	123
3.1.2. Vibration de déformation (flexion-bending)	124
3.2. NOMBRE DE MODE DE VIBRATION	125
3.2.1. Influence de la masse des deux atomes.	130
3.2.2. Influence de la constante de rappel.	130
3.2.3. Influence de la vibration de valence.	131
3.2.4. Influence de l'environnement.	131
4. INSTRUMENTATION ET ECHANTILLONNAGE	131
4.1. APPAREILLAGE	131
4.1.1. Le spectromètre à onde continue.	132
4.1.2. Le spectromètre à transformée de Fourier.	133
4.1.3. Les éléments d'un spectromètre.	134

4.2. ECHANTILLONNAGE	135
5. INTERPRETATION D'UN SPECTRE D'ABSORPTION IR	135
5.1. FREQUENCES CARACTERISTIQUES DES GROUPEMENTS ORGANIQUES	136
5.2. DEMARCHE D'ANALYSE D'UN SPECTRE IR	137
REFERENCE	139

NOTATION

ω	Largeur du pic à la base
δ	Largeur du pic à demi-hauteur
ϵ	Coefficient molaire
ν	Fréquence de vibration exprimée en (cm^{-1})
$\bar{\nu}$	Nombre d'onde (cm^{-1})
A	Coefficient de diffusion turbulente (cm)
A	Absorbance
B	Coefficient de diffusion longitudinale (cm^2/s)
C	Résistance au transfert de masse (s)
C	Concentration (mol.l^{-1})
c	Célérité de la lumière en (cm/s)
C_m	Concentration du soluté dans la phase mobile
CPG	Chromatographie phase gazeuse
CPL	Chromatographie phase liquide
C_s	Concentration du soluté dans la phase stationnaire
D	Débit
D	Diamètre moyen des particules (m)
D_m	Coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile
dp	Diamètre moyen des particules (m)
H	Hauteur équivalent à un plateau théorique (cm)
HEPT	Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (cm)
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
I	taux de rétention de la substance x
I	Intensité finale
I_0	Intensité initiale
K	Coefficient de partage
k	Constante de liaison (dynes/cm)
K'	facteur de capacité
L	Longueur de la colonne (m)
l	Constante
l	Longueur de la cuvette (cm)
N_{eff}	Nombre de plateaux effectifs

N_{th}	Nombre de plateaux théorique
R	Constante des gaz parfaits ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)
\underline{R}	paramètre de résolution
S	Signal mesurée par le détecteur
T	Température (K°)
t_m	Temps mort
t_r	Temps de rétention
t_r'	Temps de rétention réduit
u	Vitesse de la phase mobile ($m.s^{-1}$)
V_m	Volume de la phase mobile ou volume mort
V_{pic}	Volume d'un pic
V_r	Volume d'élution ou volume de rétention
V_s	Volume de la phase stationnaire
V_s	Volume de la phase stationnaire
z	nombre d'atomes de carbone d'un n-alcane élué de la colonne avant la substance x
$z+n$	nombre d'atomes de carbone d'un n-alcane élué après la substance x
α	facteur de sélectivité
γ	Constante
ΔP	Perte de charge (Pa)
$\Delta_r G^{\circ}$	Energie libre (J)
η	Viscosité (Pa.s)
λ	Longueur d'onde (cm)
μ	Masse réduite
σ	Demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur
Φ	Facteur de résistance à l'écoulement

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

- Figure 1** : L'expérience de base en chromatographie.
Figure 2 : Principe de l'analyse par chromatographie.
Figure 3 : Caractéristique d'un pic d'élution en chromatographie.
Figure 4 : Model des plateaux théoriques.
Figure 5 : Caractéristiques d'un pic chromatographique.
Figure 6 : Courbe de Van Deemter.
Figure 7 : Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents.
Figure 8 : Influence du terme R sur la séparation de deux pics d'intensité égale.
Figure 9 : Pics chromatographiques et leurs attributs.
Figure 10 : Anomalies des pics chromatographiques.
Figure 11 : Schéma d'un système HPLC.
Figure 12 : Groupes silanol de différentes activités sur la surface du gel de silice.
Figure 13 : Gamme dynamique et linéaire des détecteurs.
Figure 14 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.
Figure 15 : Courbes HEPT pour trois gaz vecteurs couramment utilisés.
Figure 16 : Schéma d'un injecteur pour colonnes garnies
Figure 17 : Schéma d'un injecteur "split".
Figure 18 : Schéma d'un injecteur sur colonne.
Figure 19 : Schéma d'une vanne d'injection de gaz.
Figure 20 : Schéma d'un injecteur à désorption thermique.
Figure 21 : Systèmes d'injection dans l'espace de tête.
Figure 22 : Graphique de réponse de concentration d'un détecteur.
Figure 23 : Paramètres du rapport signal/bruit de deux bandes chromatographiques.
Figure 24 : Schéma d'un détecteur de conductivité thermique.
Figure 25 : Coupe d'un détecteur à ionisation de flamme.
Figure 26 : Détecteur à capture électronique de type concentrique.
Figure 27 : Détecteur azote-phosphore.
Figure 29: Détecteur à photoionisation.
Figure 30: Schéma de la cellule de conductivité d'un détecteur de Hall.
Figure 31 : Colonnes remplies pour la chromatographie en phase gazeuse.
Figure 32 : Types de colonnes tubulaires ouvertes.
Figure 33 : Chromatogramme d'un mélange dans des conditions isothermes.
Figure 34 : Conditions isothermes appropriées aux composés d'intérêt.
Figure 35 : Chromatogramme d'un mélange programmé en fonction de la température.

CHAPITRE 2 SPECTROSCOPIE MOLECULAIRE UV – VISIBLE

- Figure 36** : Spectres électromagnétiques.
Figure 37 : Transition électronique.
Figure 38 : Spectre d'adsorption UV – Visible.
Figure 39 : Types de transitions électroniques.
Figure 40 : Effets des substituants sur l'absorption.
Figure 41 : Schéma général d'un spectromètre d'absorption moléculaire.
Figure 42 : Cuves de spectrophotométrie.

- Figure 43** : Spectrophotométrie simple faisceau.
Figure 44 : Spectrophotométrie double faisceau.
Figure 45 : Traversé du faisceau de lumière dans la solution.
Figure 46 : Limite de validation de la loi de Beer-Lambert.
Figure 47 : Préparation des solutions étalon.
Figure 48 : Domaine d'absorption de quelques solvants.
Figure 49 : Effet bathochrome d'un substituant sur le groupe éthylénique.
Figure 50 : Évolution relative des niveaux d'énergie en fonction du nombre d'instaurations.

CHAPITRE 3

SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

- Figure 51** : Représentation schématique du spectre électromagnétique, montrant les processus moléculaires représentatifs qui se produisent dans chaque région.
Figure 52 : Représentation schématique des transitions vibrationnelles correspondant à l'absorption infrarouge.
Figure 53 : Absorption infrarouges des groupes.
Figure 54 : Liste des éléments diatomiques.
Figure 55 : Spectre Infrarouge de l'éthanol.
Figure 56 : l'aspect des bandes d'absorption.
Figure 57 : Schémas de l'allongement symétrique.
Figure 58 : Schémas de l'allongement asymétrique.
Figure 59 : Schémas générale de déformation.
Figure 60 : Schémas cisaillement (scissoring).
Figure 61 : Schémas rotation plane (rocking).
Figure 62 : Schémas agitation (wagging).
Figure 63 : Schémas torsion (twisting).
Figure 64 : Schémas des modes de vibration de H₂O.
Figure 65 : Schémas des modes de vibration de CO₂.
Figure 66 : Schéma de fonctionnement d'un spectromètre à double faisceau.
Figure 67 : Schéma de principe d'un spectromètre à transformée de Fourier.

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Tableau 1 : Classification de la chromatographie liquide à haute performance basée.

Tableau 2 : Structure et utilisation des phases liées au siloxane.

Tableau 3 : Détecteurs utilisés en chromatographie liquide haute performance.

Tableau 4 : Propriétés de certains supports de terre de diatomées.

Tableau 5 : Composés utilisés et signification des constantes de McReynolds.

CHAPITRE 2 SPECTROSCOPIE MOLECULAIRE UV – VISIBLE

Tableau 6 : Spectre UV Visible.

Tableau 7 : Exemples de transitions électroniques pour quelques composés.

Tableau 8 : Règle de WOODWARD-FIESER : Système d'incrémention pour calculer le maximum d'absorption (λ_{\max}) pour les diènes conjugués (dans l'éthanol).

Tableau 9 : Règle de WOODWARD-FIESER : Système d'incrémention pour calculer le maximum d'absorption (λ_{\max}) pour les composés carbonylés α,β -insaturés (dans l'éthanol).

CHAPITRE 3 SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Tableau 10 : Nombre de mode de vibration.

Tableau 11 : Fréquence de vibration (Atome – Hydrogène).

Tableau 12 : Variation de la fréquence de vibration avec le nombre de liaison.

Tableau 13 : Variation de la fréquence de vibration avec la longueur de la liaison.

Tableau 14 : Fréquences d'allongement et de déformation de quelques groupes d'atomes

Avant-propos

Le présent ouvrage, polycopie de cours intitulé Techniques d'analyse est un support de cours destiné essentiellement aux étudiants de la 3^{ème} année licence (LMD) de la filière génie des procédés. Il peut également servir aux étudiants de pharmacie, de licence et master, en chimie ou en biologie.

Ce polycopié est le résultat des enseignements que j'ai effectué, il est élaboré pour permettre à l'étudiant de mieux connaître les principales méthodes physiques d'analyse. Acquérir les bases de l'analyse et du contrôle de la qualité des produits, qui est indispensable pour les industries chimiques, pharmaceutiques et alimentaires et dans les problèmes d'environnement

Le polycopié est composé de trois chapitres :

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques.

Chapitre 2 : Spectroscopie moléculaire UV – Visible.

Chapitre 3 : Spectroscopie infrarouge.

CHAPITRE 1

METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

1. GÉNÉRALITÉS SUR LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

1.1. INTRODUCTION

Il est intéressant de noter que, malgré l'acceptation générale des contributions de Tswett comme étant parmi les premiers à préconiser l'adsorption dans la technologie de séparation, ce chercheur n'est pas le véritable découvreur de la chromatographie. La chromatographie a peut-être commencé en 1855 lorsque Runge a publié ses travaux sur la séparation des colorants sur papier.

Peut-être faut-il attribuer le véritable début de l'analyse chromatographique à Coppelsroeder, qui présenta certains de ses travaux en 1861, et à Schonbein, qui décrivait la séparation des substances adsorbées sur du papier filtre. Fischer et Schmidner étaient au courant de ces travaux selon leurs rapports parus en 1892.

Cependant, le concept de séparations sur colonnes pourrait être attribué aux travaux de Reed, qui a décrit certaines de ses premières expériences utilisant des colonnes en 1893. Day, en 1897, a démontré l'utilisation de colonnes pour la séparation des fractions pétrolières. Peu de temps après, Engler et Albrecht ont suivi avec des descriptions du fractionnement en collectant les éluants d'une colonne. Il y a eu d'autres travailleurs pendant cette période qui pratiquaient (la chromatographie) avant que Tswett ne publie son travail sur la séparation des fragments.

La (redécouverte) de la chromatographie telle qu'elle est connue aujourd'hui date des rapports de séparations sur colonnes de Kahn et Lederer. Lederer a séparé les caroténoïdes du jaune d'œuf après avoir lu les descriptions de la chromatographie de Tswett.

1.2. DEFINITION

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation, au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée, des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux.

Les applications de ce procédé sont donc potentiellement très nombreuses, d'autant plus que beaucoup de mélanges hétérogènes ou sous forme solide peuvent être mis en solution par emploi d'un solvant (celui-ci apparaissant comme un composé supplémentaire).

L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit (Figure 1) :

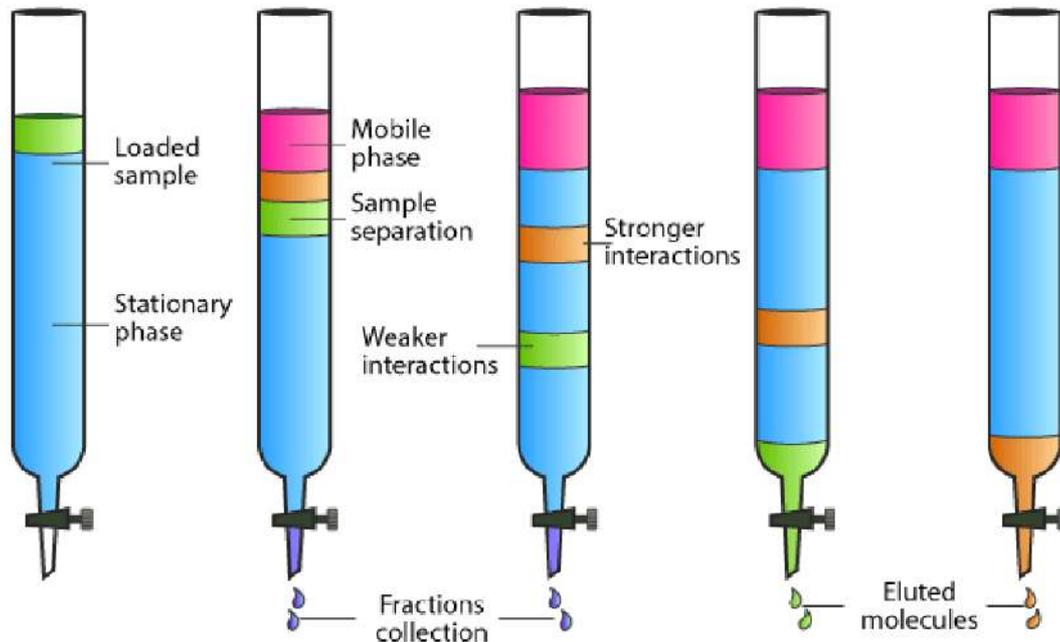


Figure 1 : L'expérience de base en chromatographie.

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

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

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

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

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

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

La technique s'est considérablement améliorée depuis ses débuts. On dispose actuellement de chromatographes pilotés par des logiciels qui rassemblent autour d'une colonne performante et miniaturisée – pour pouvoir séparer des microquantités d'échantillon – tout un ensemble d'accessoires destinés à assurer la répétabilité des expériences successives par la maîtrise parfaite des différents paramètres de séparation. Pour des analyses successives d'un même échantillon, réalisées dans des conditions identiques à plusieurs heures d'intervalle, les temps de rétention sont reproductibles à la seconde près (figure 2).

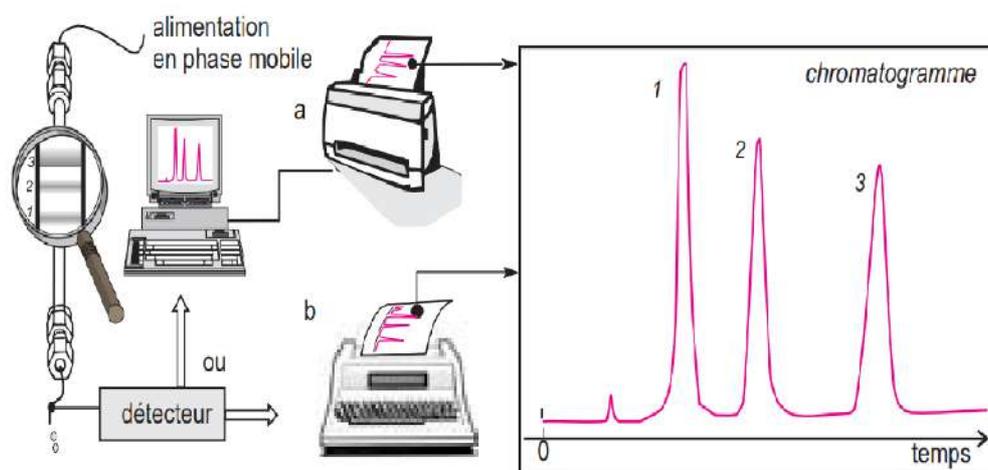


Figure 2 : Principe de l'analyse par chromatographie.

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

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

1.3. CLASSIFICATION DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

On peut classer les méthodes chromatographiques de trois manières :

- selon la nature des phases
- selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation
- selon la technologie mise en œuvre.

1.3.1. Classification selon la nature des phases

Selon la nature de **la phase mobile** on distingue:

- la chromatographie en phase liquide CPL
- la chromatographie en phase gazeuse CPG
- la chromatographie en phase supercritique CPS

Selon la nature de **la phase stationnaire** on distingue:

- la chromatographie gaz / solide CGS
- la chromatographie gaz / liquide CGL
- la chromatographie liquide / solide CLS
- la chromatographie liquide / liquide CLL

1.3.2. Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. On distingue ainsi :

A) La chromatographie d'adsorption

La séparation entre les molécules est fondée sur le processus répété d'adsorption et désorption par la phase stationnaire. Dans les premières études les phases stationnaires « modèles d'études » étaient la silice et la cellulose. En conséquence, les phénomènes étudiés correspondaient essentiellement à des interactions de type liaison hydrogène.

D'autres phases ont été utilisées depuis avec des mécanismes d'échange impliquant des liaisons Van der Waals, hydrogène et des interactions hydrophobes. Il s'agit d'une chromatographie liquide- solide.

B) La chromatographie de partage

La séparation est fondée sur les différences de solubilité des molécules à séparer entre phase mobile et phase stationnaire liquide (phase qui imprègne ou qui est greffée sur un solide). Il s'agit alors de chromatographie liquide-liquide (CLL).

C) La chromatographie d'échange d'ions

La phase stationnaire est un solide à la surface duquel se trouvent des groupements ionisés. La rétention des solutés ce fait grâce à des interactions de type ioniques.

D) La chromatographie d'exclusion

La phase stationnaire est un solide poreux les molécules sont séparé selon leur forme et leur masse moléculaire.

E) La chromatographie d'affinité

Elle consiste à fixer par exemple une enzyme sur la phase stationnaire

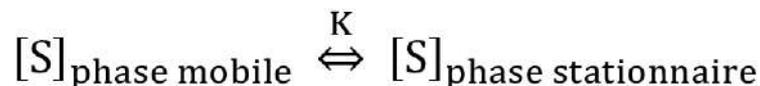
1.3.3. Classification selon la technique mise en jeu

Selon le support de la chromatographie on distingue :

- la chromatographie sur colonne
- la chromatographie planaire (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

2. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE

Le principe de la chromatographie repose sur l'équilibre de concentrations des composés (soluté S) présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire et la phase mobile (gaz ou liquide) qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...).



L'élution d'un soluté S en chromatographie est donc caractérisé par la constante d'équilibre K, appelée aussi constante de partition, de distribution ou constante de Nernst.

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

$$K = \frac{[S]_{\text{phase stationnaire}}}{[S]_{\text{phase mobile}}}$$

Les facteurs qui contrôlent la séparation sont surtout d'ordre thermodynamique: la rétention de l'échantillon sur la colonne est donc contrôlée thermodynamiquement.

$$\ln K = \frac{-\Delta_r G^\circ}{RT} \quad (1)$$

K varie avec la température **T**.

$\Delta_r G^\circ$: Energie libre (J) de dissolution du soluté **S** entre les 2 phases.

R : Constante des gaz parfaits ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)

T : Température (K°)

K est $\gg 1$ donc $\Delta_r G^\circ$ est négative.

2.1. GRANDEURS FONDAMENTALES ET DEFINITIONS

2.1.1. Notion de temps

A) Temps de rétention t_r

Un constituant est caractérisé par son temps de rétention t_r qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Le temps de rétention est indépendant de la quantité injectée.

B) Temps mort t_m

Le temps mort t_m est le temps mis par un soluté non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).

C) Temps de rétention réduit t_r'

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du soluté t_r' . En d'autres termes c'est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t_r' = t_r - t_m \quad (2)$$

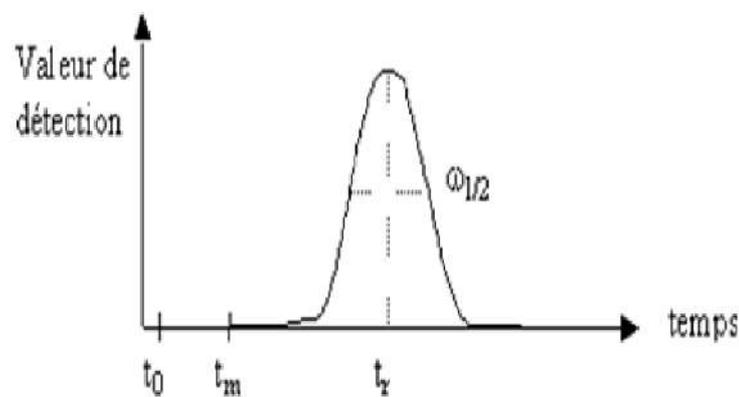


Figure 3 : Caractéristique d'un pic d'élution en chromatographie.

Ici t_0 est le temps du début de l'injection, cependant dans certains ouvrages il symbolise le temps mort.

2.1.2. Notion de volume

A) Volume d'élution ou volume de rétention V_r

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

$$V_r = t_r \cdot D \quad (3)$$

B) Volume d'un pic, V_{pic}

Il correspond au volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne. Il vaut par définition :

$$V_{pic} = \omega \cdot D \quad (4)$$

ω : correspond à la largeur du pic à la base.

C) Volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort V_m)

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

$$V_m = t_m \cdot D \quad (5)$$

D) Volume de la phase stationnaire

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

2.1.3. Notion de concentration

En chromatographie chaque soluté injecté dans la colonne est soumis à deux effets antagonistes : un effet d'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble et un effet de rétention avec la phase stationnaire avec laquelle il interagit. On caractérise la distribution de chaque soluté entre les deux phases par le coefficient de partage ou coefficient de distribution.

A) Coefficient de partage

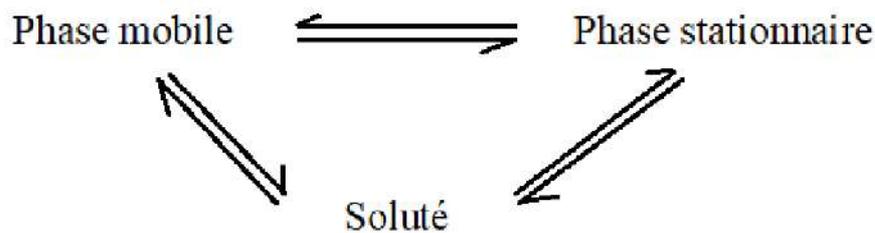
A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K .

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (6)$$

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.



B) Facteur de capacité K'

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

$$K' = \frac{C_s}{C_m} \times \frac{V_s}{V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m} \quad (7)$$

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 :

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (8)$$

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

$$t_r = t_m(K' + 1) \quad (9)$$

Remarque : La mesure de t_m peut se faire en injectant un composé dont on est sûr qu'il n'est pas retenu sur la colonne dans les conditions choisies.

Compte tenu des équations 3 et 5 le volume de rétention V_r d'un soluté pourra s'écrire :

$$V_r = V_m(K' + 1) \quad (10)$$

Ou :

$$V_r = (K'V_s + V_m) \quad (11)$$

2.1.4. Notion d'efficacité

A) Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par le nombre de plateaux théorique N_{th} .

B) Model des plateaux théoriques

Une colonne de N plateaux théoriques est une colonne divisée en N petits disques cylindriques successifs. On admet que la phase mobile progresse non pas de façon

continue, mais par sauts successifs d'un plateau théorique à l'autre. Dans chaque plateau théorique, on observe une rétention du soluté S, du fait de l'équilibre de ce produit entre la phase mobile $[S]_{pm}$ et la phase stationnaire $[S]_{ps}$.

Une colonne réelle aura donc "N plateaux théoriques" si elle se comporte comme une "colonne à distiller théorique" de N_{th} plateaux.

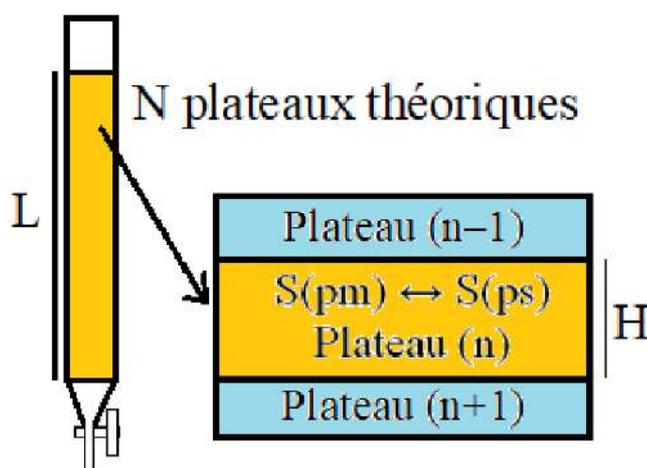


Figure 4 : Model des plateaux théoriques.

Dans cette théorie, les pics de chromatographie ont une forme gaussienne et la variance σ^2 est reliée au nombre de plateaux théoriques N_{th} et au temps de rétention t_r par la relation:

$$N\sigma^2 = (t_r)^2 \quad (12)$$

N augmente donc avec le temps de rétention et diminue si la largeur des pics (σ) augmente.

D'après la relation 12, une « bonne » colonne de chromatographie qui conduit à des pics fins (σ petit) pour des temps de rétention (t_r) élevés, est donc caractérisée par un nombre de plateaux théoriques N_{th} élevé.

Sur le chromatogramme (Figure 3), σ représente la demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur et t_r le temps de rétention du composé. t_r et σ doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant). Si on exprime σ en unités de volume (en faisant intervenir le débit), 4σ correspond au

volume du pic, soit 95 % du composé injecté. Par suite des propriétés de la courbe de Gauss ($\omega = 4\sigma$), il en résulte l'équation 13.

$$N = 16 \frac{t_r^2}{\omega^2} \quad (13)$$

Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée : on utilise de préférence la formule équivalente 14.

$$N = 5,54 \frac{t_r^2}{\delta^2} \quad (14)$$

δ : Largeur du pic à demi-hauteur.

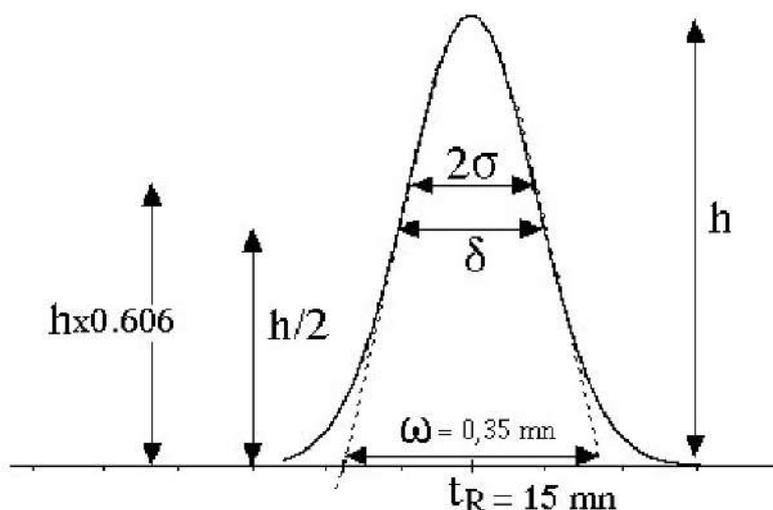


Figure 5 : Caractéristiques d'un pic chromatographique.

C) Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

N_{eff} est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser N_{eff} (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{\text{eff}} = 16 \frac{t_r'^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{t_r'^2}{\delta^2} \quad (15)$$

D) Hauteur équivalent à un plateau théorique H

Connaissant la longueur L de la colonne et le nombre de plateaux théoriques N on définit une Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT ou H).

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N} \quad (16)$$

La HEPT permet de comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs. Elle est fonction de différents paramètres qui eux-mêmes sont susceptibles de varier avec la vitesse de la phase mobile.

En HPLC les HEPT sont comprises entre 0,001 et 1 mm. Dans la théorie des plateaux, la $\text{HEPT} = \frac{L \cdot \sigma^2}{t_r^2}$ déduite de la variance n'apparaît que comme une mesure globale de l'influence de tous les paramètres expérimentaux. Divers modèles ont été élaborés pour préciser les divers paramètres intervenant dans l'élargissement des pics.

E) Modèle cinétique de la chromatographie

Ce modèle issu de la mécanique des fluides a été mis au point par **Jan Jozef van Deemter**. En 1956, ce physicien a mis au point l'équation (17) qui relie H ou (HEPT) aux caractéristiques physiques de la colonne et de la phase mobile.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (17)$$

Trois facteurs, représentés par les 3 termes de l'équation 17, contribuent à l'élargissement des pics.

➤ Diffusion turbulente (Terme A)

Suivant la taille et la forme des particules, ils existent pour la phase mobile,

plusieurs trajets possibles, cette particularité contribue à l'élargissement des pics d'où $A = 2.l.dp$

l : Constante voisine de 1.

dp : Diamètre moyen des particules.

Donc, plus les particules sont petites et plus le remplissage est homogène, plus l'efficacité de la colonne augmente.

La contribution de A est nulle pour une colonne capillaire de chromatographie en phase gazeuse.

➤ Diffusion longitudinale (Terme B)

Le terme B/u traduit la dispersion du soluté à cause de la diffusion du soluté dans la colonne. Par exemple, dans un flux liquide, les molécules au centre du flux progressent plus vite que celles qui sont sur les bords au contact des particules; on a $B = 2.\gamma.D_m$ où γ est une constante ($\gamma < 1$) et D_m est le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

Le terme B/u est évidemment inversement proportionnel à u . L'efficacité d'une colonne augmente avec la vitesse de la phase mobile. Ceci peut expliquer les bonnes séparations obtenues en HPLC; de plus, comme le terme D_m est environ 5 fois plus grand en CPG qu'en CPL, il en résulte que la contribution de la diffusion longitudinale est presque négligeable en HPLC.

➤ Résistance au transfert de masse (Terme C)

Ce terme $C.u$ représente la résistance au transfert du soluté entre les phases mobiles et stationnaires, cette résistance empêche l'établissement de l'équilibre entre S_{pm} et S_{ps} . Ce phénomène est dû par exemple au fait que certaines molécules stagnent dans les pores de la phase stationnaire.

Plus la vitesse (u) de la phase mobile diminue, plus les molécules de soluté peuvent pénétrer dans la phase stationnaire, plus l'équilibre entre les 2 phases est favorisé et

plus la colonne est performante.

Le terme **C** est proportionnel à (dp^2/D_m) , les colonnes les plus efficaces seront celles régulièrement remplies et bien tassées où le diamètre des particules est le plus faible possible. Il faut également utiliser des solvants de faible viscosité pour minimiser ce terme.

F) Courbe de Van Deemter

La représentation graphique de l'équation (17) est appelée courbe de Van Deemter (figure 4). L'analyse de cette courbe montre l'existence d'un débit optimal de phase mobile pour lequel l'efficacité de la colonne est maximum (HEPT minimum).

Réduire le débit de la phase mobile en deçà de ce débit optimal peut diminuer fortement le pouvoir séparatif d'une colonne, surtout en CPG où la contribution du terme B/u est importante.

Contrairement à la CPG, en HPLC au-dessus du débit optimal, l'efficacité de la colonne est pratiquement indépendante du débit de la phase mobile. Ceci permet de raccourcir les temps d'analyse, sans perdre trop de pouvoir de séparation.

Ils existent d'autres formulations de l'équation de Van Deemter plus adaptées à la HPLC

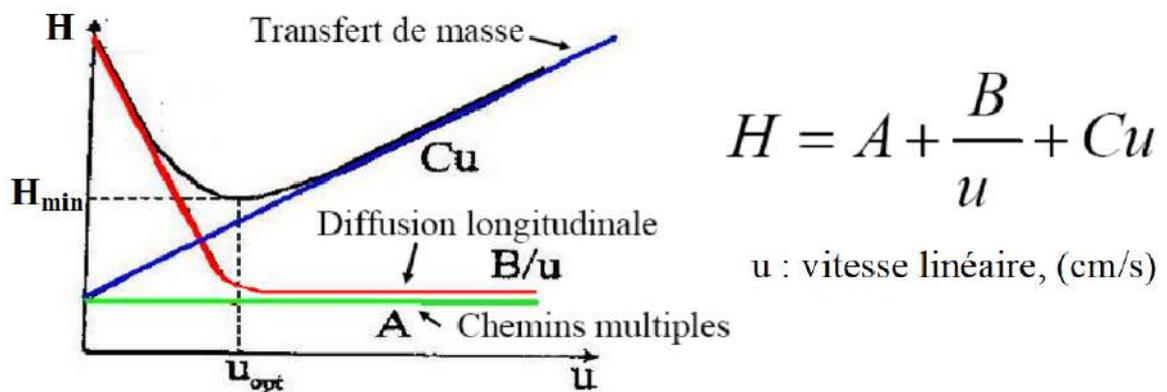


Figure 6 : Courbe de Van Deemter.

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

Les trois coefficients numériques expérimentaux A, B et C sont reliés à divers paramètres physico-chimiques, à la colonne et aux conditions opératoires. Si on choisit d'exprimer H en cm, A sera en cm, B en cm²/s et C en s (la vitesse étant en cm/s). La courbe représentative de cette fonction est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum (H_{\min}) pour : $u_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{B}{C}}$

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire.

2.2. QUALITE DE LA SEPARATION

2.2.1. Sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité :

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m} = \frac{K'_2}{K'_1} \quad (18)$$

Le facteur de sélectivité mesure la différence de distribution thermodynamique des deux composés. On démontre que si $\Delta(\Delta G^\circ) = \Delta G^\circ_2 - \Delta G^\circ_1$ (différence des énergies libres de distribution des deux composés) on a : $\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \ln \alpha$

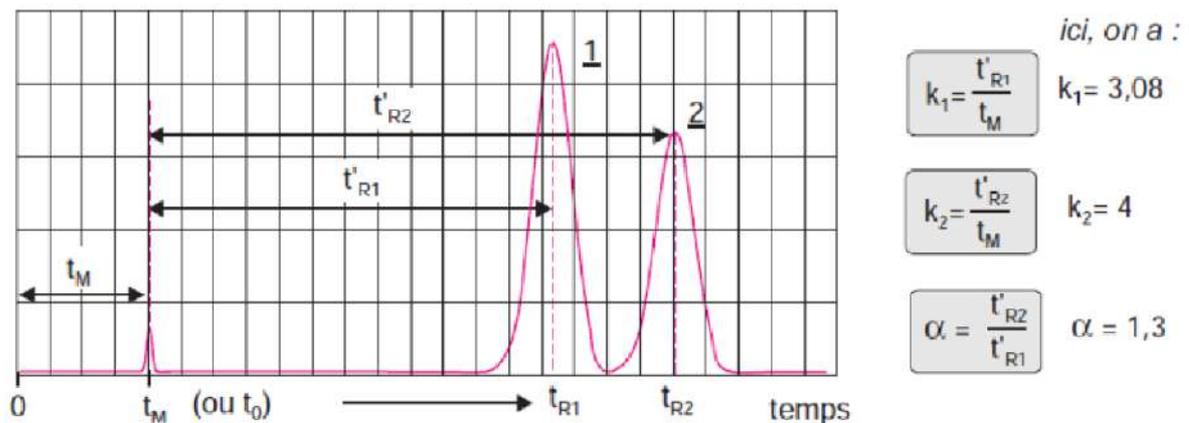


Figure 7 : Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents.

2.2.2. Résolution

Si dans certaines conditions, deux constituants sortent à des temps proches, leurs pics risquent de se chevaucher. En optimisant les conditions analytiques, il est possible d'améliorer l'allure du chromatogramme. Le paramètre de résolution R quantifie la qualité de cette séparation. Bien qu'on la mesure, en général, sur deux pics contigus, elle peut être calculée sur n'importe quel couple de pics.

$$R = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_2 + \omega_1} \quad (19)$$

$R < 1$: mauvaise résolution

$1 < R < 1,4$: résolution acceptable

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale

$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé

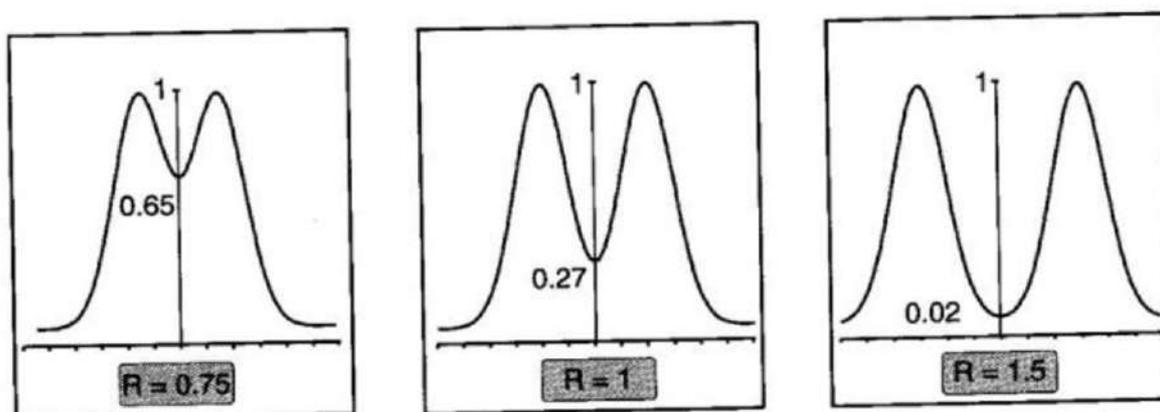


Figure 8 : Influence du terme R sur la séparation de deux pics d'intensité égale.

Remarque : Si les pics sont gaussiens $\omega = 1,7 \delta$

Il est parfois utile d'exprimer cette résolution en fonction de la sélectivité et de l'efficacité du dernier des deux pics étudiés.

$$R = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{K'_B}{1 + K'_B} \times \sqrt{N_{th}} = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \sqrt{N_{eff}} \quad (20)$$

2.3. NOTION DE PRESSION

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement. Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression plus la granulométrie de la phase stationnaire est faible.

En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars. La perte de charge qui est la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne est donnée par **la loi de Darcy** :

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L u}{D^2} \quad (21)$$

Φ : facteur de résistance à l'écoulement (sans dimension)

D : diamètre moyen des particules (m)

η : viscosité (Pa.s)

L : longueur de la colonne (m)

u : vitesse de la phase mobile (m.s⁻¹)

3. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

3.1. INTRODUCTION

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique de séparation qui peut être appliquée pour analyser des composés de différentes propriétés, des substances de masse moléculaire faible à très élevée. Cette séparation chromatographique consiste à faire passer un mélange dissous dans une phase mobile à travers un autre matériau appelé phase stationnaire, et les phases mobile et stationnaire sont non miscibles.

En fonction de la nature, de la structure chimique et du poids moléculaire des analytes, nous pouvons sélectionner le type de chromatographie liquide. En ce sens, différents types de HPLC ont émergé pour permettre des informations qualitatives et quantitatives concernant les composants individuels de l'échantillon à l'étude.

Le nom "HPLC" provient de la haute pression, qui a commencé à être utilisée pour réduire le temps d'analyse. Après de nombreuses étapes de développement, les instruments pouvaient fonctionner jusqu'à une pression de (400 bars). Avec l'amélioration des colonnes et des détecteurs, un développement essentiel a été réalisé en termes de performances. Son nom a donc été changé en HPLC entre le milieu et la fin des années 1970. Pendant ce temps, de nouvelles méthodes, notamment la chromatographie liquide en phase inverse, ont permis d'améliorer la séparation entre des composés très similaires.

Dans les années 1980, les ordinateurs et l'automatisation ont rendu l'analyse HPLC plus pratique. Au début du 21^e siècle, un nouveau niveau de performance a été atteint grâce à une nouvelle amélioration de la technologie des colonnes utilisant un adsorbant de plus petite taille de particules (1,8 μm) et avec une instrumentation développée qui permettait l'application d'une pression élevée jusqu'à 1000 bars pour délivrer le solvant. Par conséquent, la résolution, la vitesse et la sensibilité ont été augmentées. Cette nouvelle technologie est appelée chromatographie liquide ultra performante (UPLC).

De nos jours, les méthodes HPLC en continu sont généralement utilisées, ce qui signifie que les composés sont détectés en ligne après le processus de séparation. Les détecteurs utilisés en HPLC peuvent être de nature très diverse. En effet, l'HPLC est couplée à différents systèmes de détection, tels que la spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis), la spectrométrie de masse (MS), la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie Raman à transformée de Fourier (FTR) pour analyser des mélanges complexes de composés, par séparation, identification et quantification.

3.2. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

3.2.1. Principes de la séparation chromatographique

La chromatographie liquide est une technique de séparation dans laquelle les composants à séparer sont répartis entre deux phases, dont l'une est stationnaire (phase stationnaire) tandis que l'autre (la phase mobile) est un liquide qui se déplace dans une direction définie. Dans ce cas, les différents composants d'un échantillon sont transportés dans la phase mobile à travers une phase stationnaire. Les analytes ont en général des interactions différentes avec les phases mobile et stationnaire. Comme la phase stationnaire est fixe, les solutés qui ont des interactions plus fortes avec la phase stationnaire auront tendance à se déplacer plus lentement que les autres qui ont des interactions plus faibles ou nulles avec la phase stationnaire qui auront tendance à se déplacer plus rapidement. Par conséquent, les séparations chromatographiques dépendent de la force des interactions des analytes avec les phases. Ces interactions entre les deux, analytes et phases, déterminent le temps de passage des analytes dans la colonne et l'élargissement du pic. Par conséquent, les composés sont élués de la colonne et atteignent le détecteur à des moments différents en étant surveillés par le détecteur au cours d'une analyse chromatographique (Figure 9).

Le temps nécessaire à un analyte pour traverser la colonne après l'injection jusqu'à ce que l'analyte atteigne le détecteur est appelé le temps de rétention (t_R). Si l'échantillon contient des espèces non retenues, ces espèces se déplacent avec la

phase mobile et le temps passé par ces espèces à quitter la colonne est appelé temps mort de la colonne ou temps de rétention (t_0). Le temps que les molécules passent dans la phase stationnaire est appelé temps de rétention corrigé (t_r'), qui est calculé comme la différence entre le temps de rétention et le temps mort :

$$t_r' = t_r - t_m \quad (2)$$

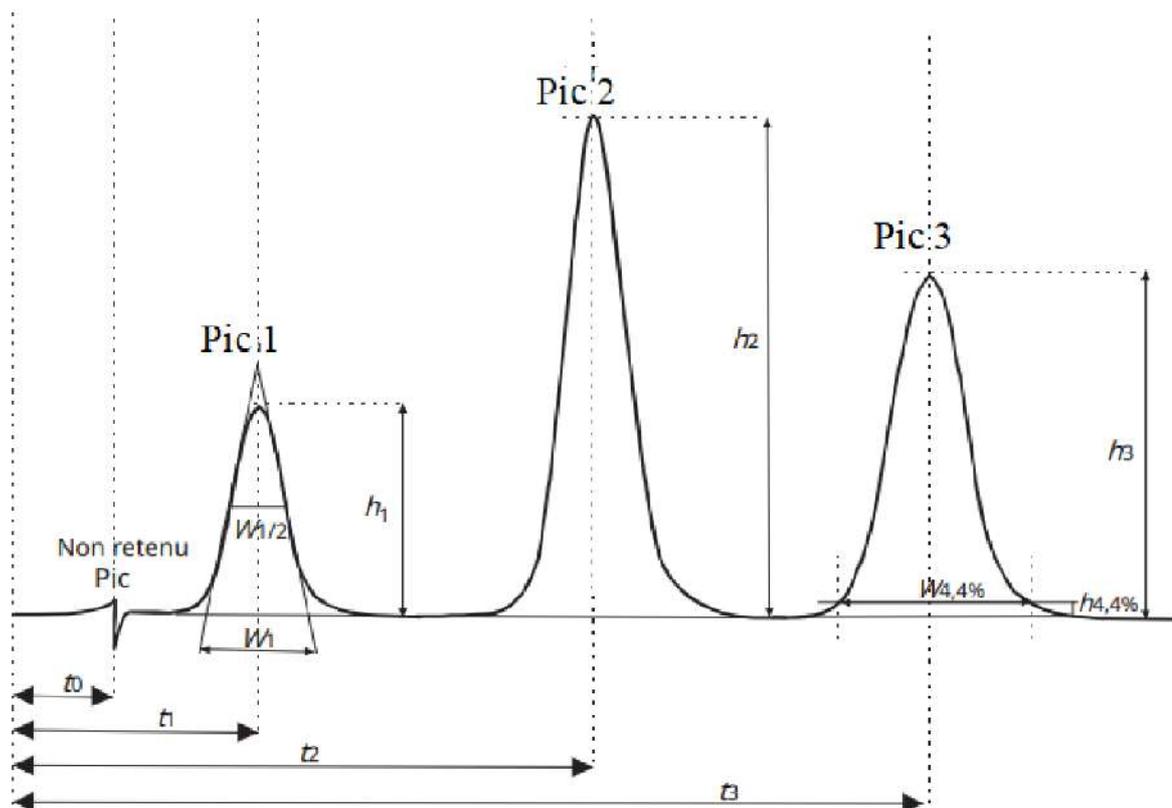


Figure 9 : Pics chromatographiques et leurs attributs. (t_0 , temps de rétention ou temps mort de la colonne ; t_{1-3} , temps de rétention ; h_{1-3} , hauteur du pic ; w , largeur du pic ; $w_{1/2}$, largeur de pic mesurée à mi-hauteur de pic ; $w_{4,4\%}$, largeur de pic mesurée à 4,4% de hauteur de pic ($h_{4,4\%}$)).

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

Comme les liquides peuvent être considérés comme incompressibles, en chromatographie liquide, la rétention est généralement mesurée en unités de temps par commodité.

Le rapport entre le temps de rétention corrigé et le temps mort est le facteur de capacité du composé, qui caractérise la séparation. Le facteur de capacité est calculé comme suit

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (8)$$

où K est le facteur de capacité. La rétention relative de deux composants voisins est décrite par la formule suivante :

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m} = \frac{K'_2}{K'_1} \quad (18)$$

où α est le facteur de séparation. Le facteur de séparation est également appelé rétention relative ou sélectivité relative.

Au fur et à mesure que les molécules éluent dans la colonne, la zone des composés s'élargit continuellement lors de leur passage. Pour obtenir une bonne séparation, il est nécessaire d'éviter l'élargissement du pic. La largeur du pic est directement liée à l'efficacité de la séparation ou efficacité de la colonne. Pour comprendre le concept d'efficacité de la colonne, il est nécessaire d'introduire deux concepts : le nombre de plateaux théoriques (N) et la hauteur équivalente au plateau théorique (H ou HETP). Ces deux paramètres sont liés par l'équation suivante :

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (16)$$

où L est la longueur de la colonne.

Lorsque le même analyte traverse la colonne, il subit de multiples équilibres entre la phase mobile et la phase stationnaire qui peuvent être comparés à de multiples processus d'extraction. Par conséquent, la chromatographie sur colonne peut être considérée comme une colonne constituée de nombreuses couches étroites et

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

continues, appelées plateaux théoriques. Selon cette théorie, une colonne chromatographique sera divisée en plateaux théoriques où l'efficacité de la séparation augmentera en augmentant le nombre de plateaux théoriques (N) ou en réduisant la hauteur des plateaux théoriques (H).

Le numéro de plateaux théorique peut être calculé à l'aide de la formule suivante :

$$N_{\text{eff}} = 16 \frac{t_r'^2}{w^2} \quad (15)$$

où a est une constante dépendant de la hauteur du pic, où elle est mesurée ; t_r est le temps de rétention relatif du pic chromatographique ; et w est la largeur du pic (distance entre l'intersection de la ligne de base et la ligne tangente aux deux côtés du pic) (Figure 9).

La valeur a diffère selon la méthode de calcul : 5,57, largeur de pic à mi-hauteur ($w_{1/2}$) ; 25, à 4,4% de hauteur; et 16, au départ.

En ce qui concerne la hauteur de la plaque théorique (H), trois facteurs principaux contribuent à ce paramètre, qui est intégré dans l'équation de Van Deemter :

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (17)$$

A est le terme pour la diffusion tourbillonnaire en anglais « eddy diffusion » ou les effets de chemins multiples. Ce facteur fait référence au fait que la colonne est remplie de phase stationnaire et que toutes les molécules d'analyte ne suivront pas le même chemin à travers la phase stationnaire pour traverser la colonne. Par conséquent, un élargissement de la bande se produira car tous les chemins n'ont pas la même longueur. La diffusion tourbillonnaire aura sa propre contribution à la hauteur d'un plateau théorique, et dépendra d'une constante qui varie avec le garnissage de la colonne et le diamètre des particules de la phase stationnaire.

B est le terme désignant la diffusion longitudinale. L'élargissement du pic se produit parce que les molécules d'analyte diffusent à partir de la région centrale du pic où la concentration est plus élevée que les régions diluées situées devant et derrière le

centre du pic. Ce processus d'élargissement de la bande est inversement proportionnel à la vitesse de la phase mobile. Par conséquent, la diffusion longitudinale n'est pas très importante en HPLC, sauf à faible débit, mais elle est très importante en chromatographie en phase gazeuse (GC) en raison du coefficient de diffusion élevé des gaz.

C est le coefficient de transfert de masse et u est la vitesse linéaire de la phase mobile. Afin d'obtenir une faible valeur de H et de réaliser une séparation efficace, il faut utiliser un support de petites particules, des éluants de faible viscosité et une colonne plus longue. La relation entre H et le débit de la phase mobile dépend fortement de la taille des particules. H devient presque indépendant du débit à une très petite taille de particules. Dans ce cas, des séparations plus rapides peuvent être réalisées, en utilisant des débits plus élevés, sans affecter H , et donc l'élargissement de la bande.

Le degré de séparation de deux pics est caractérisé par la séparation relative, à savoir par la résolution. La résolution de deux pics peut être calculée à partir de variables chromatographiques réglables telles que la sélectivité, l'efficacité et le facteur de capacité des composés séparés par la formule suivante :

$$R = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{K'_B}{1 + K'_B} \times \sqrt{N_{th}} \quad (20)$$

où K' est la moyenne du facteur de capacité des deux pics d'intérêt. Si R est de 1,25, la séparation de deux pics est considérée comme satisfaisante.

La résolution est proportionnelle à l'expression $\left(\frac{K'_B}{1+K'_B}\right)$. Ceci suggère la nécessité d'optimiser les temps de rétention (le facteur de capacité dépend du temps de rétention).

De nombreux pics chromatographiques ne présentent pas le schéma d'une distribution normale gaussienne. Le plateau théorique n'est pas affecté par les anomalies chromatographiques (Figure 10) telles que la "queue" et le "front" des pics.

La formule pour donner l'asymétrie d'un pic, c'est-à-dire le facteur d'asymétrie, peut être calculée à partir de la forme du pic :

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (22)$$

où a est la distance entre le pic maximum et le front du pic, mesurée à 10 % de la hauteur du pic, et b est la distance entre le pic maximum et la queue du pic, mesurée à 10 % de la hauteur du pic.

3.2.2. Classification des techniques de chromatographie en phase liquide

La technique de chromatographie en phase liquide peut être divisée en plusieurs classes basées sur le type de phase stationnaire, des interactions qui se produisent entre la phase mobile et la phase stationnaire, et de leur équilibre. Le tableau 1 présente cette classification.

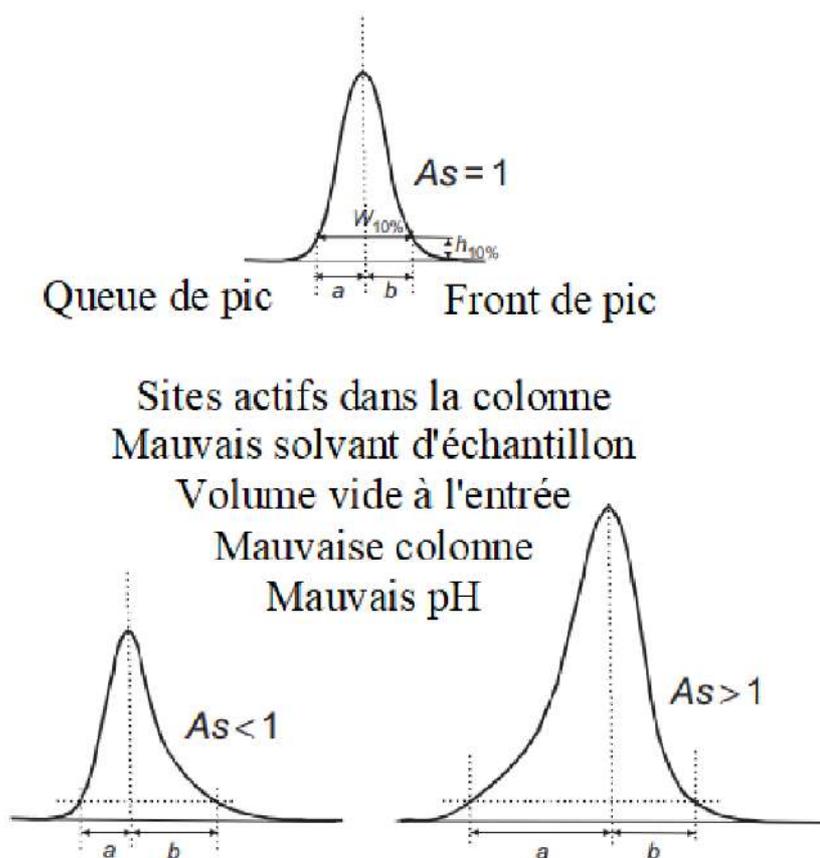


Figure 10 : Anomalies des pics chromatographiques. Comme facteur d'asymétrie, $w_{10\%}$ de largeur de pic mesurée à 10% de hauteur de pic ($h_{10\%}$).

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

Lorsque la phase mobile est liquide et la phase stationnaire est liquide, deux principes de séparation peuvent avoir lieu : l'exclusion par la taille et la distribution entre deux liquides non miscibles (phases mobile et stationnaire).

La chromatographie d'exclusion de taille est une technique puissante qui s'applique particulièrement aux espèces de poids moléculaire élevé.

Les lits chromatographiques sont constitués de petites particules polymériques ou de silice ($\sim 10\mu\text{m}$) contenant des pores uniformes. Les molécules peuvent passer à travers les pores en étant efficacement piégées à l'intérieur et éliminées du flux de la phase mobile. Les molécules dont la taille est supérieure à celle des pores ne sont pas retenues et s'éluent plus rapidement de la colonne, tandis que les molécules plus petites qui passent à travers les pores ont besoin de plus de temps pour s'éluer de la colonne. Les séparations par exclusion de taille n'impliquent pas d'interaction chimique ou physique entre l'analyte et la phase stationnaire. En effet, il est important d'éviter ce type d'interaction car elle est à l'origine de mauvaises performances de la colonne. En général, lorsqu'une solution aqueuse est utilisée pour transporter l'échantillon à travers la colonne, la technique est appelée chromatographie par filtration sur gel, par opposition à la chromatographie par perméation sur gel, qui est utilisée lorsqu'un solvant organique est utilisé comme phase mobile. La principale application de la chromatographie par filtration sur gel est l'isolement des protéines et d'autres polymères hydrosolubles, tandis que la chromatographie par perméation de gel est utilisée pour analyser la distribution de la masse moléculaire des polymères organiques solubles.

Dans la chromatographie de répartition, la phase stationnaire utilisée peut être un liquide supporté sur un solide (paroi de la colonne ou autre support solide) ou des espèces organiques liées à la surface du solide. Les analytes sont distribués entre les phases en fonction de leur force d'interaction avec chacune des phases, ce qui entraîne la séparation des différents composants de l'échantillon. La chromatographie de répartition peut être divisée en deux types selon la polarité des phases mobile et stationnaire. La chromatographie de répartition en phase normale utilise une phase stationnaire polaire et un solvant organique non polaire comme

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

phase mobile. En revanche, la chromatographie de partage en phase inversée utilise une phase stationnaire relativement non polaire et une phase mobile polaire.

Tableau 1 : Classification de la chromatographie liquide à haute performance basée.

Interaction	Phase stationnaire	Équilibre
Liquide/liquide (LLC=LC)	Liquide adsorbé sur un solide	Séparation entre deux liquides non miscibles
Liquide/phase greffée (BPLC)	Les espèces organiques liées à la surface solide	Séparation entre phase liquide et phase greffée
Liquide/solide (LSC et TLC)	Solide	Adsorption
Échange ionique (IEC/SIC)	Résine échangeuse d'ions	Échange d'ions
Exclusion (SEC/GPC/GFC)	Liquide interstitiel dans un polymère solide	Partition / tamis

Lorsque la phase mobile est liquide et que la phase stationnaire est solide, le phénomène qui se produit est l'adsorption. Dans la chromatographie d'adsorption, la phase stationnaire est un solide dont la surface comporte des emplacements actifs. Ce type de chromatographie est basé sur une interaction directe et réversible des analytes avec les places actives à la surface de la phase stationnaire.

Trois interactions différentes peuvent avoir lieu entre les analytes et la phase stationnaire :

- Adsorption non spécifique ; chromatographie d'adsorption
- Electrostatique ; chromatographie d'échange d'ions
- Liaison biologique par affinité ; chromatographie d'affinité

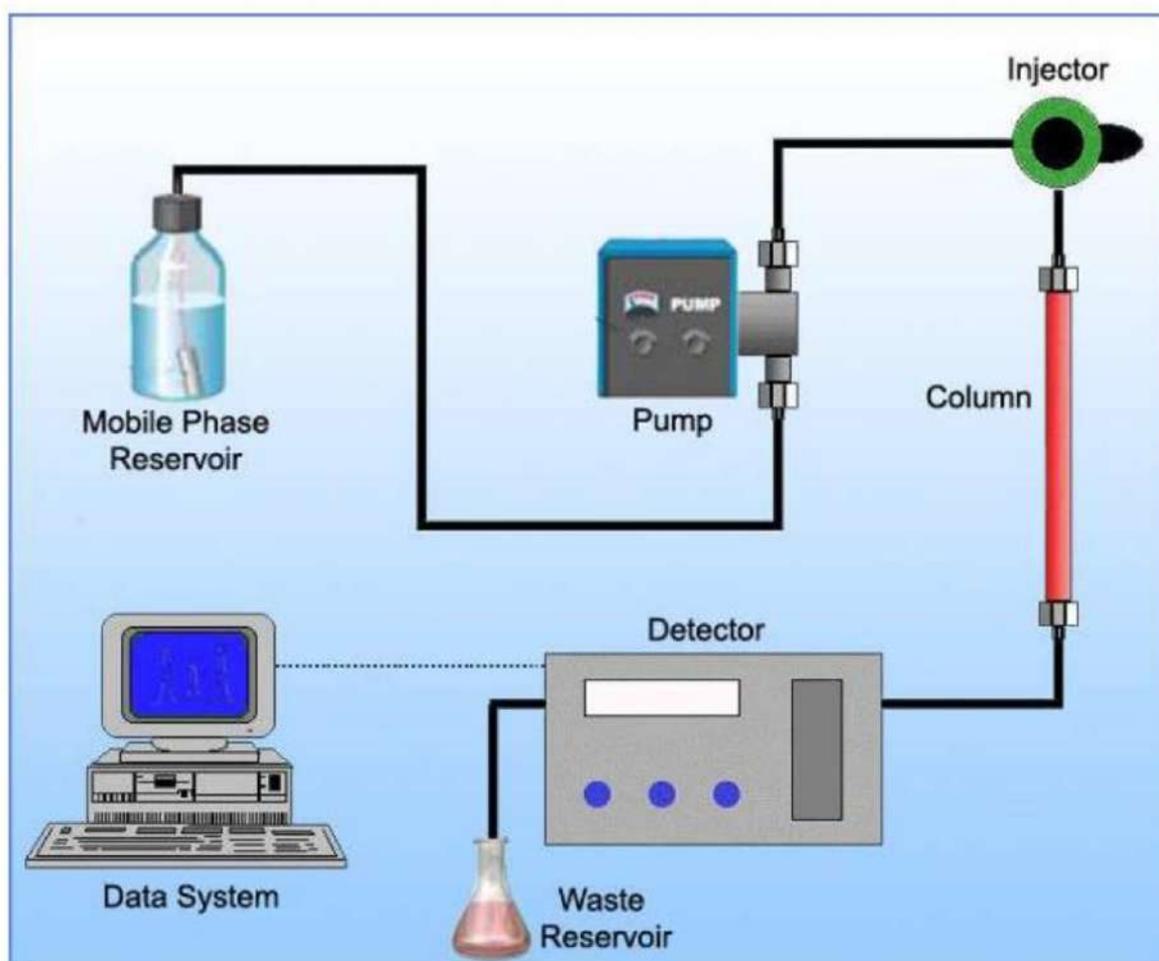


Figure 11 : Schéma d'un système HPLC.

3.3. INSTRUMENTATION

Un système HPLC moderne est équipé d'un système de distribution de solvant, d'un injecteur d'échantillon, d'une colonne, d'un système de détection et d'une station de données informatique. La figure 11 montre le schéma d'un instrument HPLC.

3.3.1. Système de distribution de solvant

Le système de distribution de solvant en chromatographie liquide est composé de réservoirs de solvant, de pompes haute pression, de clapets anti-retour, de régulateurs de débit, d'une chambre de mélange, d'un amortisseur d'impulsions et de capteurs de pression. En ce qui concerne les réservoirs de solvant, les systèmes HPLC modernes sont équipés d'un ou de plusieurs réservoirs en verre ou en acier

inoxydable de 200 – 2000 mL. Les solvants contiennent souvent des gaz dissous et de la poussière qui peuvent provoquer un étalement de la bande et interférer avec les performances des détecteurs. Pour cette raison, les réservoirs de solvant comprennent un traitement du solvant qui élimine les gaz et les poussières, et par conséquent il est possible d'obtenir une meilleure résolution, d'améliorer le fonctionnement du système de pompe, d'augmenter la durée de vie de la colonne, et de réduire le fond du signal de base. Deux étapes différentes ont été incluses dans la procédure de traitement du solvant : la filtration et l'évitement de la présence de gaz. En effet, les réservoirs en verre ou en acier inoxydable sont équipés de filtres pour éliminer les particules solides en suspension de la phase mobile. En outre, les systèmes de distribution de solvants sont équipés de dégazeurs, qui peuvent consister en un système de pompage sous vide, un système de distillation, un dispositif de chauffage et d'agitation, ou un système de barbotage, dans lequel les gaz dissous sont balayés de la solution par de fines bulles d'un gaz inerte qui n'est pas soluble dans la phase mobile.

En ce qui concerne la pompe, le système doit être capable d'acheminer les solvants des réservoirs à travers l'ensemble du chromatographe à haute pression (jusqu'à 1200 bars), à une large gamme de débit ($0,1 - 10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), avec une fluctuation minimale du débit, garantissant la reproductibilité du temps de rétention et la stabilité de la ligne de base du détecteur. Les pompes les plus courantes sont les pompes à mouvement alternatif et les pompes volumétriques. Dans les pompes à mouvement alternatif, un piston à mouvement alternatif entraîné par un moteur contrôle le débit de la phase mobile à l'aide de deux clapets à bille qui s'ouvrent et se ferment avec le mouvement du piston. Le débit n'est donc pas continu et il est nécessaire de l'amortir. Ceci est réalisé à l'aide d'amortisseurs d'impulsions qui sont des tubes capillaires à long enroulement. Les pompes volumétriques sont composées d'un piston à moteur unidirectionnel qui pousse la phase mobile présente dans une chambre semblable à une seringue. Le volume des pompes volumétriques est limité, ce qui n'est pas très pratique. Un débit constant est généralement obtenu avec les pompes de type seringue.

Les instruments HPLC modernes sont équipés de différents fournisseurs de solvants et d'une chambre de mélange. Le rapport volumique des solvants peut être modifié de façon linéaire ou exponentielle pendant le temps d'exécution. Par conséquent, les systèmes de distribution de solvants peuvent fonctionner selon deux modes d'élution différents : l'élution isocratique et l'élution par gradient. Dans le cas d'une élution isocratique, après le début de l'élution, le rapport de solvants est maintenu constant pendant toute la durée du cycle chromatographique. Les principaux inconvénients de cette méthode sont que dans ces conditions chromatographiques, un mélange de composants, ceux qui ont une polarité similaire à la phase mobile, ne sont pas bien séparés. En outre, l'élution de tous les composés prend beaucoup de temps. Lorsque l'élution par gradient est appliquée, le le taux de solvant est modifié au cours du passage suivant un gradient linéaire ou un gradient linéaire à plusieurs étapes. Deux ou trois solvants différents, de polarité sensiblement différente, sont utilisés, ce qui permet de séparer les analytes en un temps d'analyse plus court.

En mélangeant les solvants dans la chambre de mélange, la pompe à haute pression assure la composition constante de l'éluant pendant la séparation isocratique, tandis que l'augmentation de la force de l'éluant dans le temps doit être atteinte pendant l'élution par gradient.

3.3.2 Système d'injection d'échantillon

Le système d'injection de l'échantillon sert à introduire l'échantillon liquide dans le flux de la phase mobile. Les principales exigences en matière d'injection d'échantillon sont de conserver les caractéristiques de l'échantillon et de pouvoir résister aux pressions élevées du système. Le facteur limitant la précision des mesures en chromatographie liquide est la répétabilité de l'injection de l'échantillon. Le principal problème que l'on peut rencontrer est la déformation des pics ou même le double pic. Il est donc important de travailler avec un petit volume d'injection, et d'introduire l'échantillon sans dépressuriser le système. L'injection des échantillons dans la colonne peut être archivée manuellement ou par une procédure d'auto-injection.

La valve rotative est de loin le système d'injection le plus populaire. Malgré les nombreux types de vannes d'injection disponibles, elles fonctionnent pratiquement toutes sur un principe plus ou moins identique. Une boucle d'échantillon externe ou une cavité interne est remplie de l'échantillon, puis, en actionnant le rotateur, la boucle d'échantillon ou la cavité est placée dans la ligne d'écoulement et l'échantillon est balayé sur la colonne par l'éluant. Après l'injection, le rotateur est remis en marche et la boucle ou la cavité d'échantillon peut être remplie avec l'échantillon suivant. Ce type d'introduction d'échantillon permet de travailler avec différentes capacités de boucles et de valves (c'est-à-dire de 0,5 à 500 μL). L'échantillon peut être introduit à une pression de travail élevée.

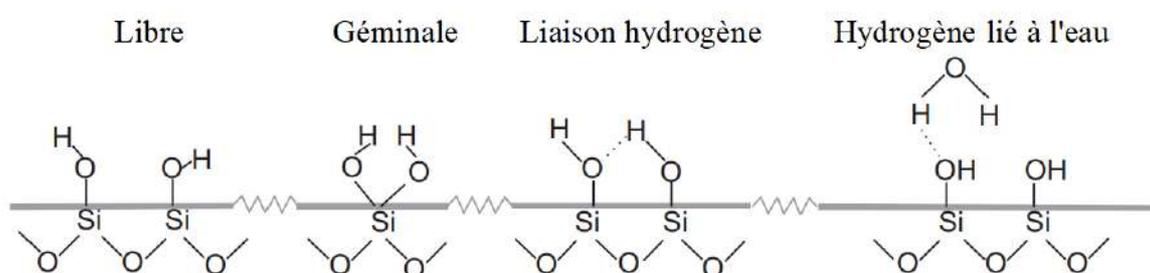
3.3.3. Colonne

Les colonnes de chromatographie liquide sont généralement construites à partir de tubes en acier inoxydable à alésage lisse, bien que l'on rencontre parfois des tubes en verre à paroi épaisse. Afin d'améliorer la résolution des pics et la sensibilité, en plus de nécessiter moins de temps et de solvant, on utilise des matériaux de remplissage de petites dimensions et de petite taille. Le diamètre d'une colonne dans la séparation analytique est d'environ 2-5 mm ; sa longueur est d'environ 10-30 cm. Parfois, la température est contrôlée par un four à colonne. Souvent, une courte colonne de garde est introduite avant la colonne analytique pour augmenter la durée de vie de la colonne analytique en éliminant les particules et les contaminants des solvants. La composition du garnissage de la colonne de garde doit être similaire à celle de la colonne analytique, mais la taille des particules est généralement plus grande, afin de minimiser la chute de pression.

Les matériaux de garnissage des colonnes HPLC peuvent être regroupés en fonction de différentes caractéristiques : solides rigides, gels fermes ou mous ; parties en forme de boule ou irrégulières ; intérieur poreux ou surface poreuse. Les caractéristiques des matériaux d'emballage introduits dans les colonnes varient en fonction des méthodes chromatographiques. Le gel de silice est l'adsorbant le plus fréquemment utilisé en chromatographie des liquides car il possède plusieurs attributs qui peuvent être appliqués en HPLC.

La stabilité mécanique est un critère crucial pour les particules remplies dans la colonne. Lors d'une séparation sous haute pression, il ne faut pas que les particules se détachent, car cela diminue l'efficacité cinétique de la colonne. Le gel de silice est un matériau poreux ; la taille (6-20 nm) des pores détermine la surface par unité de particules ($50-50 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). La taille moyenne des particules utilisées en HPLC est de 3-10 μm . Les groupes silanol ont un pH acide. Le nombre et l'activité des groupes silanol à la surface des particules de gel de silice affectent la polarité du gel de silice (Figure 12).

Groupes silanol



Siloxane

Figure 12 : Groupes silanol de différentes activités sur la surface du gel de silice.

De nos jours, presque tous les matériaux de vieillissement des paquets liés chimiquement et encapsulés dans des polymères sont préparés à partir d'un substrat de silice macroporeux. Les phases encapsulées par des polymères sont préparées en recouvrant la surface de la silice d'une fine couche immobilisée de polymère. Les phases liées sont préparées par la réaction de groupes silanol libres sur la surface avec un organosilane réactif. L'inconvénient des phases liées à base de silice est la gamme limitée de pH 2-8 dans leur application. À faible pH, l'hydrolyse de l'alkyl siloxane existe, tandis qu'à pH élevé, la solubilité du gel de silice limite son utilisation. Plusieurs facteurs (l'activité de l'organosilane, le solvant, le temps de réaction catalytique, la température, etc. Le tableau 2 montre la structure de certaines phases liées au siloxane appliquées en HPLC.

Tableau 2 : Structure et utilisation des phases liées au siloxane.

Phases	Application	Structure
C ₁	Matériaux en phase inversée avec moins de rétention que le C ₁₈ , utiles pour la chromatographie par paire d'ions, la chromatographie par interaction hydrophobe, la séparation des protéines et des peptides.	-Si-CH ₃
C ₂		-Si-C ₂ H ₅
C ₃		-Si-C ₃ H ₇
C ₄		-Si-C ₄ H ₉
C ₆		-Si-C ₆ H ₁₃
C ₈		-Si-C ₈ H ₁₇
C ₁₈	Matériau classique à phase inversée pour la séparation d'un grand nombre de composés, du petit poids moléculaire aux protéines.	-Si-C ₁₈ H ₃₇
C ₃₀	Matériau en phase inversée, utile pour la séparation des caroténoïdes	-Si-C ₃₀ H ₆₁
Phényl	Matériau en phase inversée, utile pour la séparation des composés aromatiques, utile pour la séparation des protéines et des peptides	-Si-C ₃ H ₆ -Φ
CN	Matériel à la fois en phase inverse et en phase normale, échangeur d'anions faible	-Si-C ₃ H ₆ -CN
NH ₂	Matériel à la fois en phase inverse et en phase normale, échangeur d'anions faible	-Si-C ₃ H ₆ -NH ₂
NO ₂	Matériau en phase normale, utile pour la séparation des composés aromatiques et des composés contenant des doubles liaisons	-Si-C ₃ H ₆ -NO ₂
OH	Matériel en phase inverse et en phase normale, utile pour la séparation des protéines, des peptides (chromatographie par filtration sur gel)	-Si-C ₃ H ₆ -O-CH ₂ -CH(OH)-CH(OH)
SAX	Matériau échangeur d'anions fort pour la séparation des bases (nucléotides, nucléosides) ou des acides organiques	-Si-C ₃ H ₆ -N ⁺ -(CH ₃) ₃
SCX	Matériau échangeur de cations puissant pour la séparation des acides organiques	-Si-C ₃ H ₆ -SO ₂ -OH
WCX	Matériau échangeur de cations faible pour la séparation des acides organiques, utile pour les protéines basiques et les peptides.	-Si-CH ₂ -COOH
WAX	Matériau échangeur d'anions faible pour les protéines et les peptides acides	-Si-C ₃ H ₆ -N-(CH ₂ CH ₃) ₂

3.3.4 Système de détection

Le détecteur est le composant qui émet une réponse générée par le composé de l'échantillon en élution, puis les signaux sont transformés en pics sur le chromatogramme. Il est positionné immédiatement après la phase stationnaire afin de détecter les composés lors de leur élution de la colonne. Il existe plusieurs critères pour un détecteur performant, tels que la sensibilité à une faible concentration de l'analyte, un petit volume de détection pour éviter un élargissement supplémentaire de la bande, une réponse rapide aux changements de concentration de l'échantillon, un faible niveau de dérive et de bruit (particulièrement crucial dans l'analyse des traces), une simplicité non destructive, robuste et opérationnelle, et la fiabilité. Les performances des détecteurs sont caractérisées par le volume de la cellule du détecteur, la plage dynamique et linéaire du détecteur (Figure 13), la faible limite de détection, le bruit du détecteur et la constante de temps.

En fonction des caractéristiques physiques et chimiques des composants, des détecteurs appropriés doivent être choisis pour être utilisés en HPLC. Le détecteur universel sensible, qui pourrait être utilisé pour détecter presque tous les composés, n'existe pas en chromatographie liquide. Cependant, les différents types de détecteurs énumérés dans le tableau 3 sont considérés comme adaptés à la CLHP. Normalement, la nature des analytes détermine le type de détecteur à appliquer dans une étude.

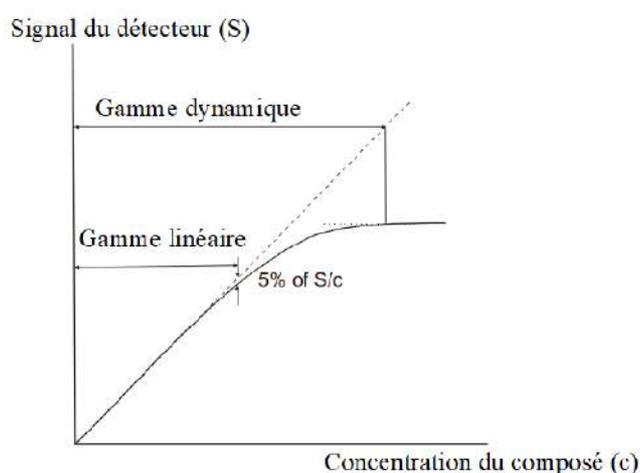


Figure 13 : Gamme dynamique et linéaire des détecteurs.

Tableau 3 : Détecteurs utilisés en chromatographie liquide haute performance.

Détecteurs	Limite de détection (ng)
Indice de réfraction (IR)	Environ 10-100
Détecteur à diffusion de lumière (LS) ou détecteur à diffusion de lumière par évaporation (ELS)	Environ 0,1
Détecteur d'ultraviolet (UV)-visible (Vis)	Environ 0,1
Détecteur électrochimique	Environ 0,01-0,001
Détecteur de conductivité	Environ 1-10
Détecteur de fluorescence	Environ 0,01-0,001
Détecteur de spectrométrie de masse (MS)	Environ 0,1-0,001

Parmi ces détecteurs, les analyseurs spectrophotométriques, de fluorescence, d'indice de réfraction (RI), de diffusion de la lumière par évaporation et de masse sont les systèmes de détection les plus couramment couplés à la CLHP. L'analyseur spectrophotométrique mesure la quantité de lumière qu'un échantillon absorbe. L'instrument fonctionne en faisant passer un faisceau de lumière à travers l'éluat et en mesurant l'intensité de la lumière qui atteint un détecteur. Les chromophores qui peuvent être détectés par les spectrophotomètres UV/Vis impliquent toujours une liaison multiple (telle que $C=C$, $C=O$, ou $C\equiv N$) et peuvent être conjugués avec d'autres groupes pour former des chromophores complexes.

Le détecteur de fluorescence repose sur le principe selon lequel certains composés réagissent par fluorescence lorsqu'ils sont bombardés de lumière UV. Ces détecteurs

sont très spécifiques et sélectifs, ce qui peut être un avantage pour réduire les interférences, mais cela limite également le nombre de composés pouvant être analysés par détection de fluorescence. Les détecteurs de fluorescence sont parmi les plus sensibles des détecteurs HPLC, et selon le composé, ils peuvent être de 10 à 1000 fois plus sensibles que les détecteurs UV analysant des composés absorbant fortement les UV.

Le détecteur RI consiste à mesurer la variation du RI de l'effluent de la colonne traversant la cellule d'écoulement. Ces détecteurs sont non spécifiques et peuvent détecter tout analyte dont l'IR est différent de celui de la phase mobile. Contrairement au détecteur de fluorescence, le détecteur RI est l'un des moins sensibles (environ 1000 fois moins sensible que les détecteurs UV). Il est également sensible aux changements de température, de pression et de débit ambiants et n'est généralement pas compatible avec l'élution par gradient. Si l'on utilise l'élution par gradient, la phase mobile transportant l'échantillon et la phase mobile de la cellule de référence doivent correspondre exactement. Il est très difficile et coûteux d'y parvenir, c'est pourquoi l'élution par gradient n'est pas souvent utilisée avec le détecteur RI. Les détecteurs RI sont souvent utilisés pour l'analyse des hydrates de carbone. Les hydrates de carbone ne sont généralement pas ioniques, ne sont pas fluorescents et n'absorbent pas beaucoup les UV ou la lumière visible. Les glucides sont également présents en concentrations assez élevées dans les échantillons alimentaires, de sorte que la faible sensibilité de ce détecteur peut ne pas être un problème.

Le détecteur à diffusion de lumière par évaporation est relativement peu sélectif, mais ne peut être utilisé que pour les composés non volatils. Le flux de la colonne est nébulisé avec un courant de gaz inerte. Dans ce scénario, la phase mobile est évaporée, laissant de minuscules particules des analytes. Les particules sont passées à travers un faisceau laser et elles diffusent la lumière laser. Cette méthode de détection ne peut pas être utilisée avec des tampons ou d'autres additifs qui ne sont pas volatils car ils interféreraient avec la détection. Pour la plupart des applications, elle est probablement encore moins sensible que le détecteur RI.

De nos jours, des systèmes HPLC couplés à la MS sont disponibles dans plusieurs laboratoires. Le MS est basé sur la séparation dans le vide des ions en phase gazeuse en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Pour tout analyseur MS, les analytes sont d'abord ionisés puisque le détecteur ne mesure que les particules chargées. Les particules chargées entrent ensuite dans les spectromètres de masse qui fonctionnent sous vide et séparent les ions sur la base de leur masse en utilisant un champ magnétique. Couplage de la chromatographie liquide au spectromètre de masse : la phase mobile doit être éliminée avant que les analytes puissent entrer dans le détecteur. Un certain nombre d'interfaces ont été développées pour résoudre ce problème (c'est-à-dire l'électrospray, le spray ionique et le thermospray). Après analyse, les spectres de masse peuvent représenter de nombreux types d'informations différentes en fonction du spectromètre de masse spécifique utilisé et de l'expérience spécifique appliquée. En effet, le spectre de masse donne des informations sur les rapports isotopiques des analytes, et il peut également fournir les masses moléculaires d'une molécule ou d'un ion. La formule moléculaire peut être calculée soit à partir des schémas isotopiques, soit à partir de masses moléculaires précises, pour lesquelles l'utilisation de spectromètres de masse à haute résolution qui ont un pouvoir de résolution $\approx 0,001$ Da est nécessaire. Ainsi, les informations obtenues à partir d'un spectre de masse peuvent être traitées à l'aide de différents logiciels commerciaux disponibles, qui fournissent une liste de formules moléculaires possibles en utilisant à la fois des masses moléculaires précises et des modèles isotopiques. Outre les informations décrites ci-dessus, plusieurs analyseurs MS permettent des expériences MS/MS. Ces analyses induisent une fragmentation ionique qui peut offrir des informations structurales précieuses en produisant divers ions fragmentaires caractéristiques, qui, avec leurs compositions élémentaires, peuvent renforcer la confiance dans l'identification des composés.

3.4. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

La préparation de l'échantillon est une étape nécessaire avant l'analyse, au cours de laquelle l'isolement d'une fraction spécifique ou d'un composé cible est effectué à

l'aide de différents procédés et de leur combinaison (c'est-à-dire extraction, concentration, dérivation et nettoyage). Le choix du système d'extraction approprié dépend de la nature de l'aliment (matrice), de la structure chimique des composés, des interactions entre la matrice et les composés cibles, et du niveau de concentration auquel l'analyse doit être effectuée. La littérature a révélé de nombreuses procédures d'extraction des analytes, l'extraction par solvant et par sorbant étant les plus couramment utilisées.

En ce qui concerne l'extraction par solvant, l'extraction solide-liquide et liquide-liquide joue toujours un rôle central dans l'extraction d'analytes cibles à partir de matrices, car ces méthodologies sont bon marché et faciles à mettre en œuvre. Néanmoins, un certain nombre de nouvelles techniques moins consommatrices de temps et de solvants font leur apparition dans ce domaine : l'extraction assistée par ultrasons (UAE), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction assistée par pression (PLE) et l'extraction par fluide supercritique (SFE). L'EAU est une méthode d'extraction solide-liquide basée sur la rupture mécanique des tissus de la matrice sous l'effet des ondes de pression ultrasonores et des phénomènes de cavitation qui en résultent. L'EMA est un procédé qui consiste à chauffer les solvants en contact avec un échantillon avec de l'énergie micro-ondes pour séparer les composés d'intérêt analytique de la matrice de l'échantillon dans le solvant. Deux phénomènes différents se produisent dans le processus d'extraction par micro-ondes : la rotation dipolaire et la conduction ionique. La PLE, également connue sous le nom d'extraction accélérée par solvant (ASE), utilise des solvants à une pression et une température élevées afin d'augmenter l'efficacité du processus d'extraction. La pression élevée maintient le solvant à l'état liquide, ce qui permet des extractions sûres et rapides. Elle utilise des solvants classiques à des températures (30-200°C) et des pressions (1500 psi) élevées pour améliorer l'extraction des analytes des matériaux solides. L'ESF implique l'utilisation de solvants comprimés à une température et une pression critiques égales ou supérieures à celles-ci pour extraire les analytes ciblés. Un fluide supercritique présente des propriétés physico-chimiques intermédiaires entre celles des liquides et des gaz.

Dans le cas des échantillons liquides, l'extraction en phase solide (SPE) a résolu bon nombre des problèmes associés à l'extraction liquide-liquide, tels que les séparations de phases incomplètes, les récupérations moins que quantitatives ou l'utilisation de grandes quantités de solvants organiques. La SPE utilise l'affinité des solutés dissous ou en suspension dans un liquide (matrice) pour un solide (sorbant) à travers lequel on fait passer le liquide. En conséquence, le ou les analytes d'intérêt sont retenus sur le sorbant et sont collectés par lavage avec un solvant approprié. Il existe une grande variété de sorbants capables de séparer les analytes en fonction de leurs propriétés chimiques. Parmi les variantes de la méthode, citons : la SPE en phase inversée, qui fait intervenir une matrice polaire/modérément polaire et un sorbant non polaire ; la SPE en phase normale, qui implique l'utilisation d'un sorbant polaire avec une matrice non polaire ; la SPE par échange ionique, dans laquelle les composés d'intérêt sont chargés en solution ; et la SPE par adsorption, dans laquelle les analytes sont adsorbés sur des sorbants modifiés, entre autres.

4. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

4.1. INTRODUCTION

Bien que la chromatographie soit fondamentalement une technique de séparation, sa grande capacité à analyser des échantillons complexes a conduit à son utilisation croissante comme technique analytique. Cette utilisation a conduit au développement d'une instrumentation qui, utilisant toujours la séparation par élution, peut fonctionner en continu, avec une plus grande efficacité dans la séparation et un meilleur contrôle des conditions chromatographiques pour augmenter la reproductibilité des résultats.

Parmi les techniques chromatographiques utilisées à des fins analytiques, la chromatographie en phase gazeuse est probablement la technique la plus répandue ; aucune autre technique analytique ne peut offrir ses performances de séparation ou sa sensibilité lors de l'analyse de composés volatils. D'autre part, le fait qu'avec cette technique les mélanges soient séparés en phase gazeuse établit les limites de son utilisation, qui seront fondamentalement marquées par la stabilité thermique des composés à séparer. En général, l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse est limitée à la séparation de composés dont le poids moléculaire est inférieur à 1000, à une température de travail maximale d'environ 400 °C ; dans ces conditions, la seule limitation sera la stabilité thermique de l'échantillon.

Pour effectuer une séparation par chromatographie en phase gazeuse, une petite quantité de l'échantillon à séparer est injectée dans un courant de gaz inerte à haute température ; ce courant gazeux traverse une colonne chromatographique qui va séparer les composants du mélange par un mécanisme de partage (chromatographie gaz-liquide), par adsorption (chromatographie gaz-solide) ou, dans de nombreux cas, par un mélange des deux. Les composants séparés sortiront de la colonne à intervalles discrets et passeront par un système de détection approprié ou seront dirigés vers un dispositif de collecte d'échantillons.

4.2. DESCRIPTION DE L'ÉQUIPEMENT

Le schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse est illustré à la figure 14.

Les composants fondamentaux d'un chromatographe en phase gazeuse sont :

- Source de gaz
- Système d'injection
- Four et colonne chromatographique
- Système de détection
- Système d'enregistrement

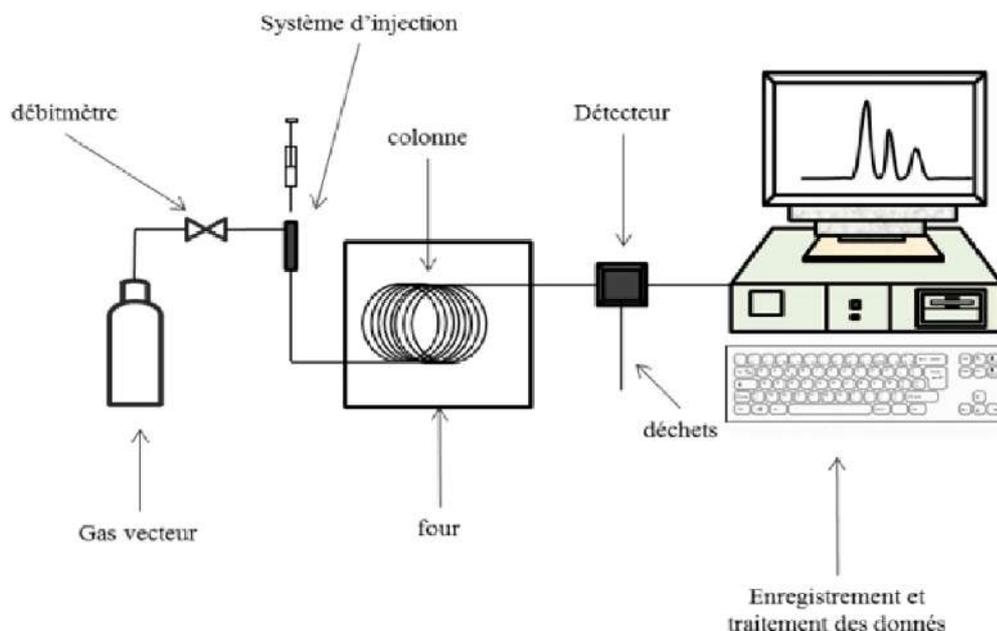


Figure 14 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.

Les gaz vecteurs utilisés en chromatographie n'affectent pas en principe la séparation puisqu'ils n'ont aucune influence sur les processus de sorption-désorption ou de partage qui se produisent dans la colonne, et n'affectent donc pas la sélectivité de la colonne ; Cependant, les termes de diffusion dans la phase mobile de l'équation de Van Deemter dépendent de la nature du gaz porteur, de sorte que les courbes HEPT (Figure 15) seront légèrement différentes pour chaque type de gaz,

ce qui influencera la vitesse optimale de la phase mobile et par conséquent les temps d'analyse.

Quel que soit l'effet que la nature du gaz vecteur peut avoir sur la hauteur de la plaque, le choix d'un type de gaz ou d'un autre sera déterminé principalement par le système de détection utilisé. Des bouteilles de gaz comprimé de haute pureté, capables de fournir une pression de gaz adéquate et constante, sont généralement utilisées comme sources de gaz vecteur ; Il est à noter que dans de nombreux cas il est nécessaire d'éliminer les traces d'impuretés que le gaz peut contenir (principalement O_2 et H_2O) qui peuvent affecter le système chromatographique, au moyen de filtres appropriés. Le contrôle de la vitesse du gaz vecteur à travers la colonne s'effectue au moyen de vannes qui fournissent un débit constant (colonnes à garnissage) ou maintiennent constante la pression constante en tête de colonne (systèmes capillaires).

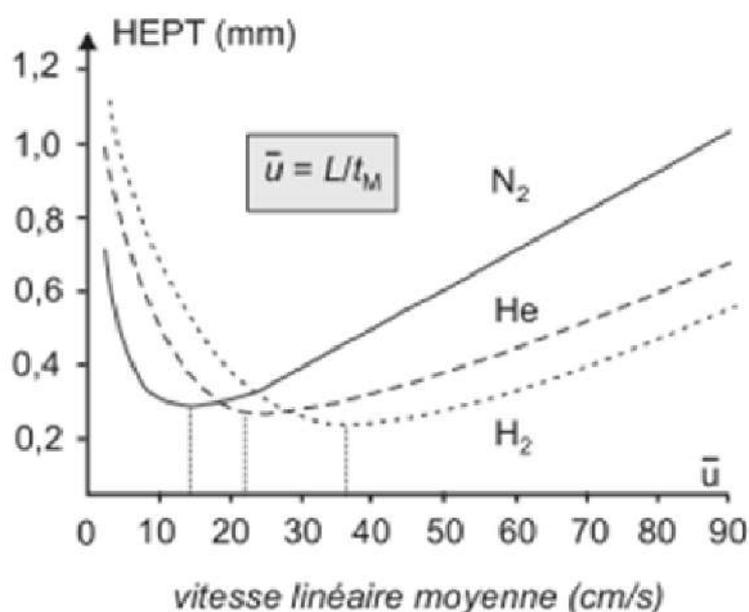


Figure 15 : Courbes HEPT pour trois gaz vecteurs couramment utilisés.

Le four d'un chromatographe en phase gazeuse a pour tâche de maintenir la colonne thermostatée à une température très précisément réglée (± 1 °C près) ; d'autre part, il est nécessaire que la commande de thermostatisation du four permette

d'augmenter la température du four à un rythme préétabli et constant (pour travailler avec des techniques de température programmée). Évidemment, la première exigence est facile à satisfaire, mais lorsqu'un fonctionnement à température programmée est requis, le four doit répondre à une série d'exigences telles qu'une faible inertie thermique (en particulier si des rampes de température très rapides sont nécessaires) et disposant d'un système de contrôle de température très sophistiqué qui inclut la possibilité de programmer d'éventuelles variations de température du four ainsi que les heures auxquelles elles doivent être effectuées.

4.3. SYSTÈMES D'INTRODUCTION DES ÉCHANTILLONS

En principe, les dispositifs d'injection d'échantillons pour la chromatographie en phase gazeuse ont pour tâche de vaporiser l'échantillon à analyser et de l'incorporer dans le flux de gaz porteur qui est dirigé vers la colonne. La vaporisation et l'introduction des échantillons dans le système doivent être effectuées en respectant une série d'exigences :

- La vaporisation de l'échantillon doit être la plus rapide possible
- La vaporisation doit être effectuée sans discrimination d'aucun composant de l'échantillon
- L'échantillon doit atteindre la colonne sous la forme d'une bande la plus fine possible.

4.3.1. Injecteurs pour colonnes garnies

L'injection d'échantillons dans les colonnes garnies ne présente pas de problèmes particuliers ; les colonnes garnies peuvent traiter des quantités relativement importantes d'échantillons, et l'injection de quelques microlitres d'échantillons n'entraîne pas une diminution sensible de l'efficacité de la colonne. La plupart des chromatographes commerciaux utilisent des chambres d'injection thermostatées (Figure 16).

Fondamentalement, un injecteur est constitué d'un bloc métallique, bon conducteur de chaleur, équipé d'un système de chauffage, d'un thermostat capable de maintenir

une température constante et d'une isolation thermique adéquate ; le système d'injection est logé à l'intérieur de ce four (Figure 16). Dans ce système, le gaz porteur, préalablement chauffé, passe en continu à travers le système ; l'échantillon est injecté dans la chambre, au moyen d'une microseringue de précision, à travers un diaphragme perforé (septum) avec une capacité d'auto-étanchéité lorsque l'aiguille est retirée ; une fois l'échantillon injecté, il est instantanément vaporisé, se mélangeant avec le gaz porteur dans une chambre de mélange ("liner") faite d'un matériau aussi inerte que possible (acier inoxydable, nickel, verre ou quartz). L'échantillon, une fois vaporisé, est rapidement entraîné par le courant de gaz porteur dans la direction de la colonne.

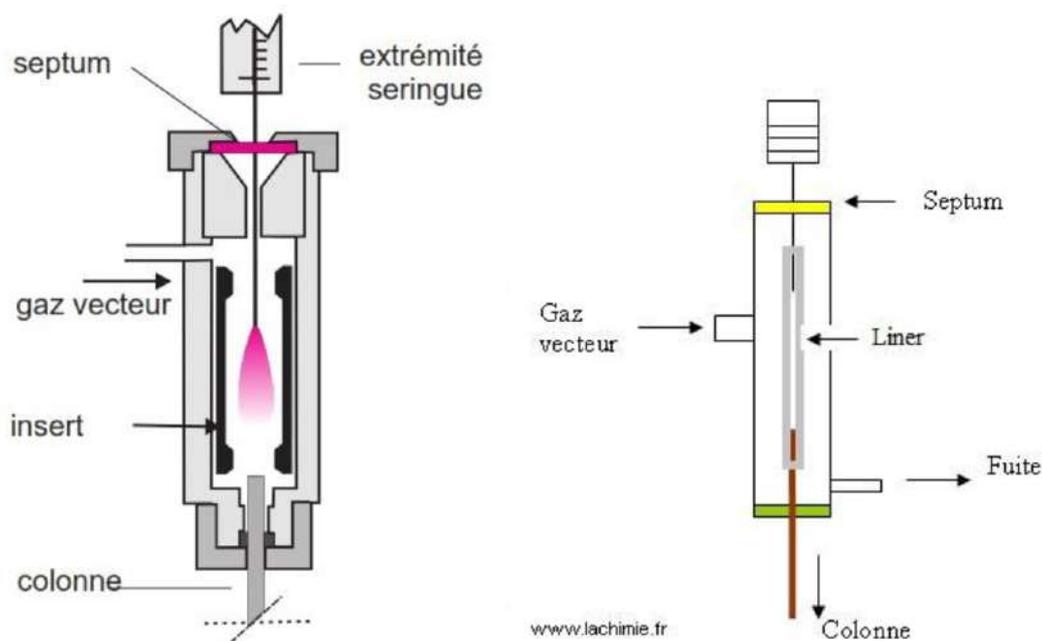


Figure 16 : Schéma d'un injecteur pour colonnes garnies

La conception de la chambre d'injection doit être soigneusement étudiée. Le volume de la chambre doit être proportionné au type de colonne à utiliser afin d'éviter un mélange incomplet ou des bandes d'échantillons trop larges ; les turbulences dans le passage de la chambre d'injection à la colonne doivent être évitées autant que possible ; les volumes morts, non balayés par le courant de gaz porteur, à l'intérieur

de la chambre doivent être soigneusement évités pour éviter la déformation de la bande d'échantillons ; le volume entre la chambre d'injection et la colonne doit être le plus petit possible pour empêcher l'élargissement de la bande ; la température doit être homogène dans toute la chambre d'injection pour éviter la discrimination de l'un des composants de l'échantillon, etc. Le système d'injection d'un chromatographe est un point extrêmement critique, et l'utilisation d'une technique d'injection inadéquate ou un mauvais choix de système d'injection peut complètement ruiner la capacité de séparation d'une colonne.

Il existe certains types d'injecteurs qui permettent d'utiliser une extrémité de la colonne chromatographique comme chambre de mélange. L'introduction de l'échantillon au moyen de ce type d'injecteur (injection en colonne) est exempte de bon nombre des problèmes mentionnés ci-dessus, et offre des avantages supplémentaires tels que l'utilisation de températures plus basses pour la vaporisation.

4.3.2. Injecteurs de colonne capillaire

Les systèmes d'introduction d'échantillons utilisés pour travailler avec des colonnes capillaires sont basés sur les mêmes principes que les injecteurs utilisés pour les colonnes remplies, de sorte que les considérations générales les concernant restent valables.

La différence fondamentale entre les systèmes qui utilisent des colonnes remplies et ceux qui utilisent des colonnes capillaires est que la quantité d'échantillon que ces dernières peuvent séparer est bien moindre que dans le premier cas ; d'autre part, les colonnes capillaires sont fortement affectées par les solvants, de sorte que les volumes qui peuvent y être injectés sont extrêmement faibles. Comme il n'existe pas de seringues capables de mesurer avec précision des volumes inférieurs à 0,1 μl , les injecteurs utilisés pour travailler avec ce type de colonne, en plus de vaporiser l'échantillon et de le mélanger avec le gaz vecteur, doivent être capables d'introduire un seul échantillon dans la colonne Aliquote de l'échantillon total injecté. Il existe beaucoup plus de techniques d'injection pour les colonnes capillaires que pour les

colonnes garnies, et parmi elles,

a) Injection avec division d'échantillon

Ce type d'injection (mieux connu sous le nom d'injection "split"), est le plus simple de ceux utilisés en chromatographie capillaire. L'injecteur "split" (Figure 17) se compose essentiellement des mêmes éléments qu'un injecteur normal, avec pour seul ajout un système de division de flux à la sortie de la chambre de mélange. Grâce à ce type d'injecteur, le flux de gaz porteur qui traverse l'injecteur (et donc aussi l'échantillon vaporisé), est divisé en deux ; une partie est introduite dans la colonne et l'autre s'échappe du système par une vanne à pointeau qui permet de réguler la proportion de gaz qui est introduit dans la colonne.

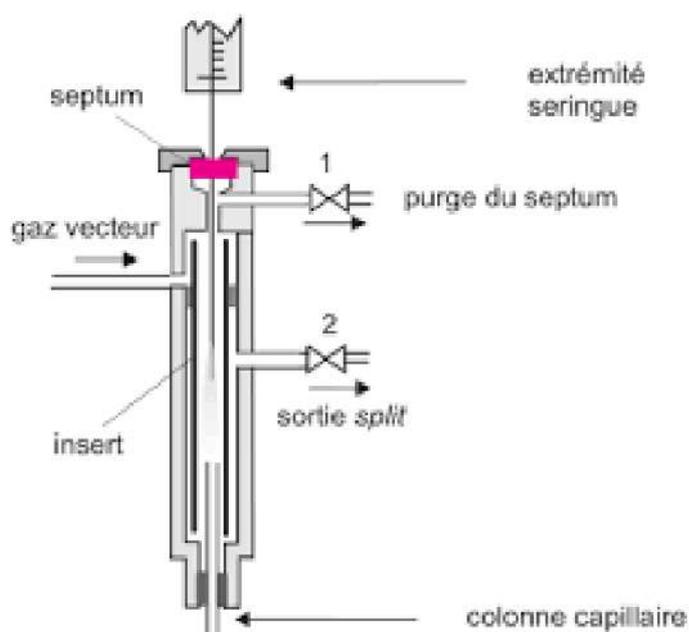


Figure 17 : Schéma d'un injecteur "split".

Etant donné que dans ce type d'injecteurs l'essentiel du flux de gaz vecteur est dirigé vers l'atmosphère, la vanne "split" dispose d'un système d'ouverture et de fermeture automatique de sorte qu'elle ne permet au gaz de s'échapper dans l'atmosphère que pendant le processus d'injection. Le contrôle du débit de gaz vecteur qui traverse la colonne s'effectue dans ce type de système en maintenant constant la pression dans

la chambre d'injection, ce qui permet au débit de gaz qui traverse l'injecteur de varier selon que la vanne split est ouverte ou fermée.

Les injecteurs de ce type présentent deux inconvénients ; En premier lieu, la division de l'échantillon fait que les quantités d'analyte qui sont séparées et atteignent le détecteur sont très faibles, de sorte que les limites de détection augmentent considérablement, ce qui est un grand inconvénient lors de l'analyse de traces. D'autre part, les injecteurs "splits" peuvent dans certains cas conduire à une discrimination entre les composants de l'échantillon.

b) Injection "Splitless"

Dans la technique d'injection "splitless" la totalité de l'échantillon injecté est dirigée vers la colonne, qui est maintenue lors de l'injection à une température inférieure au point d'ébullition du composant le plus volatil de l'échantillon. L'ensemble de l'échantillon injecté se condense logiquement en tête de colonne, en l'occurrence le solvant condensé agissant sur la colonne comme un piège où se concentrent les composants à analyser (effet solvant). Après un temps convenable, une vanne de purge est ouverte dans l'injecteur afin de balayer dans l'atmosphère le solvant vaporisé qui peut rester dans l'injecteur ; en même temps, un programme de chauffage de la colonne est lancé pour effectuer l'analyse.

L'utilisation de la technique "splitless" présente deux avantages importants. En premier D'autre part, comme il n'y a pas de division d'échantillon, il permet une augmentation notable de la sensibilité, le rendant très approprié pour l'analyse de traces. D'autre part, la reconcentration de l'échantillon en tête de colonne fait que les pertes d'efficacité dues à une injection inadéquate sont beaucoup moins importantes que dans d'autres techniques d'injection.

La conception d'un injecteur "splitless" est fondamentalement la même que celle de l'injecteur "split" (Figure 17), pouvant purger l'injecteur soit par la vanne fractionnée, soit par une vanne de purge supplémentaire située près du septum. La plupart des injecteurs "split" commerciaux sont conçus pour fonctionner également en mode "splitless".

c) Injection en colonne

Il a déjà été indiqué qu'un des principaux problèmes des systèmes d'injection utilisés avec les colonnes capillaires est la possibilité de discrimination entre les composants de l'échantillon lors des processus de vaporisation de l'échantillon et de passage de l'échantillon vaporisé vers la colonne. Evidemment, le seul moyen de s'assurer que l'échantillon atteignant la colonne correspond à 100 % avec l'échantillon injecté, est d'injecter directement dans la colonne.

Les systèmes d'injection sur colonne (généralement connus sous leur nom anglais "on-column") ont été conçus pour permettre l'introduction d'échantillons directement dans des colonnes capillaires.

Il est évident que l'introduction d'un échantillon au moyen d'une seringue directement dans une colonne capillaire (0,23 mm de diamètre interne) nécessite l'utilisation de des aiguilles extrêmement fines (des aiguilles en silice fondue de 0,15 mm de diamètre sont souvent utilisées) qui sont par conséquent incapables de percer un septum ; La caractéristique de base d'un injecteur « sur colonne » (figure 18) est l'utilisation d'un système de vannes et de tubes guides qui permettent l'introduction d'une aiguille extrêmement fine dans le système.

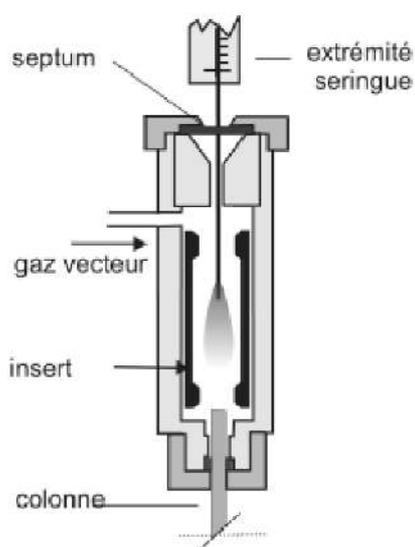


Figure 18 : Schéma d'un injecteur sur colonne.

La méthode de travail utilisée en injection « sur colonne » rappelle quelque peu celle utilisée en injection « splitless » ; L'échantillon est introduit directement dans la colonne, en la maintenant à une température inférieure au point d'ébullition du composant le plus volatil de l'échantillon. Une fois l'échantillon introduit, le programme de chauffage de la colonne est lancé pour procéder à la séparation.

Le grand avantage offert par le système d'injection « sur colonne » est qu'il réduit la discrimination entre les composants de l'échantillon à pratiquement zéro, évitant également tous les problèmes présentés par les autres techniques d'injection.

4.3.3. Autres systèmes d'injection

Jusqu'à présent, les systèmes d'injection traditionnellement utilisés en chromatographie en phase gazeuse ont été décrits, principalement utilisés pour l'introduction d'échantillons en solution. Il existe également d'autres techniques d'introduction d'échantillons, dont certaines présentent un intérêt particulier pour l'analyse des polluants environnementaux ; Des exemples de techniques d'injection non conventionnelles peuvent être :

a) Vannes d'injection de gaz.

L'injection à travers des vannes est largement utilisée pour l'échantillonnage automatique de gaz dans les systèmes dynamiques. Les vannes de prélèvement utilisées en chromatographie en phase gazeuse sont du type à six voies et peuvent être munies de boucles de charge de capacité variable. Le schéma de fonctionnement de ce type de vanne est représenté sur la figure 19.

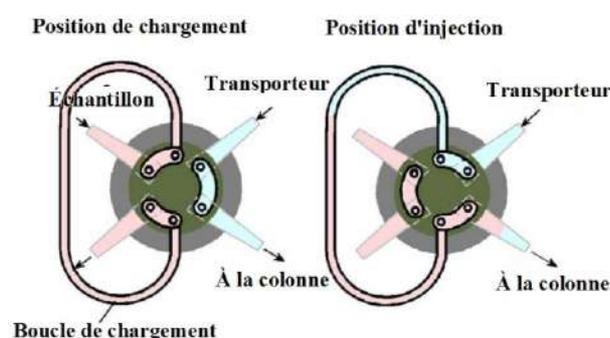


Figure 19 : Schéma d'une vanne d'injection de gaz.

b) Désorption thermique.

Fondamentalement, un équipement de désorption thermique (figure 20), consiste en un four où l'échantillon est désorbé des tubes de prélèvement à haute température sous un courant de gaz porteur ; une fois les vapeurs de l'échantillon désorbées, elles sont retenues dans un piège cryogénique jusqu'à la fin du processus de désorption, l'injection s'effectuant à ce moment au moyen d'un chauffage très rapide du piège froid.

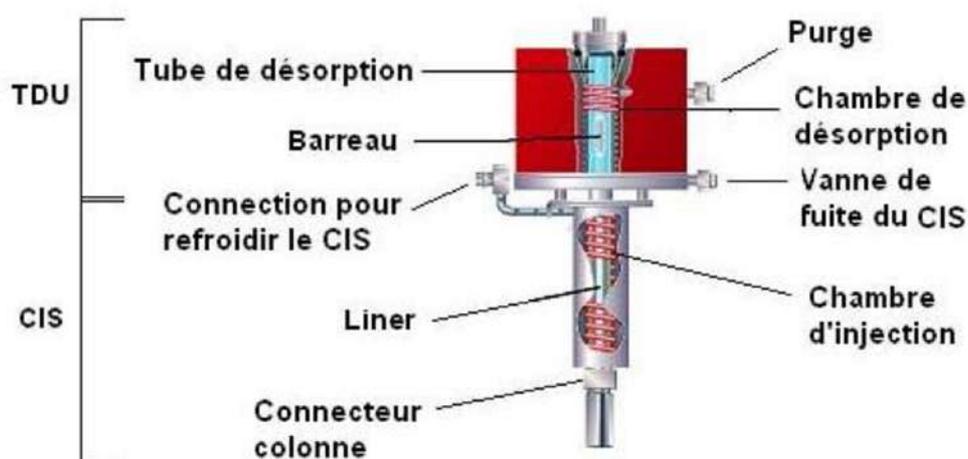


Figure 20 : Schéma d'un injecteur à désorption thermique.

Il est à noter que, contrairement à ce qui se passe avec l'injection en espace de tête, la technique de désorption thermique permet de bonnes quantifications, à condition de mettre en place des conditions adéquates pour assurer que la désorption de l'échantillon soit complète.

c) Injecteurs Headspace.

La technique d'analyse de l'espace de tête est applicable à l'analyse directe des contaminants volatils dans des échantillons solides ou liquides. Le fondement de cette technique consiste à analyser une aliquote de l'atmosphère en contact avec l'échantillon afin d'y déterminer la fraction vaporisée des composants en équilibre avec l'échantillon solide ou liquide.

Pour effectuer une analyse selon cette technique, l'échantillon est placé dans un

flacon hermétiquement fermé et soumis à une température préalablement réglée pendant un temps suffisant pour que les différentes phases des composés à analyser atteignent l'équilibre, c'est-à-dire jusqu'à la pression partielle de chaque composant dans l'atmosphère du flacon est égal à sa tension de vapeur à la température de travail.

Essentiellement, un analyseur d'espace de tête se compose d'un four, commodément thermostaté, où les échantillons sont maintenus à une température généralement très élevée, et d'un système de prélèvement capable d'injecter dans le chromatographe une aliquote de la vapeur générée par l'échantillon contenu dans le flacon. Dans la figure 21, deux types de systèmes sont représentés prélèvement : une seringue automatique thermostatée un système de déplacement de pressurisation.

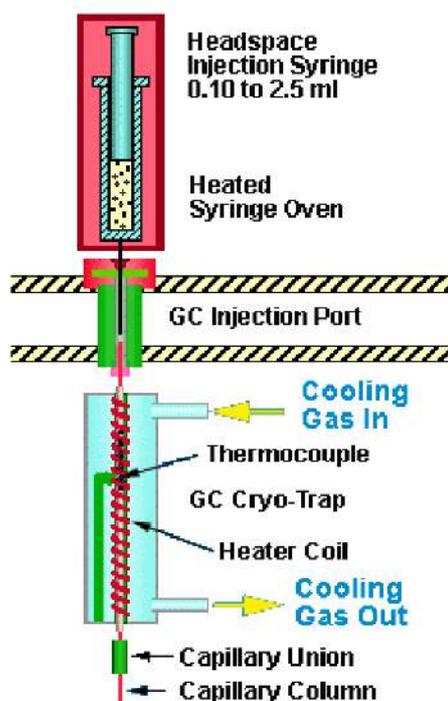


Figure 21 : Systèmes d'injection dans l'espace de tête.

4.4. DETECTEURS

Une fois que les composants de l'échantillon ont été séparés par la colonne, il est nécessaire de disposer d'un système de détection à la sortie de la colonne, capable de signaler l'éluion d'un composant de l'échantillon et de fournir en même temps un signal proportionnel à la quantité de substance qui le traverse.

Les détecteurs utilisés en chromatographie en phase gazeuse sont de type différentiel, ils ne donnent pas de signal lorsque seul le gaz porteur les traverse et ils réagissent à toute propriété qui peut varier lorsque le gaz porteur est mélangé à une substance éluée de la colonne.

4.4.1. Paramètres caractéristiques d'un détecteur

a) Signal du détecteur

Comme mentionné ci-dessus, le détecteur mesure une propriété qui différencie le gaz porteur du mélange gaz porteur/substance éluée. La variation mesurée par le détecteur, appelée signal (S), est proportionnelle à la grandeur de la propriété à laquelle il répond (a), à une constante propre à la conception du détecteur (k) et au nombre de molécules de la substance éluée présentes dans le détecteur à un moment donné (N) ; l'expression du signal du détecteur sera :

$$S = k \cdot a \cdot N \quad (23)$$

Évidemment, le signal offert par le détecteur à un moment donné sera la somme des signaux de toute substance éluée, du gaz porteur et des impuretés présentes dans le gaz porteur :

$$S_t = S_g + S_i + S_1 + S_2 + \dots$$

Le signal mesuré par le détecteur en l'absence de substances éluées est appelé signal de fond du détecteur.

b) Sensibilité

La sensibilité d'un détecteur à une substance éluée peut être définie comme la variation du signal mesuré, ΔS , provoquée par une variation de la concentration dans le gaz porteur de la substance éluée, ΔN_s . Il est évident, d'après l'équation de définition du signal, que la sensibilité d'un détecteur peut être exprimée par l'équation :

$$\frac{\Delta S}{\Delta N_s} = k \cdot a_s \quad (23)$$

Autrement dit, la sensibilité d'un détecteur à une substance sera donnée par le produit de la constante de conception du détecteur et de la valeur de la propriété analysée de la substance éluee.

Par conséquent, la sensibilité de chaque détecteur sera différente, en fonction de sa conception, et pour un détecteur donné, la sensibilité sera différente pour différentes substances.

c) Linéarité

La linéarité d'un détecteur, l , est définie comme la constante de proportionnalité du rapport entre le logarithme du signal fourni par le détecteur et le logarithme de la concentration de la substance éluee :

$$\log S = \log(k \cdot a_s) + (l + \log N_s) \quad (24)$$

La représentation de cette équation (figure 22) donne une droite dont la pente est l et dont l'ordonnée à l'origine est $\log(k \cdot a_s)$, c'est-à-dire le logarithme de la sensibilité.

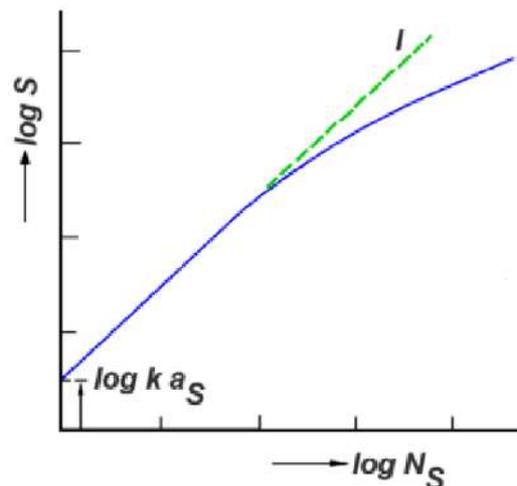


Figure 22 : Graphique de réponse de concentration d'un détecteur.

Il est relativement courant de trouver des évaluations de la linéarité des détecteurs en coordonnées linéaires ; dans ces cas, les détecteurs pour lesquels $l = 1$ sont

appelés détecteurs linéaires, les autres sont appelés détecteurs non linéaires. De toute façon, l'utilisation de coordonnées linéaires n'est pas correcte, car de nombreux détecteurs présentent des dépendances du signal avec la concentration de type exponentiel, en laissant de côté les déviations produites par l'amplification électronique du signal ; de toute façon, il est toujours préférable de faire l'évaluation de la linéarité du détecteur en termes de coordonnées logarithmiques.

La gamme de concentrations pour laquelle la linéarité ne change pas est connue sous le nom de gamme dynamique linéaire du détecteur.

d) Quantité minimale détectable

Le signal de fond mesuré par un détecteur fluctue dans le temps en raison de l'inconstance des paramètres expérimentaux ; ces fluctuations peuvent être considérées comme des erreurs aléatoires de la mesure et sont appelées bruit. Le niveau de bruit oscille continuellement autour d'un signal moyen, l'ensemble de ses valeurs dans le temps donnant une distribution définie par son écart-type. La valeur du signal correspondant à la quantité minimale détectable peut être calculée sur la base de la valeur de l'incrément de signal requis (ΔS) pour être significativement différent du reste de la distribution. Compte tenu d'un nombre suffisant de mesures du signal de fond, on peut calculer qu'un signal est significativement différent du bruit, avec une probabilité de 95 %, lorsque sa valeur est égale à deux fois l'intervalle du bruit ; de même, lorsque la probabilité est portée à 99 %, le signal doit être au moins 2,65 fois supérieur au niveau de bruit pour être significativement différent.

Bien sûr, l'évaluation du niveau requis pour qu'un signal soit significativement différent du bruit est faite sur la base de la considération d'un signal instantané ; cependant, la situation peut être extrapolée aux mesures réelles en tenant compte du fait que le signal évalué correspond à la valeur maximale du pic d'éluion (figure 23), étant quantitativement évaluable tout pic qui remplit ces conditions.

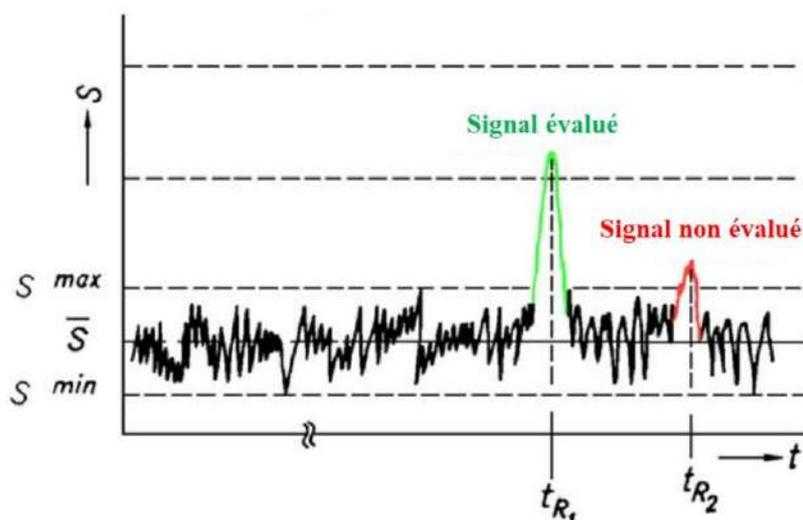


Figure 23 : Paramètres du rapport signal/bruit de deux bandes chromatographiques.

4.4.2. Types de détecteurs

Les détecteurs utilisés en chromatographie en phase gazeuse peuvent être divisés en détecteurs universels et détecteurs spécifiques ; les premiers offrent l'avantage de répondre à pratiquement tous les composés pouvant être élués de la colonne, mais cette même propriété peut devenir un sérieux inconvénient lors de l'analyse de mélanges très complexes ; dans le second cas, l'utilisation de détecteurs spécifiques est très avantageuse car, comme ils ne répondent qu'à un groupe limité de composés, les chromatogrammes qu'ils offrent sont très simplifiés.

a) Détecteur de conductivité thermique

L'un des premiers détecteurs utilisés pour les travaux de routine en chromatographie en phase gazeuse était le détecteur de conductivité thermique ou détecteur à fil chaud. Ce type de détecteur réagit à la différence de conductivité thermique entre le gaz porteur pur et le gaz porteur mélangé à une autre substance ; l'ampleur de la réponse dépend de la différence de conductivité thermique entre le composé qui s'élué de la colonne et le gaz porteur.

Dans un capteur de conductivité, le gaz de la colonne traverse une cavité thermostatée contenant l'élément sensible, un fil chauffé ou une thermistance.

Lorsque le gaz porteur pur traverse le détecteur, la perte de chaleur du capteur est fonction de la différence de température entre le capteur et la paroi de la cavité et de la conductivité thermique du gaz porteur ; lorsqu'une substance mélangée au gaz porteur s'élué, la conductivité thermique change et, par conséquent, un changement de température se produit dans le capteur ; le changement de température entraîne un changement dans un signal électrique (résistance ou tension, selon l'élément de détection), qui est amplifié et enregistré de manière pratique. La figure 24 présente le schéma d'un détecteur de conductivité thermique typique.

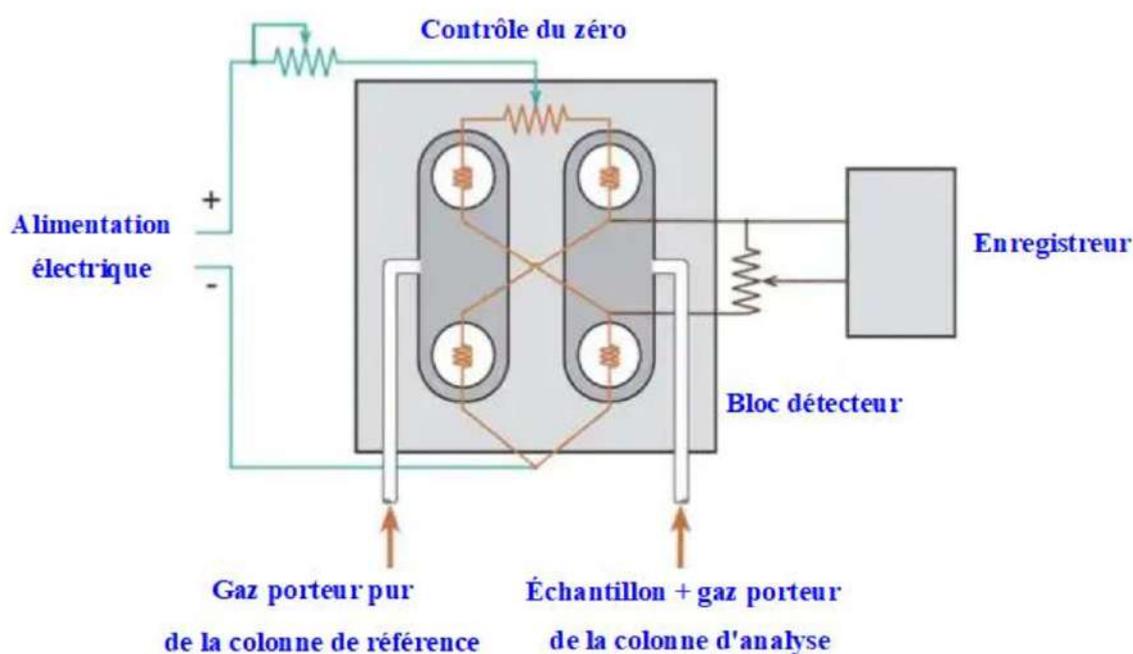


Figure 24 : Schéma d'un détecteur de conductivité thermique.

Le détecteur de conductivité thermique est universel et non destructif ; il est généralement utilisé pour l'analyse des gaz permanents, des hydrocarbures légers et d'autres types de composés qui donnent une mauvaise réponse dans d'autres types de détecteurs. La sensibilité varie de 10^{-6} à 10^{-8} g, avec une gamme dynamique linéaire d'environ quatre ordres de grandeur.

b) Détecteur à ionisation de flamme

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

Le détecteur à ionisation de flamme est peut-être le détecteur le plus utilisé en chromatographie en phase gazeuse. Ce type de détecteur est en pratique universellement sensible, car il est sélectif vis-à-vis des composés comportant des liaisons C-H, de sorte qu'il y a très peu de composés qui ne donnent pas de signal sur lui.

Dans un détecteur à ionisation de flamme, le gaz de la colonne est mélangé à de l'hydrogène et ce mélange est brûlé dans une chambre avec un excès d'air. Au-dessus de la flamme, un collecteur cylindrique polarisé est disposé afin de recueillir les ions générés ; sur ce dispositif, le courant ionique entre la pointe du brûleur et l'électrode du collecteur est mesuré. Le schéma d'un détecteur à ionisation de flamme est présenté à la figure 25.

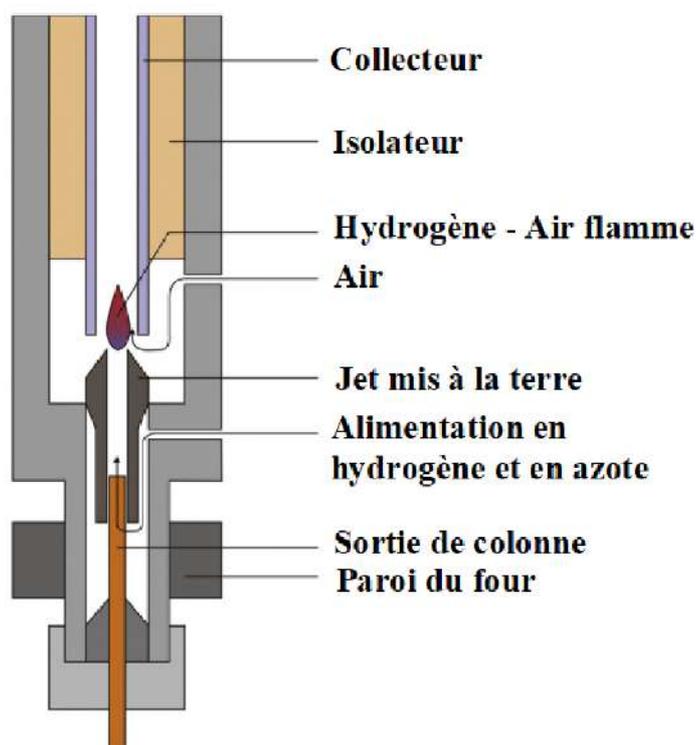


Figure 25 : Coupe d'un détecteur à ionisation de flamme.

Le mécanisme de génération d'ions dans ce détecteur est complexe et n'est pas entièrement compris, car l'énergie de la flamme est trop faible pour expliquer la génération d'ions ; On pense généralement que les ions sont générés par un processus d'ionisation chimique, dans lequel l'énergie libérée par des réactions fortement exothermiques est retenue par les molécules organiques et les ions sont générés à partir des molécules excitées.

Le détecteur à ionisation de flamme est toujours polarisé à la tension de saturation ; dans ces conditions, le courant de fond est de l'ordre de 10^{-13} - 10^{-14} A, qui passe à un niveau de 10^{-12} - 10^{-9} A en présence d'une vapeur organique.

Les détecteurs à ionisation de flamme offrent une grande sensibilité, une grande stabilité et une gamme dynamique linéaire exceptionnellement élevée, autant d'éléments qui, associés à une grande simplicité d'utilisation, ont fait de ce type de détecteur, comme nous l'avons déjà mentionné, le plus utilisé.

c) Détecteur de capture électronique

Le détecteur à capture d'électrons est probablement le deuxième détecteur le plus utilisé, en raison de sa sensibilité exceptionnelle (le détecteur à capture d'électrons est probablement le dispositif analytique le plus sensible connu). Ce fait, ainsi que sa sélectivité vis-à-vis de composés de grand intérêt (principalement dans les domaines de l'environnement et de la toxicologie), en font un outil largement utilisé pour la détection et la quantification de traces.

Dans un détecteur à capture d'électrons (figure 26), une source de rayonnement β est utilisée pour bombarder le gaz porteur passant dans une chambre d'ionisation, générant un plasma d'ions positifs, de radicaux libres et d'électrons thermiques.

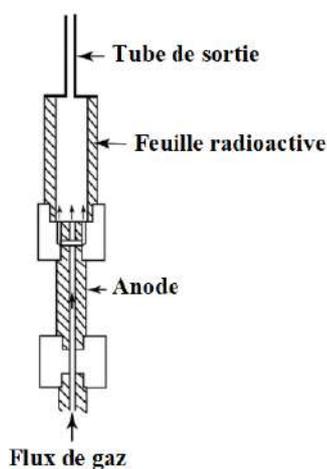


Figure 26 : Détecteur à capture électronique de type concentrique.

En moyenne, chaque particule β peut produire entre 100 et 1 000 électrons thermiques avec une gamme d'énergie comprise entre 0,02 et 0,05 eV ; l'application d'un potentiel à la cellule du détecteur de capture permet de collecter les électrons thermiques sur une électrode collectrice, établissant ainsi un courant de fond en présence d'un gaz porteur pur, qui donne lieu à la ligne de base du détecteur. Lorsqu'un composé actif devant ce détecteur pénètre avec le gaz porteur dans la cellule de mesure, il peut capturer les électrons thermiques pour générer soit des ions négatifs de mobilité inférieure à celle des électrons, soit des fragments neutres par recombinaison avec les ions positifs du plasma généré dans le processus primaire ; ce processus de capture entraîne une diminution du courant de fond du détecteur, qui peut être mis en relation quantitative avec la quantité d'analyte traversant le détecteur.

Les sources de particules β utilisées dans ce type de détecteur sont des émetteurs faibles, ^3H , ^{63}Ni , ^{55}Fe , ou des électrons émis par voie thermoélectrique, bien qu'en pratique seuls les détecteurs basés sur des sources de ^{63}Ni et dans certains cas de tritium soient abordables. Comme gaz porteurs, le détecteur à capture d'électrons ne peut utiliser que de l'hydrogène, des gaz nobles ou de l'azote, qui doivent être exempts de traces d'oxygène et de vapeur d'eau à des niveaux extrêmement bas.

Le détecteur à capture d'électrons répond très sélectivement aux composés présentant des groupes à forte affinité électronique, notamment les halogènes et les groupes

nitro, offrant une réponse 10^6 - 10^7 fois plus élevée à ce type de composés qu'aux hydrocarbures.

En conclusion, le détecteur à capture électronique présente de très bonnes caractéristiques tant en termes de sensibilité que de spécificité. Cependant, il faut souligner que la manipulation de ces détecteurs n'est pas simple, car leur réponse peut être très variable en fonction des conditions expérimentales (potentiel de polarisation, température, débit de gaz porteur, etc.), ce qui affecte non seulement leur sensibilité mais aussi leur sélectivité et leur gamme dynamique linéaire, qui peut parfois être très réduite.), ce qui affecte non seulement leur sensibilité mais aussi leur sélectivité et leur gamme dynamique linéaire, qui peut parfois être très réduite ; à ces difficultés s'ajoutent leur sensibilité à tout type de contamination et la grande difficulté de leur nettoyage, raison pour laquelle il faut toujours prendre les plus grandes précautions lorsqu'on travaille avec ce type de détecteur.

d) Détecteur d'azote-phosphore

Le détecteur azote-phosphore (également appelé détecteur thermionique ou détecteur à flamme alcaline) est basé sur le fait que l'ajout d'un sel de métal alcalin à la flamme d'un détecteur à ionisation augmente la réponse du détecteur à certains éléments (phosphore, azote, soufre, etc.). La sélectivité de ce type de détecteur est très dépendante de paramètres tels que la température, la forme et la taille de la flamme, la composition du sel alcalin, la géométrie du détecteur, etc. En raison de cette dépendance à de nombreux paramètres expérimentaux, la manipulation de ce type de détecteur est difficile, l'optimisation de la réponse est fastidieuse et sa stabilité, due aux pertes par vaporisation du sel alcalin, est très faible.

Certains des problèmes susmentionnés ont été résolus dans de nombreux détecteurs commerciaux en remplaçant la perle de sel alcalin du détecteur par un verre alcalin ou une céramique chauffés électriquement séparément. Dans un tel détecteur (figure 27), une perle de silicate de métal alcalin chauffée électriquement est placée entre le jet du détecteur et l'électrode collectrice, la perle étant maintenue à un potentiel négatif pour réduire les pertes de métal alcalin. Dans la région des billes, un plasma

est généré au moyen d'un mélange air/hydrogène, en utilisant un très faible débit d'hydrogène (typiquement 1 à 5 ml/min), insuffisant pour maintenir une flamme mais suffisant pour maintenir un plasma dans lequel des phénomènes d'ionisation peuvent se produire.

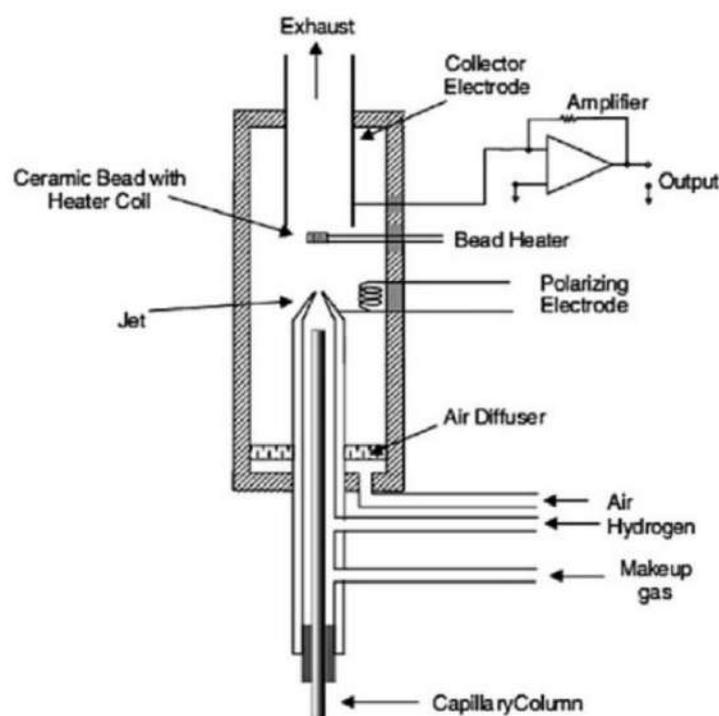


Figure 27 : Détecteur azote-phosphore.

Le détecteur azote-phosphore offre une sensibilité d'environ 10^{-13} g/s d'azote et 5×10^{-14} g/s de phosphore, avec une spécificité de 10^4 sur les composés qui ne présentent pas ces atomes et une gamme dynamique comprise entre 10^4 et 10^5 . Le détecteur NPD est largement utilisé dans le domaine de l'environnement, principalement pour la détermination des résidus de pesticides, en raison de sa sensibilité et de sa spécificité, qui minimise le nettoyage des échantillons. Le principal problème de ce détecteur est l'instabilité de sa réponse, principalement due à la contamination ou à la perte d'activité de la bille alcaline, d'où la nécessité de procéder à des étalonnages relativement fréquents.

e) Détecteur photométrique de flamme

Le détecteur photométrique à flamme (DFP) utilise une flamme d'hydrogène pour exciter des fragments de molécules contenant des atomes de soufre ou de phosphore à un état électronique élevé. Ces deux éléments sont excités de façon optimale par la flamme d'hydrogène et, lorsqu'ils reviennent à l'état fondamental, ils émettent les raies caractéristiques de leur spectre ; les raies analytiques d'intérêt sont sélectionnées au moyen d'un filtre (392 nm pour le soufre et 526 nm pour le phosphore) et l'intensité de la radiation émise est mesurée au moyen d'un photomultiplicateur (figure 28).

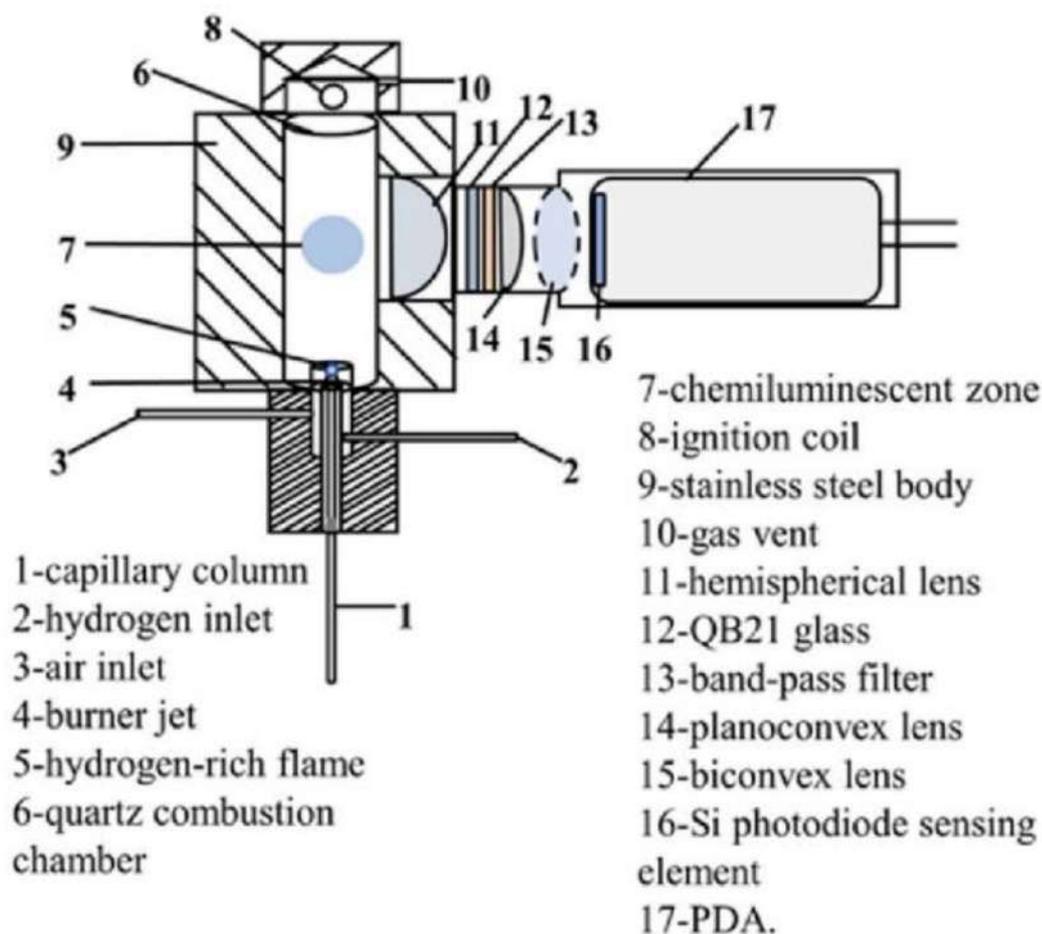


Figure 28 : Schéma d'un détecteur de flamme photométrique.

Dans ce type de détecteur, le gaz porteur provenant de la colonne est mélangé à de l'air et brûlé dans une atmosphère d'hydrogène ; l'émission des atomes de soufre ou de phosphore se produit principalement dans la zone supérieure de la flamme, riche en hydrogène, c'est pourquoi on utilise parfois un modèle à double brûleur avec une deuxième flamme pour produire l'excitation ; Cette conception permet également d'éviter le phénomène d'extinction de flamme, qui se produit dans ce type de détecteurs lorsqu'une grande quantité d'un composé (essentiellement le solvant d'injection) est éluée de la colonne.

La sensibilité et la sélectivité de ces détecteurs sont variables, en fonction de leur conception et de leurs conditions de fonctionnement, mais une valeur typique de sensibilité est de 10^{-13} g/s pour le phosphore et de 10^{-12} g/s pour le soufre, avec une gamme dynamique linéaire d'environ 1.000. La sélectivité de ces détecteurs va de 5×10^5 pour le phosphore à 10^3 pour le soufre.

f) Détecteur à photoionisation

Les détecteurs à photoionisation sont basés sur l'utilisation de photons générés dans une lampe à décharge pour ioniser les composés organiques sortant, avec le gaz porteur, d'une colonne chromatographique.

Ce type de détecteur utilise un tube à décharge contenant un mélange de gaz à basse pression pour générer des rayonnements ; ceux-ci sont excités au moyen d'une différence de potentiel élevée maintenue entre deux électrodes. La variation des proportions du mélange gazeux dans la lampe permet d'obtenir des rayonnements ultraviolets de différentes énergies, bien que la plus utilisée soit la lampe de 10,2 Ev.

Dans ce détecteur (figure 29), le gaz porteur traverse une chambre d'ionisation, physiquement séparée du tube à décharge par une fenêtre transparente aux rayonnements (généralement du MgF_2). Les composés qui s'écoulent de la colonne sont ionisés par les photons à haute énergie de la lampe et les ions générés sont collectés au moyen d'une électrode polarisée de manière appropriée.

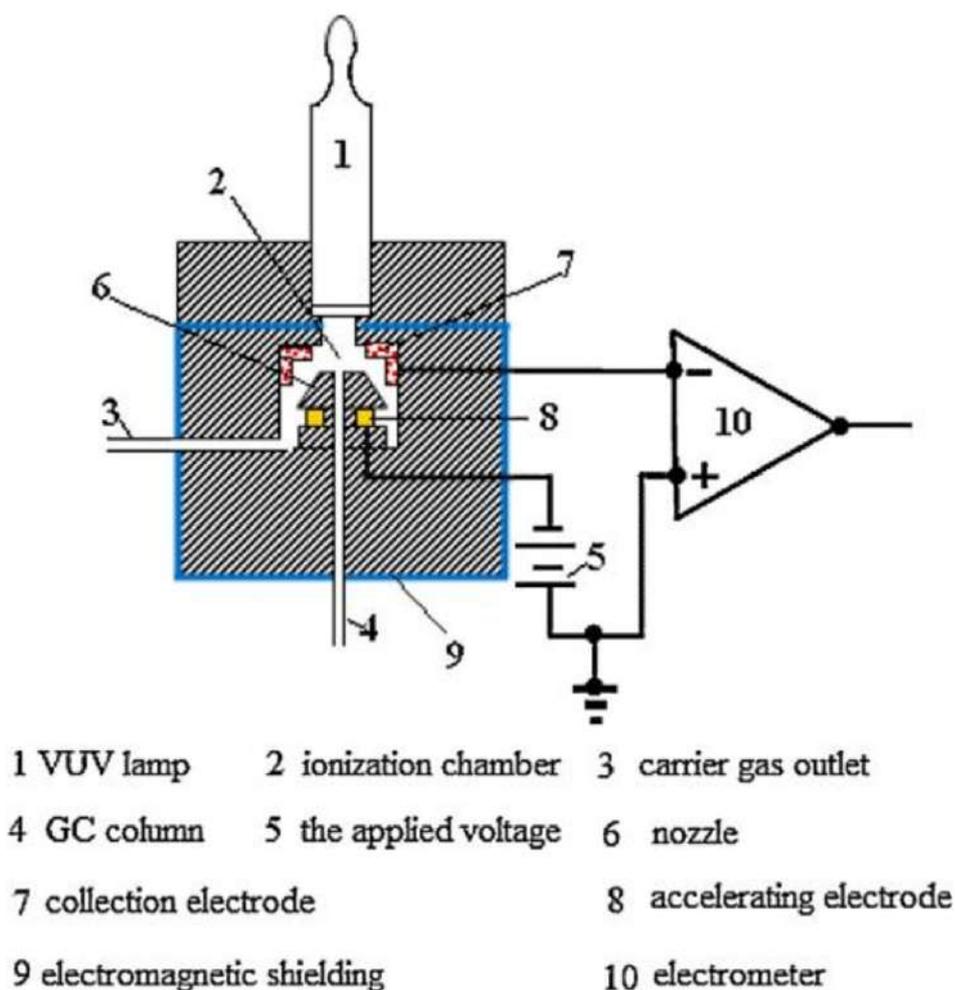


Figure 29: Détecteur à photoionisation.

Pratiquement tous les composés organiques donnent une sorte de réponse avec ces détecteurs. La sensibilité du détecteur de photoionisation dépend du potentiel d'ionisation du composé concerné ; la réponse du détecteur aux composés organiques suit l'ordre général :

Composés aromatiques > alcènes > alcanes > alcools > esters > aldéhydes > cétones

En général, le détecteur à photoionisation est 5 à 10 fois plus sensible que le détecteur à ionisation de flamme pour les alcanes, et de l'ordre de 35 fois plus sensible pour les hydrocarbures aromatiques ; sa gamme dynamique linéaire est, en moyenne, de quatre ordres de grandeur.

g) Détecteur de conductivité électrolytique

L'utilisation du détecteur de conductivité est basée sur la mesure des variations de la conductivité d'une solution d'électrolytes ; ces électrolytes sont formés en dissolvant dans l'eau les produits des substances éluées ; bien entendu, seules les substances contenant des groupes capables de se comporter comme des électrolytes sont détectables par ce moyen.

La décomposition des substances éluées est effectuée par pyrolyse ou par des réactions catalysées dans un four à écoulement de faible volume, généralement constitué d'un tube de nickel ou de quartz de petit diamètre maintenu à une température de 500 à 1 000 EC. Les réactions d'oxydation ou de réduction catalysées sont réalisées en mélangeant le gaz porteur avec de l'oxygène, de l'air ou de l'hydrogène à la sortie de la colonne et en faisant passer ce mélange à travers un catalyseur (généralement un fil de nickel) contenu dans le tube du réacteur. Parfois, un filtre chimique est placé à la sortie du four de pyrolyse pour retenir sélectivement une partie des produits de la pyrolyse afin d'augmenter la sélectivité du détecteur.

Le détecteur de conductivité électrolytique le plus utilisé est le détecteur de Hall ; la cellule de mesure de ce détecteur (figure 30) mesure la conductivité du liquide dans la première partie, et la conductivité du liquide plus celle des produits de la pyrolyse dans la seconde partie, et les signaux des deux mesures sont ensuite additionnés de manière différentielle, ce qui minimise les fluctuations de réponse dues aux facteurs pouvant affecter la mesure (conductivité de base du liquide, variations de température, etc.).

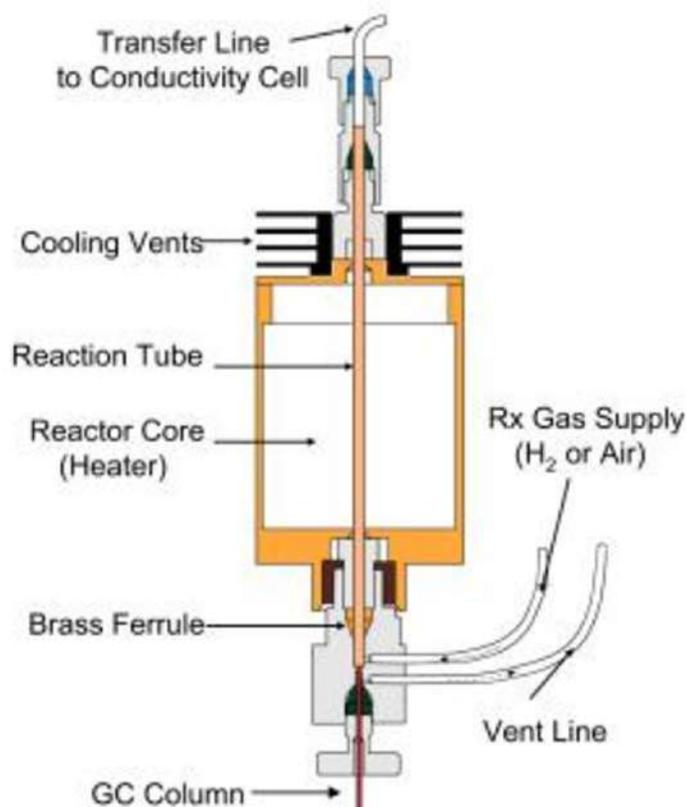


Figure 30: Schéma de la cellule de conductivité d'un détecteur de Hall.

Les liquides de base utilisés dans ces détecteurs sont généralement des alcools (méthanol, isopropanol, etc.) seuls ou mélangés à de l'eau ; l'utilisation de ces solvants à la place de l'eau permet une amélioration significative de la sensibilité, de la sélectivité et de la gamme dynamique linéaire du détecteur.

Les détecteurs de conductivité offrent une bonne sensibilité (entre 10^{-12} et 10^{-13} g/s selon l'élément travaillé), une bonne sélectivité (entre 10^4 et 10^9 selon l'élément) et une gamme dynamique linéaire entre 10^3 et 10^5 . Cependant, l'utilisation de ce type de détecteurs n'est pas facile, car tout type de contamination, un catalyseur désactivé, un filtre chimique appauvri, etc. entraîne facilement des distorsions des pics, un bruit élevé et une non-linéarité de la réponse.

4.5. COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE

Comme pour toutes les techniques chromatographiques, la colonne est le cœur du chromatographe en phase gazeuse. Il faut toujours garder à l'esprit que la colonne est le véritable élément de séparation des composants de l'échantillon ; ainsi, un mauvais choix de colonne, une colonne détériorée ou des conditions de travail inadéquates ne permettront jamais d'obtenir de bons résultats, même si l'on dispose du meilleur équipement dans le reste du chromatographe, et ces causes sont responsables de la grande majorité des problèmes rencontrés lors de la réalisation d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Une colonne de chromatographie en phase gazeuse se compose d'un tube, qui peut être constitué de divers matériaux (de préférence inertes), à l'intérieur duquel se trouve la phase stationnaire. Il peut s'agir d'un solide actif (chromatographie gaz-solide), ou plus fréquemment d'un liquide déposé sur les particules d'un support solide (colonnes garnies ou tassées) ou sur les parois du tube lui-même (colonnes tubulaires ouvertes).

4.5.1. Colonnes garnies

Les colonnes garnies sont constituées, comme mentionné ci-dessus, d'un tube (généralement en verre ou en acier inoxydable) d'un diamètre interne variant entre 2 et 5 mm et d'une longueur variant entre 1 et 15 m, enroulé de manière appropriée pour s'adapter à l'intérieur du four du chromatographe (figure 31).

A l'intérieur du tube, la phase stationnaire est placée sous la forme d'un liquide supporté par un matériau approprié finement pulvérisé ; le diamètre des particules de la charge doit être au moins 10 fois inférieur au diamètre du tube afin d'obtenir une bonne uniformité de distribution. La charge est confinée à l'intérieur du tube au moyen de bouchons en matériau poreux (généralement de la laine de verre ou de la laine de quartz) placés aux extrémités. La longueur, et par conséquent l'efficacité, des colonnes garnies, est limitée principalement par la chute de pression du gaz porteur entre la tête et la sortie de la colonne.



Figure 31 : Colonnes remplies pour la chromatographie en phase gazeuse.

4.5.2. Colonnes tubulaires ouvertes

Les colonnes à tube ouvert (communément appelées colonnes capillaires) ont été décrites pour la première fois par Golay en 1957, et sont parmi les plus utilisées en raison de la grande efficacité de séparation qu'elles offrent.

Fondamentalement, une colonne tubulaire est constituée d'un tube (généralement en verre ou en silice fondue) d'un diamètre compris entre 0,2 et 0,8 mm, sur la paroi interne duquel est placée la phase stationnaire. Selon la manière dont la phase stationnaire est disposée sur la paroi du tube, il existe essentiellement deux types de colonnes (Figure 32) :

- Colonnes WCOT (Wall Coated Open Tubular). Dans ce type de colonne (le plus fréquemment utilisé), la phase stationnaire est déposée sous forme de film liquide directement sur les parois du tube.
- Colonnes PLOT (Porous Layer Open Tubular). Dans ces colonnes, la paroi intérieure du tube est recouverte d'une couche d'un support adsorbant ; si le support est à son tour imprégné d'une phase stationnaire liquide, les colonnes sont appelées SCOT (Support Coated Open Tubular).

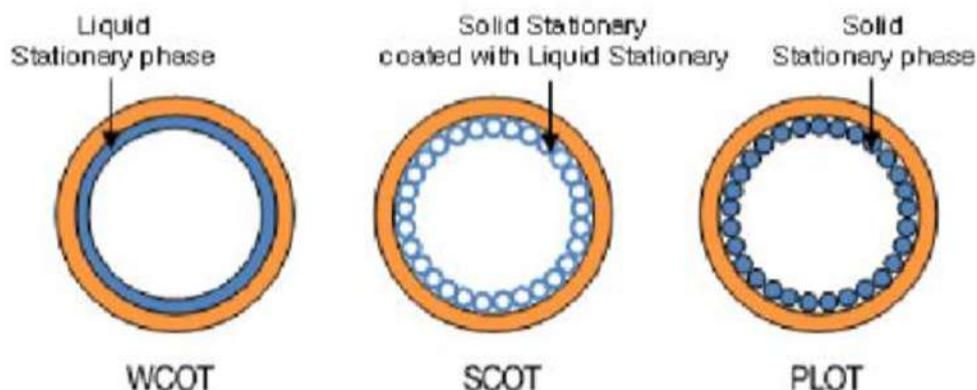


Figure 32 : Types de colonnes tubulaires ouvertes.

Il est clair que la perméabilité des colonnes tubulaires aux gaz est beaucoup plus élevée que celle des colonnes garnies (de l'ordre de 100 fois plus élevée), de sorte que ce type de colonne peut être assez long (les colonnes de 50 m sont très courantes) sans provoquer des pressions de tête de colonne trop élevées.

L'utilisation massive de ce type de colonnes est principalement due au fait que le rendement élevé qu'elles offrent (des valeurs de 30 000 à 50 000 plateaux sont fréquentes par rapport à 2000 - 4000 pour une colonne garnie) permet de séparer des mélanges très complexes avec une relative facilité. 2000 - 4000 d'une colonne garnie) permet de séparer assez facilement des mélanges très complexes ; d'autre part, le rendement élevé de ce type de colonne permet d'obtenir de bonnes résolutions sans recourir à des phases stationnaires très sélectives, ce qui simplifie grandement le problème du choix de la phase stationnaire (presque toutes les séparations peuvent être réalisées avec trois ou quatre colonnes différentes).

Le principal inconvénient de ce type de colonnes est leur faible capacité de chargement, qui nécessite l'utilisation de systèmes d'injection spéciaux pour introduire de petites quantités d'échantillon et de détecteurs à très haute sensibilité. Toutefois, les colonnes SCOT et WCOT dont le diamètre est supérieur à 0,5 mm (colonnes "Wide Bore") offrent une capacité de chargement suffisante pour injecter des quantités de l'ordre de 0,5 μ l, une capacité de chargement suffisante pour pouvoir injecter des quantités de l'ordre de 1 μ l sans utiliser de séparateur avec une

perte d'efficacité relativement faible. Les colonnes de ce type ont un très fort potentiel d'utilisation dans le domaine de l'analyse des traces.

4.5.3. Un support solide

Le but des supports solides utilisés dans certains types de colonnes est de fournir une surface sur laquelle la phase stationnaire liquide est déposée sous la forme d'un film uniforme.

Les supports utilisés en chromatographie en phase gazeuse doivent répondre à une série de qualités, telles que :

- 1) Avoir une surface spécifique relativement élevée, de sorte que la phase stationnaire puisse être distribuée uniformément et offrir une surface de contact maximale avec la phase mobile pour faciliter les processus d'échange.
- 2) Ils doivent être poreux, afin de ne pas provoquer de chutes de pression excessives.
- 3) Ils doivent être relativement durs pour que leurs particules ne se brisent pas pendant les processus d'imprégnation et de remplissage des colonnes.
- 4) Ils doivent être thermiquement stables.
- 5) La surface des supports doit être chimiquement inerte et ne doit pas provoquer de phénomènes d'adsorption susceptibles d'influencer la séparation chromatographique.

Aucun des matériaux testés jusqu'à présent ne remplit toutes les conditions susmentionnées, de sorte que dans la pratique, il est nécessaire de choisir parmi les supports existants celui qui convient le mieux à chaque séparation spécifique, même au prix du sacrifice de certaines des propriétés souhaitables.

Toutes sortes de solides inertes ont été utilisés comme supports, microbilles de verre, carbone graphité, métaux, silice, polymères fluorés, polymères poreux, etc., bien que les plus utilisés soient les supports préparés à base de terre de diatomées frittée (Chromosorb, Gas Chrom, etc.) ; la surface de ces matériaux est soumise à

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

divers traitements chimiques (lavages acides ou basiques, silanisation des groupes silanol libres, fixation de petites quantités de phases stationnaires, etc.), afin d'éliminer, dans la mesure du possible, les points actifs de la surface du support qui pourraient interagir avec les composés à séparer. de phases stationnaires, etc.), afin d'éliminer, autant que possible, les points actifs à la surface du support qui pourraient interagir avec les composés à séparer. Le tableau 4 énumère les propriétés de certains supports diatomés typiques.

Tableau 4 : Propriétés de certains supports de terre de diatomées.

Soutien	Couleur	pH	Surface spécifique m ² /g	Densité g/ml	Charge maximale de phase stationnaire
Chromosorb P	Rosé	6,5	4,0	0,47	30%
Chromosorb A	Rosé	7,1	2,7	0,48	25%
Chromosorb G	Blanc	8,5	0,5	0,58	5 %
Chromosorb W	Blanc	8,5	1,0	0,24	20 %
Chromosorb 750	Blanc	-	0,5 - 1,0	0,36	7 %

En ce qui concerne la taille des particules des supports, bien que, selon l'équation de Van Deemter, l'efficacité de la colonne augmente à mesure que la taille des particules de garnissage diminue, il existe une limite inférieure due à la résistance à l'écoulement des gaz dans les lits chromatographiques constitués de particules très fines. En pratique, la taille des particules utilisées varie entre 40 et 120 mailles A.S.T.M. (420 à 125 μm). (420 à 125 μm), les tailles de particules les plus fréquentes étant 60 - 80, 80-100 et 100 - 120 mesh.

4.5.4. La phase stationnaire

La phase stationnaire joue un rôle fondamental dans la chromatographie en phase gazeuse, car la phase mobile est chromatographiquement inerte et les séparations sont dues exclusivement aux interactions spécifiques qui se produisent entre les composants de l'échantillon et la phase stationnaire.

Comme dans presque tous les cas, les propriétés souhaitables d'une phase stationnaire sont souvent contradictoires, de sorte qu'il n'existe pas de phase stationnaire idéale. Les propriétés qu'une phase stationnaire doit remplir sont les suivantes :

il doit avoir une plage de température d'utilisation aussi large que possible (idéalement entre -60 et 400 EC).

- 1) il doit avoir une pression de vapeur aussi faible que possible.
- 2) il doit être thermiquement stable.
- 3) il doit être chimiquement inerte.
- 4) il doit avoir une faible viscosité dans les conditions de travail.
- 5) elle doit bien mouiller le substrat et avoir une adhérence suffisante pour ne pas être entraînée par la phase mobile.

En plus de ces exigences générales, la phase stationnaire doit être sélective vis-à-vis des composés à séparer. Il est évident qu'il n'existe pas de phase stationnaire qui réponde à toutes les exigences ci-dessus, bien que pour les séparations à haute température, l'utilisation de polymères "liquides" de poids moléculaire élevé donne d'assez bons résultats.

Au niveau moléculaire, la rétention d'un soluté par la phase stationnaire peut être due à tout type de forces intermoléculaires :

- 1) Forces de dispersion (forces de Londres). Ces forces sont dues aux champs électriques produits par les dipôles instantanés dus au mouvement relatif des noyaux et des électrons. Les forces de dispersion sont les seules forces qui agissent entre les phases stationnaires et les solutés non polaires.

- 2) Forces d'induction (forces de Debye). Ce type de force est dû à l'interaction électrostatique entre les dipôles permanents et les dipôles instantanés, formés dans les molécules non polaires mais polarisables, induite par les premiers.
- 3) Forces d'orientation (forces de Keesom). Elles sont dues à l'interaction entre les dipôles permanents de la phase stationnaire et du soluté.
- 4) Forces donneur-accepteur. Ils sont dus à des interactions chimiques de nature faible (un exemple est la liaison hydrogène), dans lesquelles il y a un transfert incomplet d'électrons du donneur à l'accepteur.

Pour les composés non polaires, les seules forces d'interaction entre le soluté et la phase stationnaire sont des forces dispersives ; ces forces ne sont pas sélectives et, dans les séparations basées sur ce type de forces, les solutés sortent de la colonne, généralement dans l'ordre de leur point d'ébullition. En fonction de ce type de force, les solutés sortent de la colonne, généralement dans l'ordre de leur point d'ébullition.

Pour les composés polaires, les interactions les plus importantes sont celles dues aux forces d'induction et d'orientation et, dans certains cas, aux interactions électroniques spécifiques donneur-accepteur ; ces forces dépendent du moment dipolaire et des polarisabilités de la phase stationnaire et du soluté.

La somme de toutes les interactions entre un soluté et une phase stationnaire est une mesure de la "polarité" de la phase par rapport au soluté, qui marque les caractéristiques générales de rétention, tandis que l'ampleur de chacun des types particuliers d'interactions marquera la sélectivité de la phase stationnaire, qui est d'une grande importance car elle peut permettre la séparation de solutés de polarité égale dans une phase stationnaire particulière.

4.5.5. Caractérisation des phases stationnaires

Les caractéristiques les plus intéressantes lors du choix d'une phase stationnaire particulière sont la plage de température de travail, la viscosité de la phase dans cette plage et sa capacité à interagir sélectivement avec différents solutés.

En règle générale, la température la plus basse à laquelle une phase stationnaire peut

être utilisée correspond à sa température de fusion. La limite supérieure de température d'une phase stationnaire est la température la plus élevée à laquelle elle peut être maintenue sans décomposition ou saignement significatif. De nombreuses phases stationnaires polymères présentent une dispersion importante dans leur gamme de poids moléculaires, de sorte que les oligomères qu'elles peuvent contenir s'évaporent, laissant la colonne avec une proportion de phase stationnaire beaucoup plus faible que prévu ; dans ces cas, la température maximale d'utilisation est définie comme la température à laquelle la phase stationnaire peut être maintenue pendant 24 heures sans changement appréciable des caractéristiques de rétention de la colonne.

Les caractéristiques de rétention d'une phase stationnaire (polarité et sélectivité) sont déterminées par la méthode de McReynolds. Le système Rohrschneider/McReynolds est basé sur l'additivité des forces d'attraction intermoléculaires, qui peut être évaluée à partir des différences entre les indices de rétention d'une série de composés testés dans la phase stationnaire à caractériser et dans le squalane (une phase de référence apolaire).

Les constantes de caractérisation initialement proposées par Rohrschneider (X', Y', Z', U' et S'), ont été calculées sur la base de la rétention du benzène, de l'éthanol, de la 2-butanone, du nitrométhane et de la pyridine. Dans la méthode proposée par McReynolds, 10 composés d'essai sont utilisés (tableau 2), bien que pour la caractérisation de routine, seules les cinq premières constantes (X' à S') soient utilisées.

La détermination pratique des constantes de McReynolds est effectuée en mesurant pour chacun des composés testés l'indice de rétention de Kovats dans la phase à caractériser et dans le squalane. L'indice de rétention de Kovats est défini par l'équation :

$$I = 100.z + 100.n \left(\frac{\log t'_R(x) - \log t'_R(z)}{\log t'_R(z+n) - \log t'_R(z)} \right) \quad (25)$$

I	Taux de rétention de la substance x
$t'_R(x)$	Temps de rétention corrigé de la substance x
z	Nombre d'atomes de carbone d'un n-alcane élué de la colonne avant la substance x
z+n	Nombre d'atomes de carbone d'un n-alcane élué après la substance x
$t'_R(z)$	et Temps de rétention corrigés des deux n-alcane
$t'_R(z+n)$	

A partir des taux de rétention, chaque constante de phase stationnaire est déterminée par la différence entre le taux de rétention du composé à tester dans celle-ci et dans le squalane ; ainsi, par exemple, la constante X' d'une phase stationnaire est calculée par l'équation :

$$X' = \Delta I (\text{benzène}) = I^{\text{phase}} - I^{\text{squalane}} \quad (26)$$

La détermination des constantes de McReynolds est normalement effectuée à une température de colonne de 100 - 120 EC et avec un recouvrement de phase stationnaire de 10 - 20 %.

Les constantes de McReynolds peuvent être utilisées non seulement pour caractériser les phases stationnaires, mais aussi comme guide pour sélectionner la phase à utiliser pour la séparation d'un composé donné en fonction de sa fonctionnalité ; ainsi, si l'objectif est de séparer une série de composés ayant une fonctionnalisation commune, dans une première tentative, une phase stationnaire ayant une valeur élevée des constantes de McReynolds liées au groupe fonctionnel commun pourrait être sélectionnée de sorte que la phase stationnaire ait une sélectivité élevée. Dans tous les cas, il faut toujours garder à l'esprit que ces constantes caractérisent les phases stationnaires en première approximation, et que parfois des phases stationnaires avec des sélectivités très différentes peuvent être trouvées malgré des valeurs très similaires des constantes de McReynolds.

Tableau 5 : Composés utilisés et signification des constantes de McReynolds.

symbole	Composé d'essai	Interaction mesurée	Groupe fonctionnel impliqué
X'	Benzène	Forces de diffusion et propriétés d'accepteur de protons faibles	Aromatiques et oléfines
ET'	1-butanol	Forces directrices et capacité de donner et d'accepter des protons	Alcools, nitriles et acides
Z'	2-pentanone	Forces d'orientation et capacité à accepter des protons	Cétones, éthers, aldéhydes, esters, époxydes, dérivés diméthylamino
OU'	Nitropropane	Forces d'orientation	Nitriles et dérivés nitrés
S'	Pyridine	Forces d'orientation faibles et capacité d'acceptation de protons	Bases aromatiques
H'	2-méthyl-2-pentanol		Composés amis, en particulier les alcools
J'	2-iodobutane		Composés halogénés
K'	2 octobre		
L'	1,4-dioxane	Forces d'orientation et capacité à accepter des protons	
M'	cis-hydrindan		

4.5.6. Caractéristiques de quelques phases stationnaires

En chromatographie en phase gazeuse, la plupart des séparations peuvent être réalisées à l'aide de quelques types de phases stationnaires couramment utilisées, synthétisées spécifiquement pour cet usage. Dans ce qui suit, nous décrirons quelques types de phases stationnaires couramment utilisées.

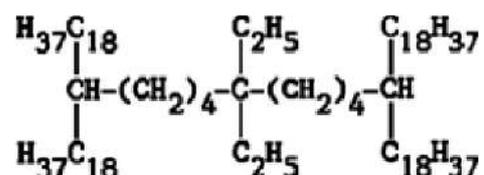
A) Hydrocarbures

Depuis les débuts de la chromatographie en phase gazeuse, les hydrocarbures de haut poids moléculaire (squalane, graisses apiezon, etc.) ont été utilisés comme phases stationnaires apolaires.

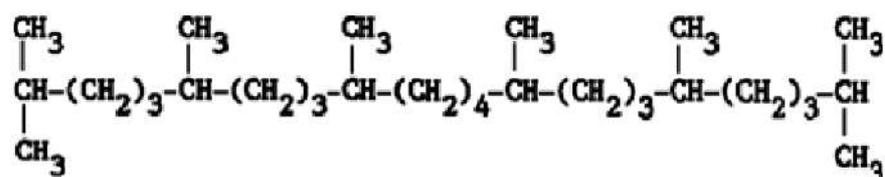
Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

Les seules forces d'interaction avec ces phases sont des forces de dispersion, de sorte que les composés chromatographiés seront élués des colonnes utilisant ces phases par ordre de volatilité, et dans le cas de certains composés très polaires, dans l'ordre inverse de leur hydrophobie.

Ce type de phase stationnaire est largement utilisé comme référence pour la caractérisation d'autres phases stationnaires, utilisant principalement le squalane à cette fin :



Le squalane a l'inconvénient d'avoir une température maximale de travail très basse (120 EC), aussi son remplacement par l'apiezon MH ou l'hydrocarbure de Kovats ou l'apolane-87 a parfois été proposé :

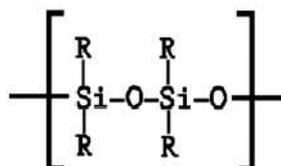


Le principal inconvénient de ce type de phases stationnaires est leur facilité d'oxydation, qui entraîne généralement une altération de leurs caractéristiques de rétention et, dans les cas extrêmes, un saignement élevé par fragmentation des chaînes d'hydrocarbures.

B) Polysiloxanes

Les polysiloxanes ou silicones sont de loin le groupe de phases stationnaires le plus utilisé en raison de leur grande stabilité thermique et de la possibilité de modifier chimiquement la structure de base pour obtenir des phases de polarités et de sélectivités différentes.

Les polysiloxanes sont basés sur la structure :



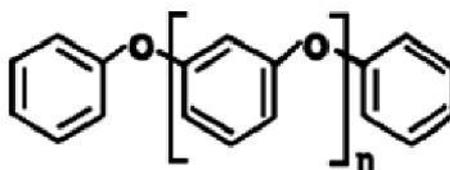
Lorsque R peut correspondre à des groupes méthyle, vinyle, phényle, 3,3,3-trifluoropropyle, cyanoéthyle, etc., l'ensemble de la structure peut être substitué par un seul groupe ou par des mélanges de n'importe lesquels de ceux-ci dans n'importe quelle proportion.

Les matériaux de ce type destinés à être utilisés en chromatographie en phase gazeuse doivent être extrêmement purs, ne contenir aucune trace du catalyseur de polymérisation ou d'oligomères, et les groupes terminaux des polymères doivent être soigneusement bloqués pour maximiser la stabilité thermique. Outre ces exigences, les polysiloxanes présentent une inertie thermique et chimique exceptionnelle.

Les grandes possibilités de variation structurelle de ces composés permettent d'obtenir des phases stationnaires hautement sélectives. A cet égard, les polysiloxanes phényliques, cyanopropyliques et trifluoropropyliques présentent de très bonnes caractéristiques de sélectivité.

C) Polyphényléthers

Les polyphényléthers, dont la structure de base est :



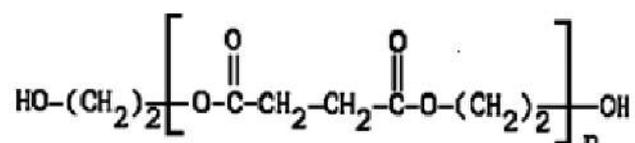
Ce sont des phases stationnaires modérément polaires, chimiquement bien caractérisées et utiles pour de nombreuses séparations.

Leur volatilité est extraordinairement faible compte tenu de leur petit poids moléculaire (pour des valeurs de $n = 2$ et 3 , ils sont stables jusqu'à 200 et 250 EC respectivement), de sorte que les polymères de ce type avec une valeur moyenne de

20 cycles sont très utiles pour les séparations à haute température (jusqu'à 400 EC).

D) Polyesters

Les polyesters sont un groupe de polymères résineux formés par la polycondensation d'un acide polybasique avec un polyol. Les polyesters les plus fréquemment utilisés comme phases stationnaires sont les adipates et les succinates d'éthylène glycol, de diéthylène glycol et de butanediol ; en particulier, le succinate de polyéthylène glycol (PEGS) est largement utilisé :



Les polyesters sont des phases stationnaires modérément polaires. Les colonnes préparées avec ce type de phases présentent le problème d'une mauvaise stabilité car les polyesters sont facilement hydrolysables, peuvent réagir avec certains composants de l'échantillon (par exemple les amines) et sont très sensibles à l'oxydation ; pour ces raisons, l'utilisation des polyesters comme phases stationnaires a considérablement diminué.

E) Polyéthylène glycols

Les polyéthylèneglycols sont des phases stationnaires très utiles pour la séparation des composés polaires et ont le potentiel pour la liaison hydrogène. Ces phases stationnaires sont préparées par polymérisation de l'oxyde d'éthylène, qui donne naissance à la structure :



Les polymères ainsi formés se séparent en fractions de poids moléculaire moyen différent, donnant lieu à toute la gamme de ces phases stationnaires.

Le facteur fondamental qui détermine les caractéristiques de rétention de ce type de phase est la concentration des groupes hydroxyle et, dans une bien moindre mesure, le poids moléculaire moyen de la phase. Ce dernier facteur, par contre, a une grande influence sur la stabilité thermique de la phase ; ainsi, le Carbowax 20M, avec un poids moléculaire moyen de 14 000, a une température maximale d'utilisation de 225 EC, tandis que le Superox-4, avec un poids moléculaire moyen de 4 millions, est utilisable à des températures allant jusqu'à 300 EC. Le principal inconvénient de ces types de phases stationnaires est leur facilité d'oxydation.

4.5.7. Phases stationnaires liées

En général, l'un des facteurs influençant la limite de température d'utilisation des phases stationnaires, en particulier celles de faible viscosité, est la tendance de ces dernières à être entraînées dans le courant de gaz porteur, car la viscosité de la phase diminue avec l'augmentation de la température ; cet effet est particulièrement important dans le cas des colonnes capillaires, car les parois internes du tube, dépourvues d'irrégularités, ne présentent pas de bonnes caractéristiques structurelles pour maintenir un film liquide.

Une solution à ce problème consiste à immobiliser chimiquement la phase stationnaire, soit en ancrant chimiquement la phase liquide à la surface du support ou de la paroi du tube capillaire, soit en réticulant chimiquement les molécules de la phase stationnaire pour former un réseau tridimensionnel à faible mobilité.

Ces phases stationnaires sont connues sous le nom de phases liées ou de phases immobilisées et présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux phases stationnaires conventionnelles ; tout d'abord, les phases immobilisées offrent des températures de travail plus élevées que les phases conventionnelles et présentent un niveau de saignement plus faible à des températures élevées ; ensuite, comme ces phases sont pratiquement insolubles, elles sont beaucoup moins affectées que les phases normales par l'injection de volumes élevés de solvant. Un autre avantage

de ce type de phase est que les colonnes contaminées par des composants non volatils de l'échantillon peuvent être régénérées par lavage avec des solvants appropriés.

L'utilisation de phases liées est particulièrement répandue dans les colonnes tubulaires ouvertes (la plupart des colonnes de ce type utilisent des phases immobilisées), mais il est également courant de trouver ce type de phase, liée sur des supports diatomés ou sur de la silice, pour une utilisation dans des colonnes à garnissage (Ultra-bond, Durapak, Porasil, etc.).

4.5.8. Adsorbants pour la chromatographie gaz-solide

La chromatographie en phase gazeuse solide n'a jamais atteint le même niveau d'utilisation que la chromatographie en phase gazeuse liquide ; ceci est dû principalement à plusieurs facteurs :

- 1) Les isothermes d'adsorption en chromatographie gaz-solide sont non linéaires, ce qui entraîne des volumes de rétention variant avec la quantité d'échantillon, des pics asymétriques et, fréquemment, des échantillons qui n'éluent pas complètement de la colonne.
- 2) La surface spécifique élevée des adsorbants, associée à une énergie d'interaction relativement importante, entraîne des temps de rétention excessivement longs ; en outre, de nombreux adsorbants présentent de fortes propriétés de catalyse aux températures de fonctionnement des colonnes.
- 3) Les adsorbants sont assez difficiles à standardiser.

Pour ces raisons, l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse solide a été reléguée à la séparation des gaz inorganiques, des hydrocarbures de faible poids moléculaire, des petites molécules polaires, etc.

La silice sphérique, l'alumine, le carbone graphité et les tamis moléculaires (zéolites) sont principalement utilisés comme adsorbants pour la chromatographie en phase gazeuse solide.

Un autre groupe d'adsorbants pour la chromatographie gaz-solide est constitué de

polymères poreux. Ces adsorbants sont préparés par polymérisation en suspension dans un solvant inerte ; des structures de type éponge sont ainsi formées, le solvant remplissant les pores de la structure et, après un processus de séchage, la structure poreuse est maintenue, mais avec une rigidité suffisante pour pouvoir remplir la colonne. Il existe de nombreux types de polymères (série Chromosorb 100, Porapak, etc.), avec des caractéristiques de rétention différentes, obtenues en faisant varier le monomère, le réactif de réticulation, etc.

Ce type de polymère trouve sa principale application dans la séparation des composés qui donnent lieu à une très forte adsorption sur les supports diatomés classiques (eau, alcools, acides carboxyliques, etc.). Les principaux inconvénients de ce type d'adsorbants sont leurs températures maximales de travail, qui sont relativement basses, et un saignement élevé, qui rend difficile leur utilisation avec des détecteurs très sensibles.

4.6. CHOIX DE LA COLONNE

Le choix de la colonne pour une séparation chromatographique en phase gazeuse particulière est généralement la tâche la plus difficile dans le développement d'une méthode, mais c'est aussi le principal facteur dont dépendra le succès ou l'échec du développement.

Le choix de la colonne chromatographique est normalement une tâche empirique ; néanmoins, en règle générale, il peut être. Toutefois, en règle générale, on peut recommander de suivre une série d'étapes dans le choix, qui, de moins en plus difficiles, sont les suivantes :

4.6.1. Recherche de méthodologies existantes

Il existe une énorme quantité de séparations décrites dans la littérature et, dans de nombreux cas, il est possible de trouver, même sans une recherche exhaustive, une méthodologie appropriée pour la séparation à réaliser. Dans de nombreux autres cas, il est relativement facile de trouver des méthodologies développées pour des composés ayant une structure similaire à ceux à séparer, et ces conditions peuvent

être utilisées comme point de départ pour la méthode à développer.

4.6.2. Utilisation de colonnes capillaires

Comme nous l'avons déjà mentionné, les colonnes capillaires (ou tubulaires ouvertes) peuvent fournir des rendements très élevés, de sorte qu'il est relativement facile pour une colonne capillaire d'effectuer une séparation particulière uniquement sur la base de son rendement. Les colonnes capillaires ne sont disponibles dans le commerce qu'avec une variété très limitée de phases stationnaires (généralement 6 ou 7), couvrant toute la gamme des polarités ; le choix d'une colonne particulière est facile à faire sur la base de la nature chimique des composés à séparer et des constantes de McReynolds des phases stationnaires disponibles.

4.6.3. Utilisation de colonnes garnies

Si l'instrumentation disponible ne permet pas l'utilisation de colonnes capillaires, si l'échantillon à séparer ne se prête pas à leur utilisation (nécessité d'injecter de grandes quantités, problèmes de discrimination dans l'injection, etc.) ou si le rendement nécessaire pour effectuer la séparation (calculé sur la base de l'équation de résolution) dépasse les limites raisonnables, il est nécessaire de recourir à l'utilisation de colonnes à garnissage.

L'utilisation de colonnes garnies permet dans de nombreux cas, malgré le faible rendement qu'elles offrent, de réaliser des séparations très complexes basées sur la sélectivité de la phase stationnaire, puisqu'il existe dans ce cas une énorme variété de phases aux caractéristiques différentes parmi lesquelles on peut choisir celle qui convient. La sélection préalable d'une phase stationnaire peut se faire sur la base de la structure des composés à séparer et des constantes de McReynolds des phases, qui donneront une idée du type d'interactions sur lesquelles les ainsi que les groupes fonctionnels des molécules de soluté qui peuvent être impliqués.

4.6.4. Utilisation de phases mixtes

L'un des moyens d'obtenir des sélectivités très élevées en chromatographie en phase gazeuse consiste à utiliser des mélanges de deux ou plusieurs phases stationnaires.

La préparation des phases mixtes peut se faire de différentes manières :

- a) Fragments de garnissage, chacun avec une phase stationnaire différente, disposés en série le long de la colonne.
- b) Colonnes à lit mélangé, dans lesquelles chacune des phases stationnaires, déjà déposée sur un support approprié, est mélangée dans des proportions appropriées.
- c) Les charges à phase mélangée, dans lesquelles les phases stationnaires sont mélangées avant d'être déposées sur le support solide.

L'utilisation de phases mixtes appropriées permet d'obtenir une large gamme de propriétés de rétention. En général, les phases mixtes ont des propriétés de rétention intermédiaires entre celles des phases qui composent le mélange (il existe des méthodes de calcul théorique permettant de prédire le comportement d'une phase mixte à partir des données de rétention d'un mélange dans chacune des phases stationnaires individuelles), de sorte que l'utilisation de phases mixtes est largement répandue pour obtenir un "réglage fin" des propriétés de rétention d'une phase stationnaire ; Cependant, et c'est peut-être le cas le plus intéressant, lorsqu'on réalise un mélange de phases de polarités très différentes, le comportement de la phase mélangée est très différent de celui des composants individuels (comportement non idéal).

Il est clair que la séparation d'un mélange peut, si des sélectivités particulières sont requises, demander un travail immense. Il faut donc garder à l'esprit que le développement d'une méthodologie de séparation complexe n'est justifié que lorsque le nombre d'échantillons à analyser avec elle est suffisant pour justifier le travail nécessaire ou lorsqu'il est absolument impossible d'effectuer l'analyse d'un échantillon de grand intérêt par une autre technique.

4.7. SÉLECTION DES CONDITIONS DE TRAVAIL

En dehors du choix de la colonne à utiliser, il y a très peu de paramètres expérimentaux qui peuvent être influencés lors de la réalisation d'une séparation et, normalement, leur optimisation est très simple. Fondamentalement, les paramètres à

définir dans chaque cas seront les suivants :

- 1) Nature et vitesse du gaz porteur.
- 2) Température du détecteur.
- 3) Température d'injection.
- 4) Température de la colonne.

Comme nous l'avons déjà mentionné, le gaz porteur est fondamentalement inerte lors de la séparation, de sorte que le choix de l'un ou l'autre dépendra dans chaque cas des besoins de l'équipement et, accessoirement, de la rapidité de l'analyse. En règle générale, dans tous les cas, il faut travailler avec la vitesse linéaire du gaz qui correspond au minimum de la courbe AEPT, bien que dans le cas de séparations qui ne nécessitent pas une efficacité élevée de la colonne, la vitesse puisse être augmentée pour raccourcir le temps d'analyse au détriment de l'efficacité.

La température du détecteur, bien que dans certains types de détecteurs elle puisse influencer la réponse, n'est normalement pas un paramètre qui nécessite une optimisation excessive. La température du détecteur doit toujours être supérieure à la température maximale de travail (ou de nettoyage) à laquelle la colonne est soumise, afin d'éviter la condensation des éluats peu volatils sur le détecteur ; en dehors de ce critère, les seules limitations seront celles qui peuvent être déterminées par le type particulier d'instrument en question.

La température d'injection n'est généralement pas non plus un paramètre difficile à optimiser ; en général, elle doit être suffisamment élevée pour volatiliser complètement tous les composants de l'échantillon, et ne doit pas être augmentée au-delà de ce niveau pour éviter une éventuelle décomposition thermique de l'échantillon. Ces critères sont les seuls à prendre en compte sauf dans le cas de systèmes d'injection particuliers (injections sans fractionnement, froid sur colonne, etc.) qui ont déjà été abordés.

La température de la colonne, si elle fonctionne dans des conditions isothermes, ou son programme de chauffage sont les seuls paramètres instrumentaux qui peuvent avoir une influence décisive sur la séparation.

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

Dans des conditions de travail isothermes, les pics apparaissant à des volumes de rétention faibles sont souvent mal résolus, tandis que ceux à des volumes de rétention élevés, bien que bien résolus, apparaissent à des temps très longs et présentent un élargissement considérable (Figure 33). Il est donc clair que la température de la colonne doit être choisie de manière à ce que les composants d'intérêt du mélange apparaissent avec des volumes de rétention moyens, même au prix de laisser les composants ayant des temps de rétention plus longs retenus dans la colonne (Figure 34). Dans ces cas, deux ou trois injections d'essai sont suffisantes pour déterminer une température de travail appropriée.

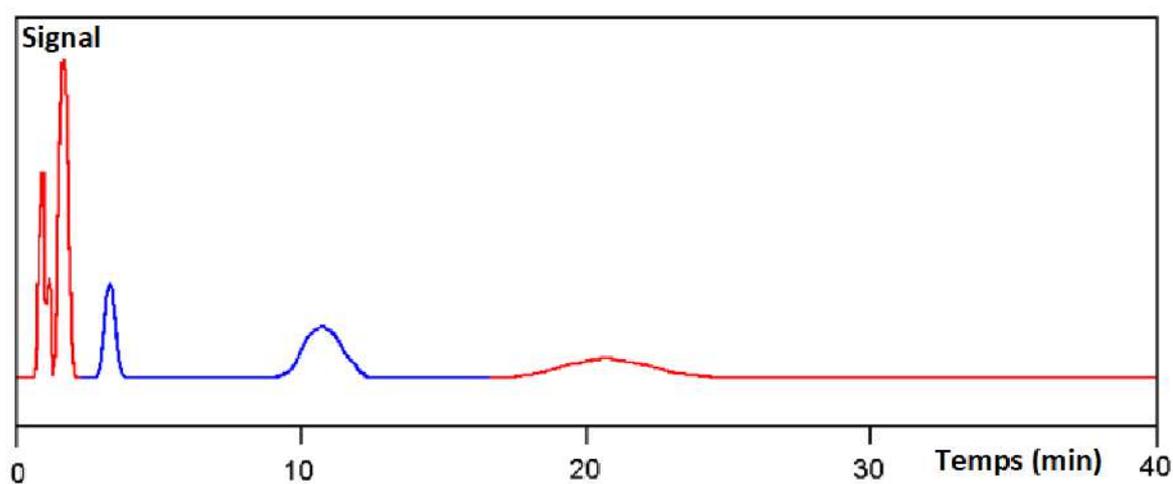


Figure 33 : Chromatogramme d'un mélange dans des conditions isothermes.

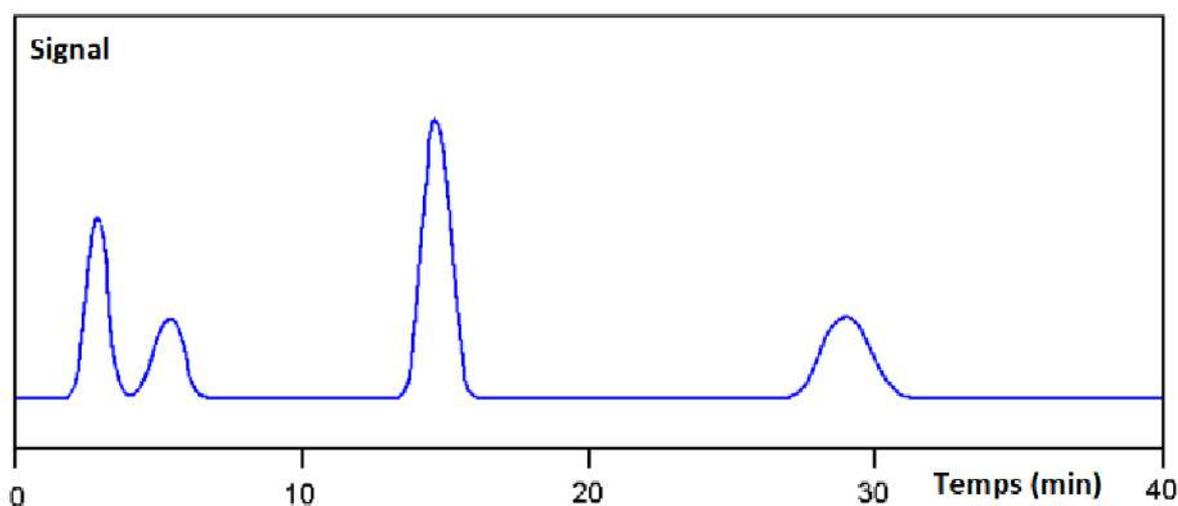


Figure 34 : Conditions isothermes appropriées aux composés d'intérêt.

Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques

Dans les échantillons complexes et avec des composants ayant des volumes de rétention très différents, il est très pratique d'utiliser des techniques de programmation de la température (figure 35), c'est-à-dire d'augmenter la température de la colonne selon un programme de chauffage de la température en fonction du temps préalablement établi.

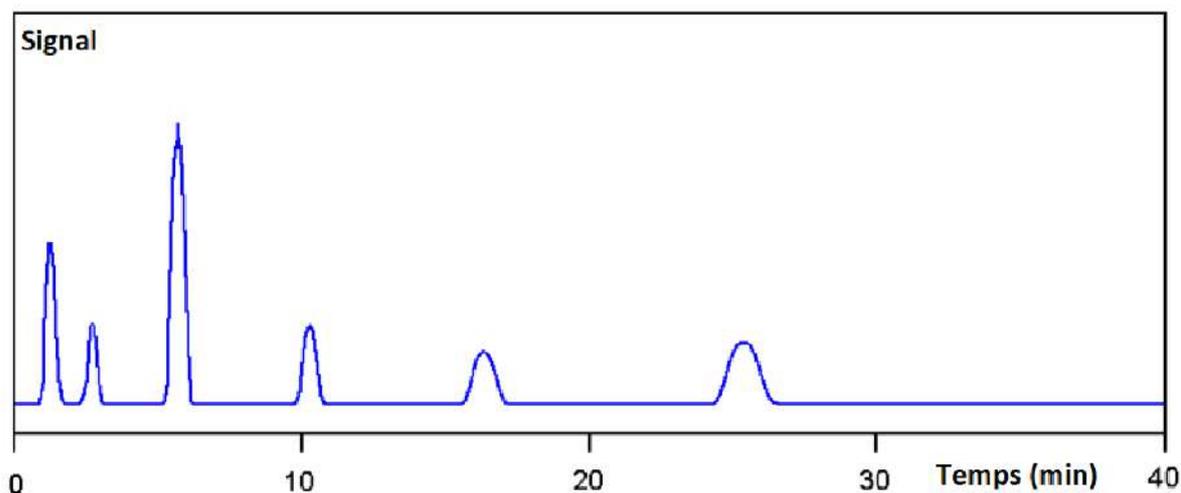


Figure 35 : Chromatogramme d'un mélange programmé en fonction de la température.

Dans ces cas, il est très pratique d'effectuer un essai préliminaire avec une vitesse de chauffage relativement élevée et couvrant une gamme de température très large, afin d'estimer la température à laquelle chaque composant élu et la résolution des pics ; au vu des résultats obtenus, la gamme de température à utiliser peut être fixée plus précisément, ainsi que la vitesse de chauffage, en tenant compte du fait que la plus grande séparation entre les composants est toujours obtenue avec des vitesses de chauffage très basses.

CHAPITRE 2
SPECTROSCOPIE MOLECULAIRE
UV – VISIBLE

1. INTRODUCTION

Les techniques spectroscopiques sont basées sur l'échange d'énergie qui se produit entre l'énergie rayonnante et la matière.

En particulier, la spectrophotométrie d'absorption s'intéresse aux phénomènes d'absorption des radiations lumineuses dans la région du spectre électromagnétique appartenant au domaine du visible (400 - 780 nm) et du proche ultraviolet (200 - 400 nm) (Figure 36).

L'UV lointain (10 - 200 nm) est également concerné, bien que dans ce cas le travail soit effectué sous vide ou dans une atmosphère de gaz inerte, car l'oxygène atmosphérique couvre les signaux des autres substances.

L'absorption de ces types de rayonnement par les molécules est capable de produire des transitions énergétiques des électrons extérieurs de la molécule, qu'ils soient engagés ou non dans une liaison.

Rayons γ et cosmiques	Rayons X	Ultraviolet lointain	Ultraviolet proche	Visible	Proche Infrarouge	Infrarouge	Ondes courtes et ondes radio
	0,1 nm		200nm	400 nm	800 nm	2 μ m	50 μ m

Figure 36 : Spectres électromagnétiques.

Tableau 6 : Spectre UV Visible.

Visible	780 nm – 400 nm
Proche – UV	400 nm – 200 nm
UV – lointain	200 nm – 10 nm

2. PRINCIPE

Une transition UV – Visible (souvent 180 à 750 nm) correspond à un saut d'un électron d'une orbitale moléculaire fondamentale occupée à une orbitale moléculaire excitée vacante (Figure 37).

La matière absorbe alors un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre ces niveaux fondamental et excité. Mais toutes les transitions énergétiquement possibles ne sont pas permises.

Les transitions permises sont celles qui provoquent une variation du moment dipolaire électrique.

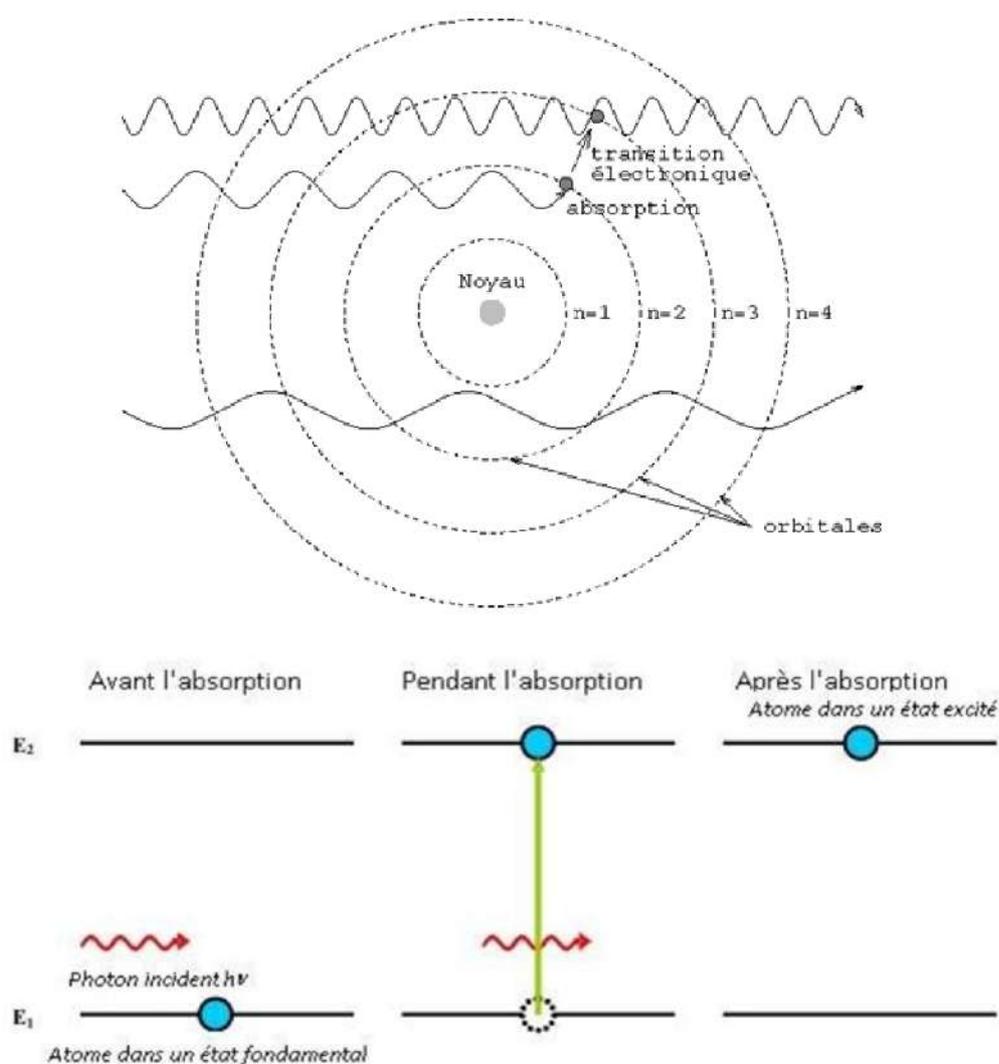


Figure 37 : Transition électronique.

2.1. SPECTRE D'ABSORPTION

Un spectre d'adsorption UV – Visible est en règle générale le tracé de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde (usuellement exprimée en nm) (Figure 38).

La bande d'absorption observée est caractérisée par sa position en longueur d'onde (λ_{\max}) et par son intensité liée au coefficient d'extinction molaire ϵ_{\max} ($A = \epsilon.l.C$); la valeur de ϵ peut indiquer si la transition est permise ou interdite.

La position du maximum d'absorption correspond à la longueur d'onde de la radiation qui provoque la transition électronique.

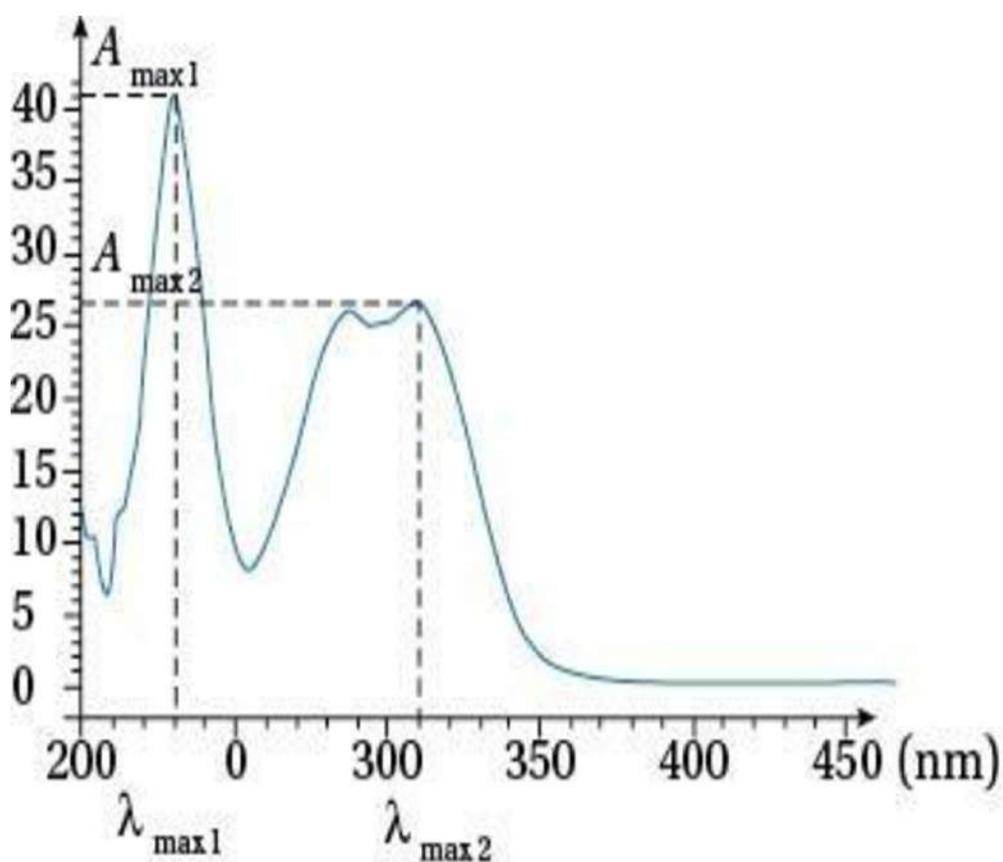


Figure 38 : Spectre d'adsorption UV – Visible.

2.2. LES DIFFERENTS TYPES DE TRANSITIONS ELECTRONIQUES

Les transitions électroniques correspondent au passage des électrons des orbitales moléculaires liantes remplies, vers des orbitales moléculaires anti-liantes non remplies. Le diagramme sur la figure 39.a illustre ceci pour des orbitales de type sigma (σ), pi (π) et non liante (n). Mais toutes les transitions électroniques ne peuvent pas être détectées par les spectrophotomètres U.V, ainsi la figure 39.b illustre les transitions détectées :

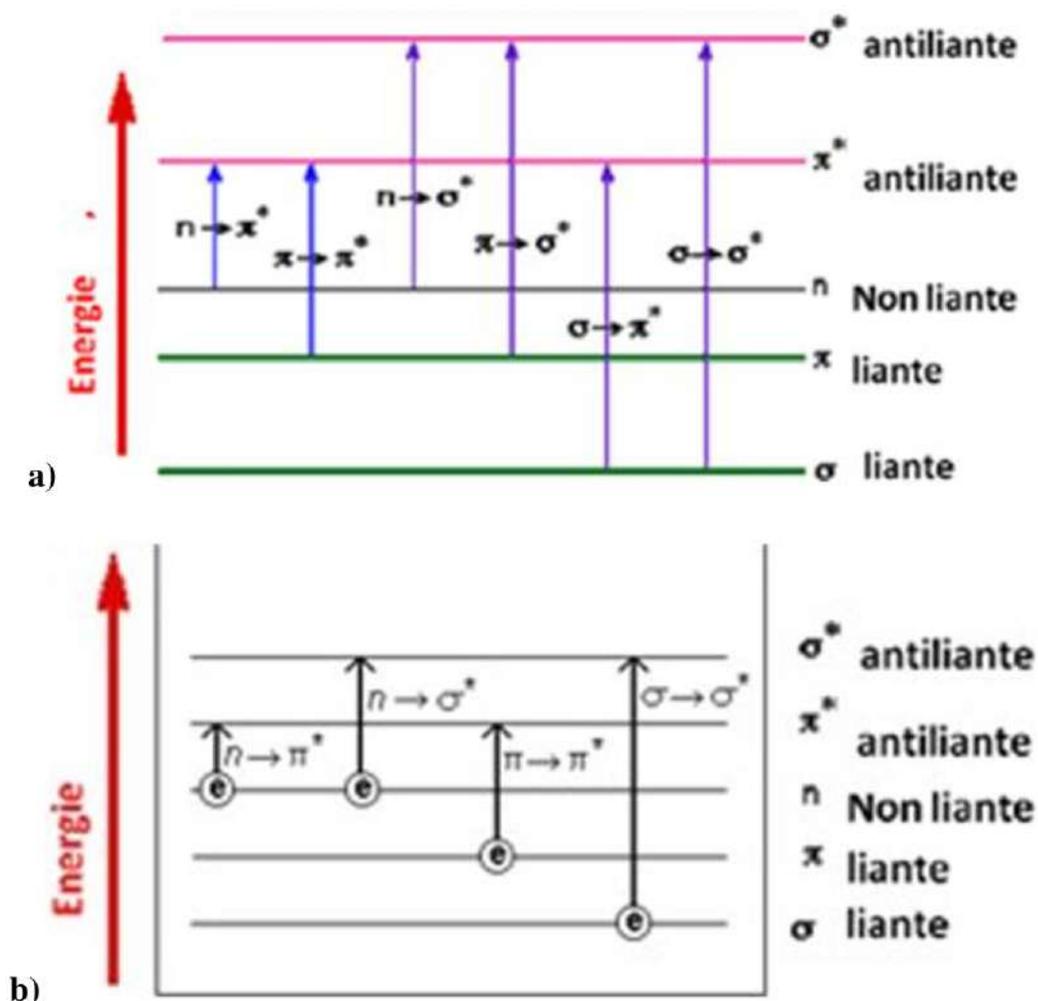


Figure 39 : Types de transitions électroniques.

L'absorption d'un photon dans le domaine UV – Visible peut souvent être attribuée à des électrons appartenant à des petits groupes d'atomes appelés chromophores ($C=C$, $C=O$, $C\equiv C$ et $C\equiv N\dots$).

La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu.

2.2.1. Electrons engagés dans une liaison sigma.

Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

La grande stabilité des liaisons σ des composés organique fait que la transition d'un électron d'un OM liante σ vers une OM antiliante σ^* demande beaucoup d'énergie. La bande d'absorption correspondante est intense et située dans l'UV – lointain, $\lambda_{\max} < 150$ nm. C'est pourquoi les hydrocarbures saturés tels l'hexane ou le cyclohexane qui ne présentent que des liaisons du type sigma sont pratiquement transparents dans le proche UV.

2.2.2. Electrons engagés dans une liaison non liante

Transition $n \rightarrow \pi^*$

Cette transition résulte du passage d'un électron d'une OM non-liante n à une OM antiliante π^* . Ce type de transition a lieu dans le cas des molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres appartenant à un système insaturé. $\lambda_{\max} > 190$ nm, faible intensité ($10 < \epsilon < 100$ L.mol⁻¹.cm⁻¹).

La plus connue est celle qui correspond à la bande carbonyle, facilement observable, située entre 270 et 280 nm. Le coefficient d'absorption molaire est faible.

Pour l'éthanal par exemple $\lambda_{\max} = 293$, $\epsilon = 12$ (dans l'éthanol).

Transition $n \rightarrow \sigma^*$

Le transfert d'un électron du doublet n d'un hétéroatome (O, N, S, Cl...) à un niveau σ^* est observé pour les alcools, les éthers, les amines ainsi que pour les dérivés halogénés. Cette transition donne une bande d'intensité moyenne qui se situe à l'extrême limite du proche – UV. $150 \text{ nm} < \lambda_{\max} < 250 \text{ nm}$, intensité moyenne ($50 < \epsilon < 2000$ L.mol⁻¹.cm⁻¹).

Par exemple le méthanol $\lambda_{\max} = 183$, $\epsilon = 500$; l'éther $\lambda_{\max} = 190$, $\epsilon = 2000$.

2.2.3. Electrons engagés dans une liaison pi

Transition $\pi \rightarrow \pi^*$

La transition électronique dans les composés possédant une double liaison isolée conduit à $\lambda_{\max} > 190$ nm (et > 400 nm pour systèmes très conjugués), forte intensité ($1000 < \epsilon < 10000$ L.mol⁻¹.cm⁻¹).

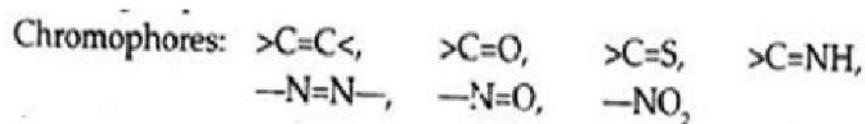
Tableau 7 : Exemples de transitions électroniques pour quelques composés.

	Transition	λ_{\max} (nm)	ϵ
Ethylène (C=C)	$\pi \rightarrow \pi^*$	165	15000
1 – hexyne (C≡C)	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10000
Ethanal (C=O)	$n \rightarrow \pi^*$	293	12
	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10000
Nitrométhane (NO₂)	$n \rightarrow \pi^*$	275	17
	$\pi \rightarrow \pi^*$	200	5000
Bromure de méthyle (CH₃-Br)	$n \rightarrow \sigma^*$	205	200

2.3. TERMINOLOGIE

Les groupements moléculaires disposant d'un système électronique produisant une absorption en UV sont dits **chromophores**.

Mais comme le chromophore est rarement isolé, la bande d'absorption qui lui correspond pourra varier en intensité et position par les influences des autres chromophores.



Un groupement **auxochrome** : groupement saturé qui, quand il est lié à un chromophore, modifie à la fois la longueur d'onde et l'intensité de l'absorption maximale.



Effet **bathochrome** : déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde.

Effet **hypsochrome** : déplacement des bandes d'absorption vers les courtes longueurs d'onde.

Effet **hyperchrome** : augmentation de l'intensité d'absorption. Effet hypochrome : diminution de l'intensité d'absorption.

Ces effets sont illustrés sur la figure 40 suivante :

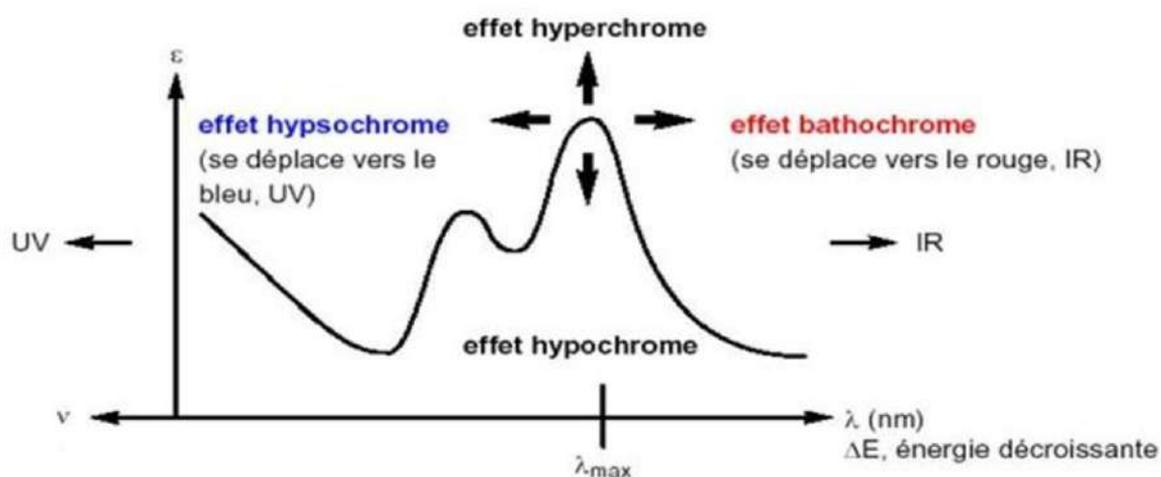


Figure 40 : Effets des substituants sur l'absorption.

3. APPAREILLAGE

3.1. Composition d'un spectromètre d'absorption moléculaire

Le Schéma général d'un spectromètre d'absorption moléculaire (Figure 41) est composé de : Une source de rayonnement (ici, une lampe), un monochromateur (ici, un prisme), un échantillon (ici, une solution dans une cuvette), un détecteur (ici, une photodiode) et un système de traitement du signal (ici, un ordinateur).

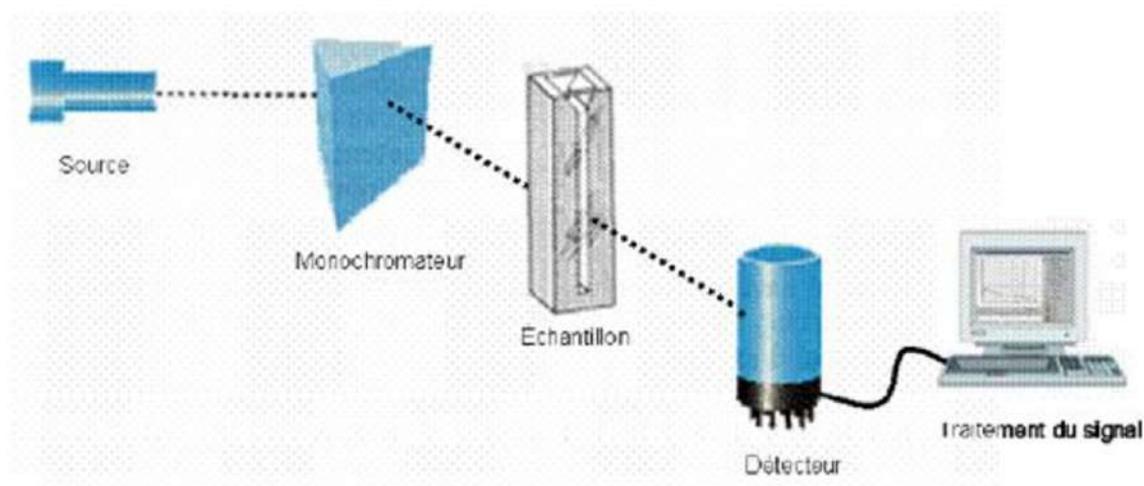


Figure 41 : Schéma général d'un spectromètre d'absorption moléculaire.

➤ **Source de lumière monochromatique :**

- Visible : Lampe à incandescence à Tungstène et iode
- UV : Lampe à arc à Deutérium ou à Xénon, ou mercure

➤ **Monochromateur (sélection de la longueur d'onde) :**

- Prisme
- Réseau

➤ **Cuve :** ($l = 1$ à 100 mm (standard 1 cm) Plastique, verre, quartz)

- Visible : Verre
- UV : Quartz = silice

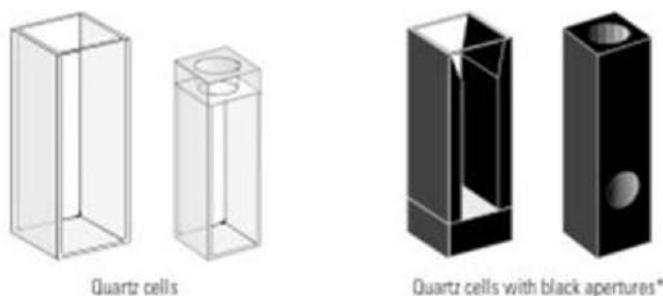


Figure 42 : Cuves de spectrophotométrie.

➤ **Détecteur** = Photomultiplicateur ou photopiles

➤ **Appareil de mesure** = galvanomètre ou enregistreur graphique (+/- amplificateur).

3.2. Différents types de spectrophotomètres

➤ **Spectrophotométrie simple faisceau**

- Nécessite une mesure d'absorbance pour le blanc et une pour l'étalon (Figure 43)

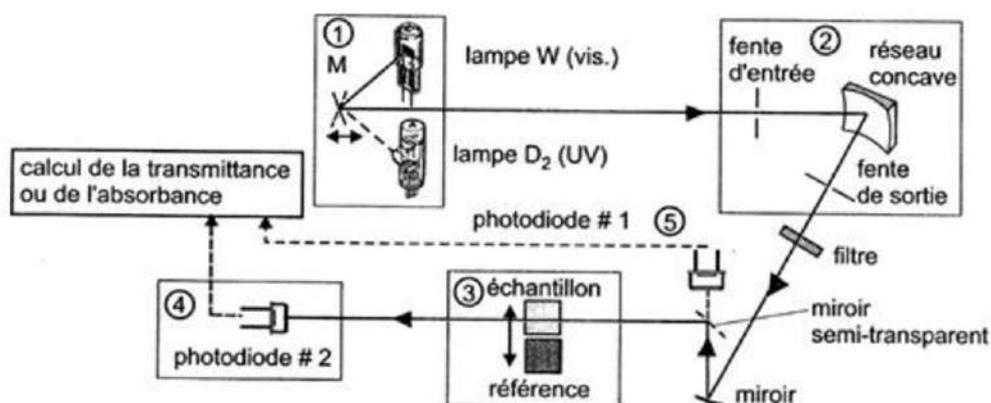


Figure 43 : Spectrophotométrie simple faisceau.

➤ **Spectrophotométrie double faisceau**

- Compensation automatique du solvant = blanc automatique (Figure 44)
- Equipé d'un miroir tournant et d'un miroir semi-argenté qui permettent une lecture simultanée de la cuve blanc + étalon par le détecteur.

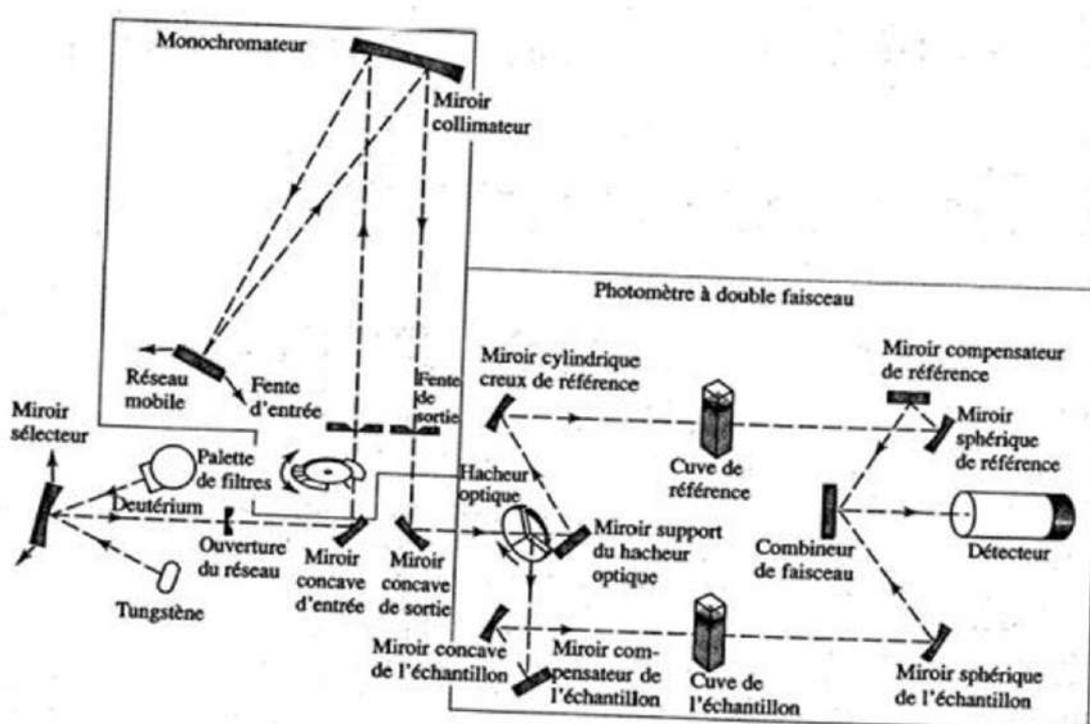


Figure 44 : Spectrophotométrie double faisceau.

4. ASPECT QUANTITATIF

4.1. LOI DE L'ABSORPTION

Lorsqu'un faisceau d'intensité I_0 traverse une solution de molécule absorbante (Figure 45), le faisceau transmit (émergent) présente une intensité I inférieure à I_0 → Il y a eu absorption énergétique (= photons) par les molécules en solutions.

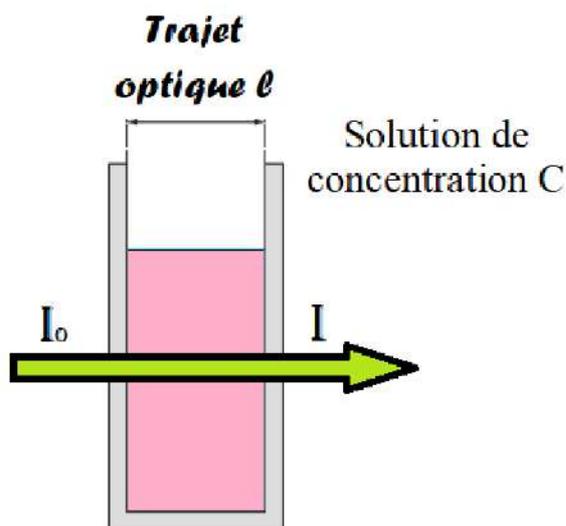


Figure 45 : Traversé du faisceau de lumière dans la solution.

Ce phénomène d'absorption est évalué par le rapport :

$$\frac{I}{I_0} = \text{Transmission (T) (exprimée en \%)}$$

$$-\log (T) = -\log \frac{I}{I_0} = \text{Absorbance} \quad (27)$$

$$I = I_0 e^{-\epsilon.l.C} \quad (28)$$

Loi de BEER LAMBERT

$$A = \epsilon.l.C \quad (29)$$

Absorbance \swarrow \searrow \swarrow \searrow
 longueur de la cuvette (cm) \swarrow
 concentration (mol.l⁻¹) \swarrow
 coefficient d'absorption molaire (l.cm⁻¹.mol⁻¹)

4.2. VALIDITE DE LA LOI

La loi de Beer-Lambert est linéaire (Figure 46) si :

- La solution est diluée et de concentration fixe ($C < 0,01 \text{ M}$).
- ϵ est constant \rightarrow Lumière monochromatique (λ constante)
- l est constante \rightarrow Faisceau perpendiculaire à la cuve
- La solution est transparente
- La solution est non fluorescente
- La solution est stable du point de vue photo chimique
- Pas de réaction avec le solvant

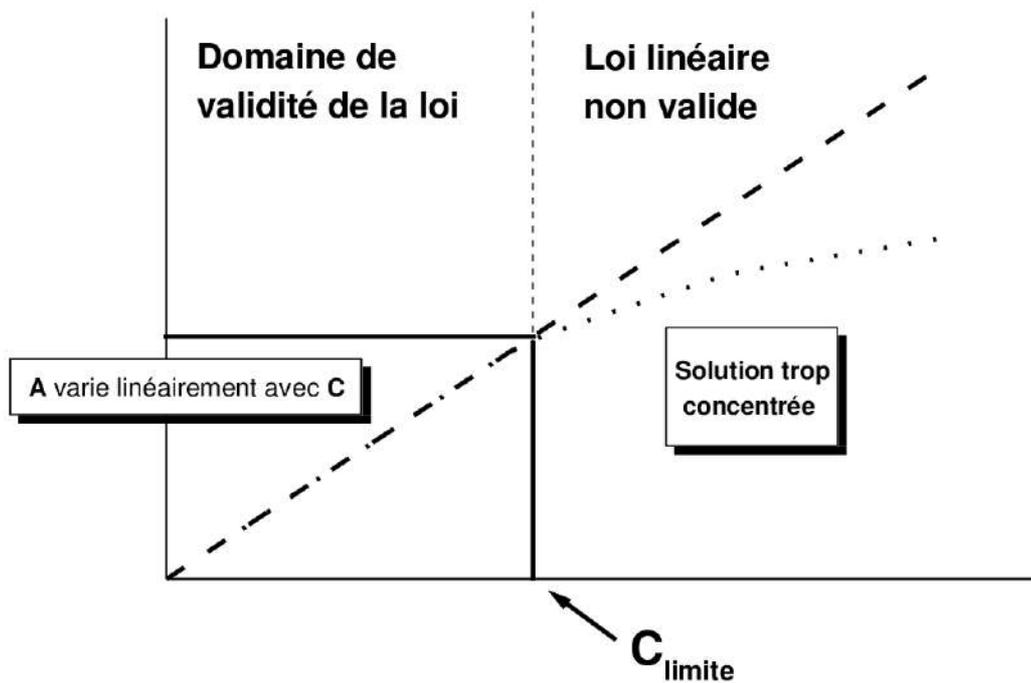


Figure 46 : Limite de validation de la loi de Beer-Lambert.

4.3. APPLICATION A L'ANALYSE QUANTITATIVE : LE DOSAGE

4.3.1. Le choix de la longueur d'onde

- On mesure l'absorption en se plaçant à la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}), de la molécule à doser, car :
 - Au λ_{\max} , l'absorbance mesurée est la plus grande puisque ϵ est maximum → méthode plus sensible
 - Au λ_{\max} , ϵ est le plus constant sur un petit domaine de longueur d'onde → La lumière est plus monochromatique → Linéarité optimum.

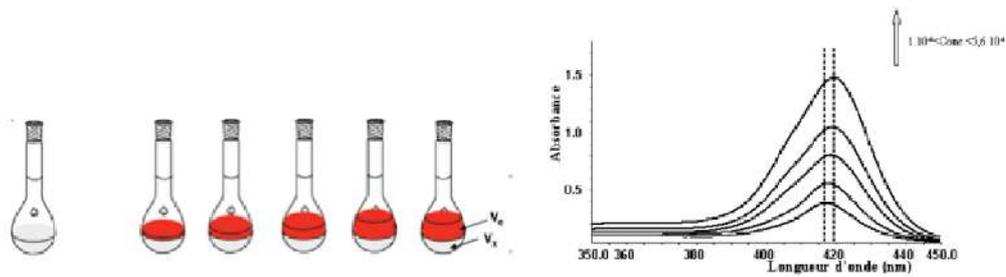
NB : limite de linéarité

4.3.2. L'étalonnage

- L'absorption du rayonnement UV-visible par les molécules, permet de mesurer la concentration de ces espèces présentes dans le trajet optique
- On ne mesure pas directement la concentration, mais on procède à un étalonnage en utilisant des mélanges étalons de concentrations connues.

Remarque : Dans un graphique de l'absorbance en fonction de la concentration ($A = y$ et $C = x$), la pente de la droite obtenue correspond au produit du coefficient d'extinction molaire avec la largeur de la cellule ($= \epsilon \cdot l$).

Remarque : La valeur de ϵ pour toutes les bandes d'absorption du spectre d'un composé est une constante caractéristique d'une structure moléculaire donnée à une longueur d'onde donnée. Les valeurs de ϵ sont donc différentes d'une bande à l'autre dans un spectre d'absorption.



Analyse quantitative = au maximum d'absorption (λ_{max})

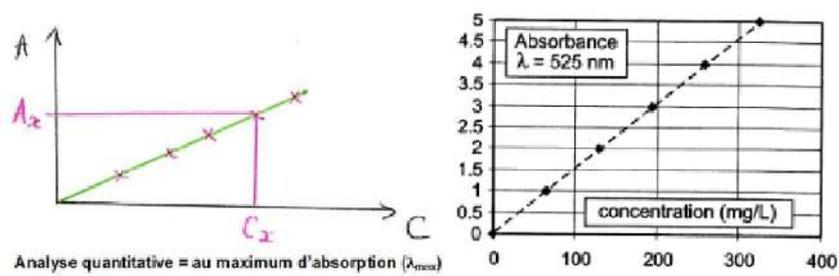


Figure 47 : Préparation des solutions étalon.

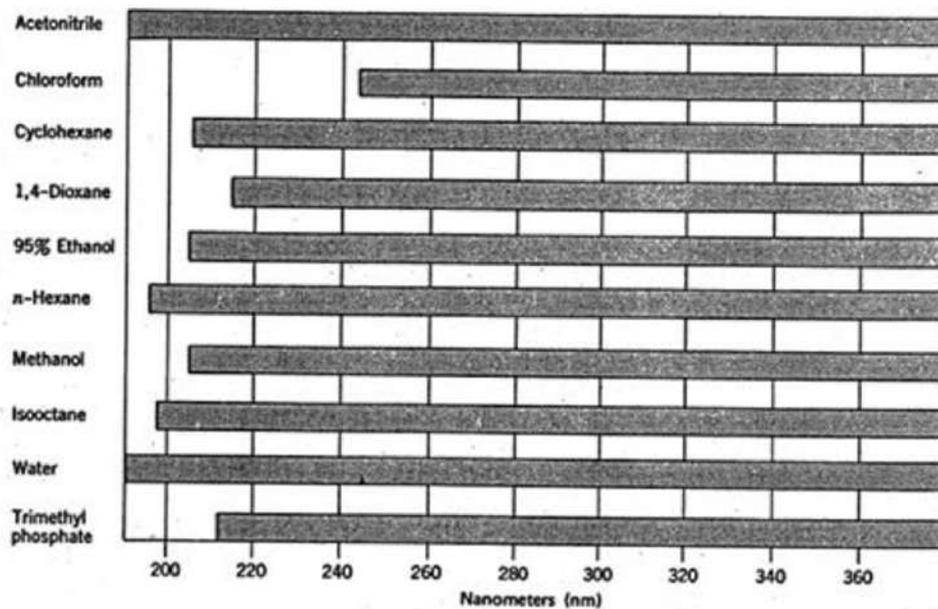


Figure 48 : Domaine d'absorption de quelques solvants.

4.3.3. Les solvant

L'utilisation d'un solvant se fait selon les critères suivants :

- Pouvoir de dissolution
- Transparent dans la zone d'intérêt
- "spectrophotometric grade" : absence d'impuretés, agents stabilisants, ...
- Solvants volatils : boucher la cellule

4.3.4. Les espèces dosables

- **Composés organiques :**
 - Avec doubles liaisons saturées, groupement chromophore → -C=O, -NO, N=N, aromatiques
 - Saturés avec hétéroatomes à électrons de valence → N, O, S, X
- **Composés minéraux :**
 - Ions et complexes des 2 premières séries de transition → $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, Cu^{2+} , Co^{2+}
- **Complexe colorés** → Sulfocyanure de fer

5. ASPECT QUALITATIF

5.1. EFFET DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES TRANSITIONS

5.1.1. Effet de la substitution

La position de la bande d'absorption dépend de la présence ou non de substituant sur le groupement chromophore. Par exemple, plus le groupe éthylénique est substitué, plus la bande d'absorption due à la transition ($\pi \rightarrow \pi^*$) est déplacée vers le visible : effet bathochrome.

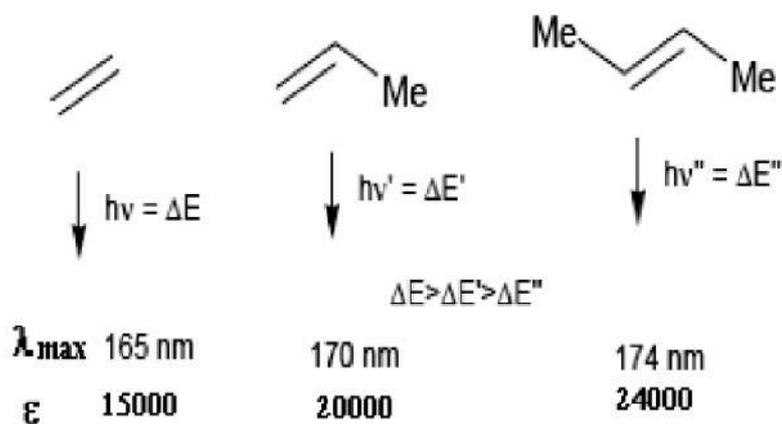


Figure 49 : Effet bathochrome d'un substituant sur le groupe éthylénique.

Les substituant à effet mésomère (auxochromes $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{X}$, $-\text{NH}_2\dots$) portés par un chromophore $\text{C}=\text{C}$ ou $\text{C}=\text{O}$ donnent des effets bathochrome et hyperchrome.

5.1.2. Effet de la conjugaison

➤ Composés éthyléniques

L'enchainement d'insaturations entraîne la délocalisation des électrons π . Cette délocalisation qui traduit la facilité des électrons à se mouvoir le long de la molécule est accompagnée d'un rapprochement des niveaux d'énergies (Figure 50).

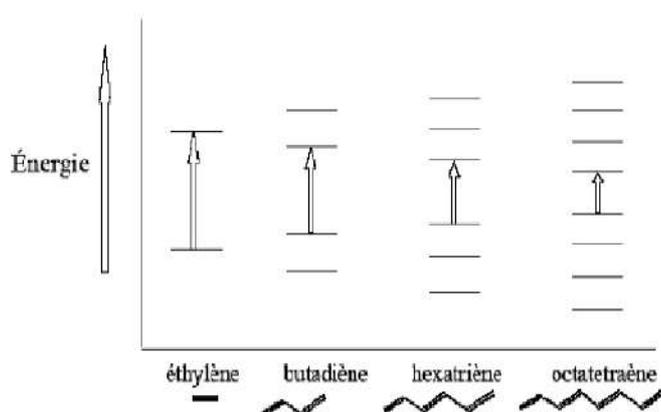


Figure 50 : Évolution relative des niveaux d'énergie en fonction du nombre d'insaturations.

Il on découle un effet bathochrome et un effet hyperchrome sur la bande d'absorption correspondant à la transition $\pi \longrightarrow \pi^*$.

Composé	λ_{\max} (nm)	ϵ
Ethylène $\text{CH}_2 = \text{CH}_2$	165	15000
Buta-1,3-diène $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH} = \text{CH}_2$	217	20900

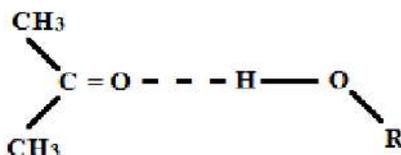
Le même effet est observé sur la transition $n \longrightarrow \pi^*$.

Composé	$\pi \longrightarrow \pi^*$	$n \longrightarrow \pi^*$
Propanone $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$	188 nm	279 nm
Méthyl isobutylcétone $\text{CH}_3\text{-C(CH}_3\text{)=CH-C(CH}_3\text{)=O}$	236 nm	315 nm

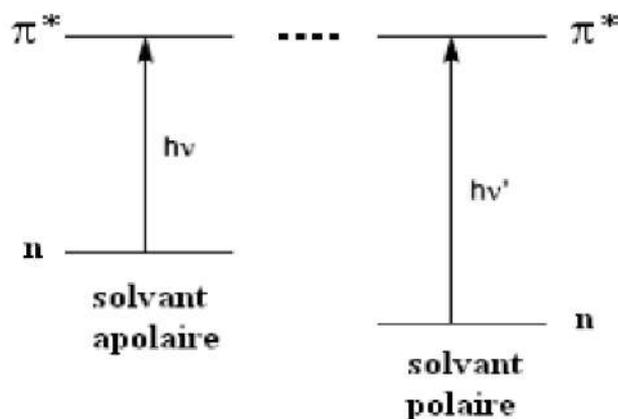
5.1.3. Effet de solvant

La position, l'intensité et la forme des bandes d'absorption des composés en solution dépendent du solvant. Ces changements traduisent les interactions physiques soluté-solvant qui modifient la différence d'énergie entre état fondamental et état excité.

Cas de la transition $n \longrightarrow \pi^*$: exemple du groupement carbonyle des fonctions cétones.



Avant l'absorption, la liaison $\delta^+C = O^{\delta-}$ est stabilisée par un solvant polaire. Il faut plus d'énergie pour provoquer la transition $\Rightarrow \lambda$ diminue par augmentation de la polarité du solvant.



Cas de la transition $\pi \longrightarrow \pi^*$: si l'état excité est plus polaire que l'état fondamentale, c'est la forme excitée qui est stabilisée par un solvant polaire. ΔE diminue $\Rightarrow \lambda$ augmente par augmentation de la polarité du solvant.

En résumé, l'étude du déplacement des bandes d'absorption par effet de la polarité des solvants peut aider à reconnaître la nature électronique des transitions observées.

Par augmentation de la polarité du solvant :

Cas de la transition $n \longrightarrow \pi^*$: effet hypsochrome

Cas de la transition $\pi \longrightarrow \pi^*$: effet bathochrome

Remarque : une structure fine peut être observée dans les solvants non polaires comme dans le cas de la bande vers 256 nm ($\epsilon = 200$) du benzène et des aromatiques polynucléaires.

6. PRINCIPAUX CHROMOPHORES

Le spectre UV ou visible ne permet pas l'identification d'un produit mais celle du groupement chromophore qu'il contient.

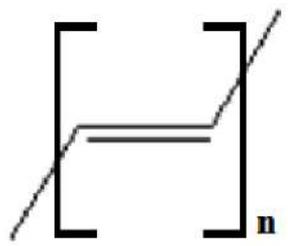
6.1. CHROMOPHORE ETHYLENIQUES

chromophore isolé

Ethylène : transition $\pi \longrightarrow \pi^*$: $\lambda_{\max} = 165$, $\epsilon = 15000$

diènes et polyènes

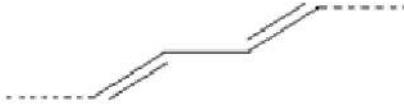
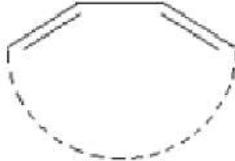
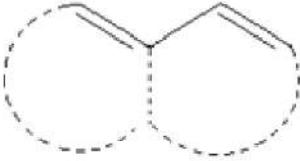
On note un effet bathochromique très remarquable par rapport au chromophore isolé.

	n	$\lambda(\text{nm})$	$\epsilon \cdot 10^{-4} (\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$
 <p>dans l'hexane</p>	1	174	1,6
	2	227	2,4
	4	310	7,7
	6	380	14,7

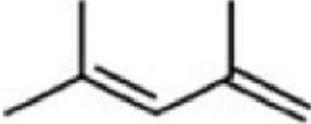
L'étude des spectres d'un grand nombre de molécules a permis d'établir des corrélations entre structures et maxima d'absorption. Les plus connues sont les règles empiriques, dues à Woodward, Fieser et Scott, qui concernent les diènes et composés carbonylés insaturés.

A partir de tableaux qui rassemblent, sous forme d'incrément, les divers facteurs de structure à considérer, on peut prévoir la position de la bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ de ces systèmes conjugués (Tableau 8). La concordance est bonne entre les valeurs calculées et les positions expérimentales (Exemple 1, 2 et 3).

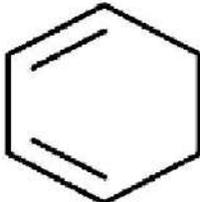
Tableau 8 : Règle de WOODWARD-FIESER : Système d'incrémentation pour calculer le maximum d'absorption (λ_{\max}) pour les diènes conjugués (dans l'éthanol).

		
Préférentiellement s-trans (par exemple acyclique) 217 nm	s-cis (homoannulaire) 253 nm	s-trans (hétéroannulaire) 214 nm
Incréments		
Par double liaison conjuguée supplémentaire		+30 nm
Par position exocyclique d'une double liaison		+5 nm
Par reste carboné (groupement alkyle ou aryle)		+5 nm
Par groupement auxochrome	O- alkyle	+6 nm
	O- acyle	±0
	S- alkyle	+30 nm
	N(alkyle)2	+60 nm
	Cl	+5 nm
	Br	+5 nm

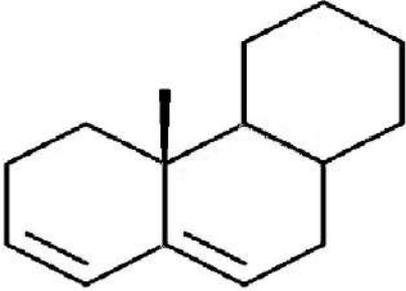
Exemple 1

		
diène parent linéaire		
<u>Valeur de base</u>		<u>217 nm</u>
3 alkyles	3*5	15 nm
Calculée		232 nm
Observée		234 nm

Exemple 2 :

		
diène parent homoannulaire		
<u>Valeur de base</u>		<u>253 nm</u>
2 restes de cycles	2*5	10 nm
Calculée		263 nm
Observée		256 nm

Exemple 3 :

		
diène parent hotéroannulaire		
<u>Valeur de base</u>		<u>214 nm</u>
2 restes de cycles		15 nm
Double liaison exocyclique	3*5	5 nm
Calculée		234 nm
Observée		235 nm

6.2. CHROMOPHORE CARBONYLE

Chromophore isolé

On a deux types de transition : $n \longrightarrow \pi^*$ et $\pi \longrightarrow \pi^*$

Acétone :

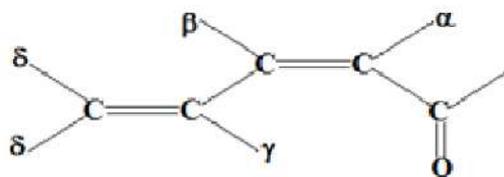
$n \longrightarrow \pi^* : \lambda_{\max} = 280 \text{ nm}, \epsilon = 16$

$\pi \longrightarrow \pi^* : \lambda_{\max} = 186 \text{ nm}, \epsilon = 1000$

Chromophore conjugué

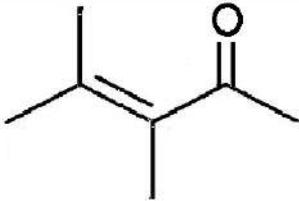
Les règles de calcul établies par Woodward, Fieser et Scott permettent de prévoir la position de la transition $\pi \longrightarrow \pi^*$ de groupement carbonyles α, β -insaturés.

Tableau 9 : Règle de WOODWARD-FIESER : Système d'incrémentation pour calculer le maximum d'absorption (λ_{\max}) pour les composés carbonyles α,β -insaturés (dans l'éthanol).

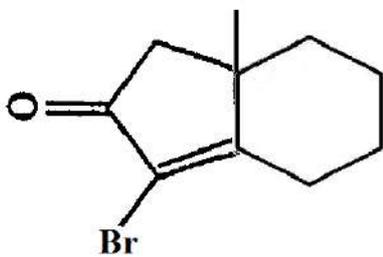


Structure de base				
Valeur de base	215 nm	215 nm	202 nm	207 nm
Incréments à ajouter en (nm)				
Conjugaison supplémentaire				
Hétéroannulaire	30			
Homoannulaire	68			
Double liaison exocyclique	5			
Substituant	α	β	γ	δ
-R	10	12	18	18
-O-R	35	30	17	31
-O-CO-CH₃ ou O-CO-C₆H₅	6	6	6	6
-OH	35	30		50
-Br	25	30		

Exemple 1 :

 <p>Cétone acyclique α, β-insaturée</p>		
Valeur de base	$2 \cdot 12$	215 nm
Alkyle en α		10 nm
2 Alkyles en β		24 nm
Calculée		249 nm
Observée		249 nm

Exemple 2 :

 <p>Cétone acyclique à 5 chaînons α, β-insaturée</p>		
Valeur de base	$2 \cdot 12$	202 nm
Brome en α		25 nm
2 restes de cycle en β		24 nm
Double liaison exocyclique		5 nm
Calculée		256 nm
Observée		251 nm

6.3. COMPOSES BENZENIQUES

L'absorption des composés aromatiques est beaucoup plus complexe que celle des éthyléniques. Plusieurs transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$ sont observées.

Le spectre UV du benzène présente trois bandes d'absorption dues à des transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$.

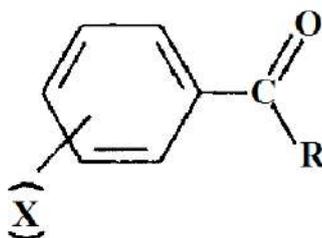
$$\lambda_{\max} = 184 \text{ nm}, \varepsilon = 60000$$

$$\lambda_{\max} = 203 \text{ nm}, \varepsilon = 7900$$

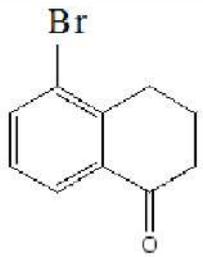
$$\lambda_{\max} = 256 \text{ nm}, \varepsilon = 200$$

L'effet des substituants perturbe les OM.

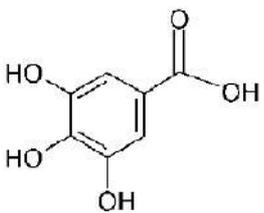
Les règles de Scott permettent de prévoir approximativement λ_{\max} dans l'éthanol de la bande vers 256 nm des composés carbonylés aromatiques substitués de formule générale :



Exemple 1

 <p>Cétone aromatique, R = reste de cycle</p>		
Valeur de base	2*7	246 nm
Restes de cycle en ortho		3 nm
Brome en méta		2 nm
Calculée		251 nm
Observée		253 nm

Exemple 2

 <p>C=O aromatique, R = OH</p>		
Valeur de base	2*7	230 nm
2 OH en méta		14 nm
OH en para		25 nm
Calculée		269 nm
Observée		270 nm

7. APPLICATIONS DE LA SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

Analyse qualitative

Les spectres UV fournissent généralement peu de renseignements sur la structure moléculaire des composés. Néanmoins, on les utilise soit pour une confirmation soit pour une identification grâce aux règles empiriques.

Analyse quantitative

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-Visible est très employée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert.

Comme application, on peut citer :

Dosage du fer dans l'eau ou dans un médicament

Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique

Dosage du benzène dans le cyclohexane

Autres applications

D'autres applications sont connues pour le contrôle qualité ou le suivi de la cinétique d'une réaction, détermination des constantes de dissociation des acides ou des constantes de complexation...

CHAPITRE 3
SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

1. INTRODUCTION

Les radiations infrarouge constituent la partie du spectre électromagnétique (Figure 51) dont les longueurs d'onde sont supérieures à celle du visible et inférieures à celle des ondes radio ultracourtes.

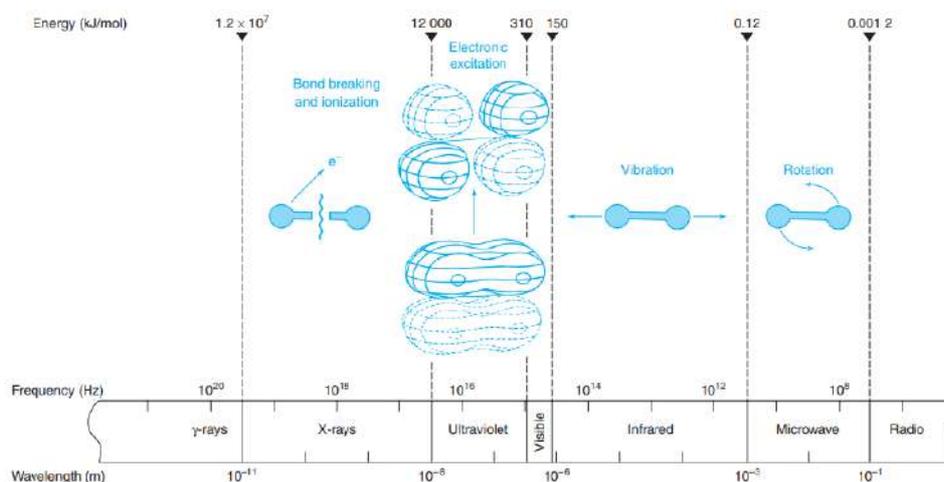


Figure 51 : Représentation schématique du spectre électromagnétique, montrant les processus moléculaires représentatifs qui se produisent dans chaque région.

Dans l'infrarouge les transitions énergétiques se font entre les niveaux d'énergie de rotation des molécules (Figure 52) qui apparaissent dans l'infra rouge lointain (500 à 40 cm^{-1}) et les transitions entre niveau vibrationnels qui apparaissent dans l'infrarouge proche (10000 à 500 cm^{-1}).

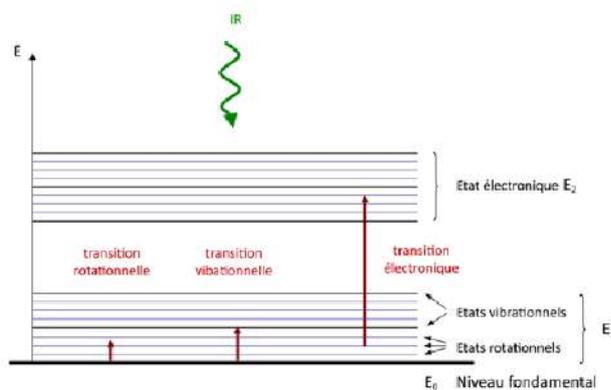


Figure 52 : Représentation schématique des transitions vibrationnelles correspondant à l'absorption infrarouge.

2. PRINCIPE

Si la variation du moment dipolaire d'une molécule et l'oscillation du champ électrique de la radiation électromagnétique ont même fréquence, il y a résonance et sous l'action du champ, la molécule vibrera intensément.

En accentuant l'écartement et le rapprochement des atomes, le champ électrique augmente l'énergie de l'oscillateur.

La conséquence est que seules les vibrations faisant varier le moment dipolaire, sont actives en infrarouge et que l'intensité absorbée est d'autant plus grande que cette variation est grande.

Les absorptions infrarouges les plus fortes sont donc souvent dues à des groupes très polaires tels C=O ou N=O, ... (Figure 53)

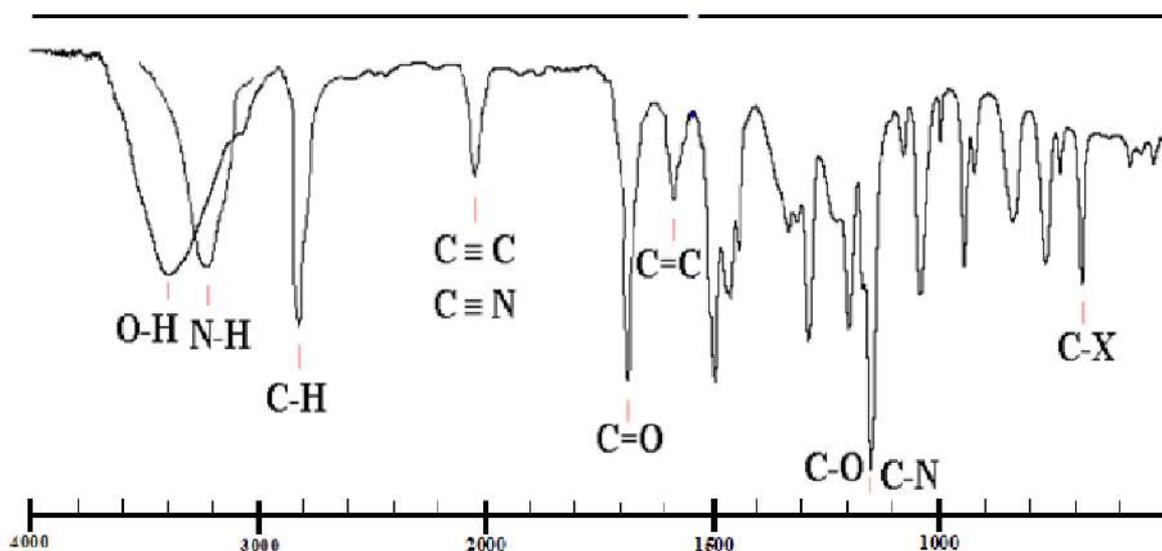


Figure 53 : Absorption infrarouges des groupes.

Les molécules homo-nucléaires, telles que H₂, O₂ (voir figure 54), n'ont pas de moment dipolaire et quelle que soit la distance internucléaire, elles n'interagissent pas avec le champ électrique oscillant.

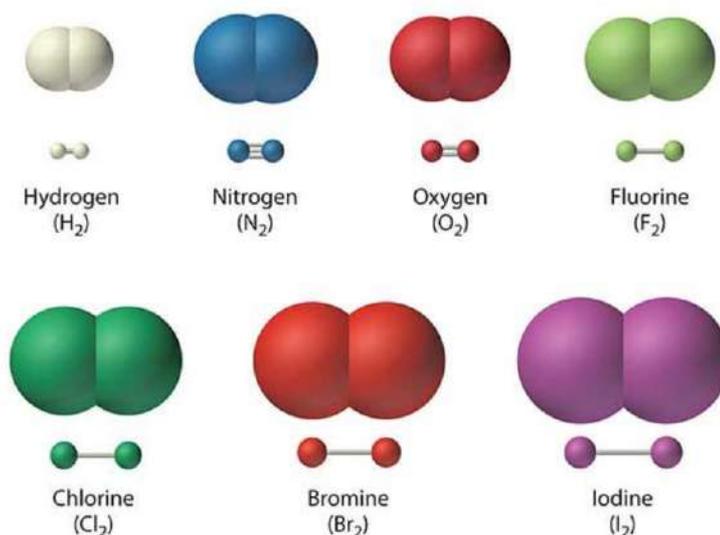


Figure 54 : Liste des éléments diatomiques.

Le spectre IR d'une espèce chimique comme représenté sur la figure 55, et le tracé de la transmittance **T** en ordonnée en fonction du nombre d'onde σ en abscisse exprimé en cm⁻¹, dans la gamme maximale varie entre (4000 - 600 cm⁻¹). Une transmittance de 100 % indique que l'IR n'est pas absorbé.

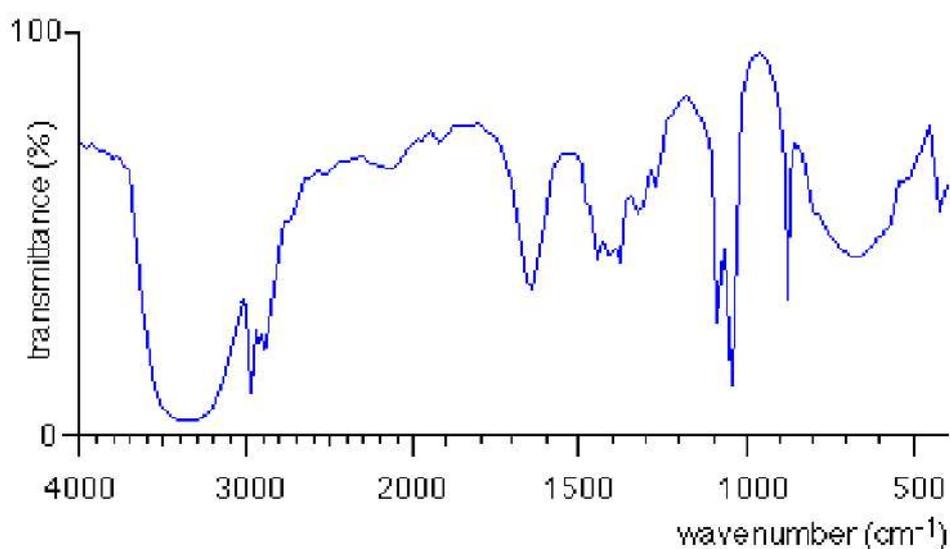


Figure 55 : Spectre Infrarouge de l'éthanol.

Pour chaque transition vibratoire, une multitude de transitions rotationnelles est provoquée par la lumière d'excitation, qui donnera au pic de la transition vibratoire l'apparence d'une bande d'absorption (Figure 56).

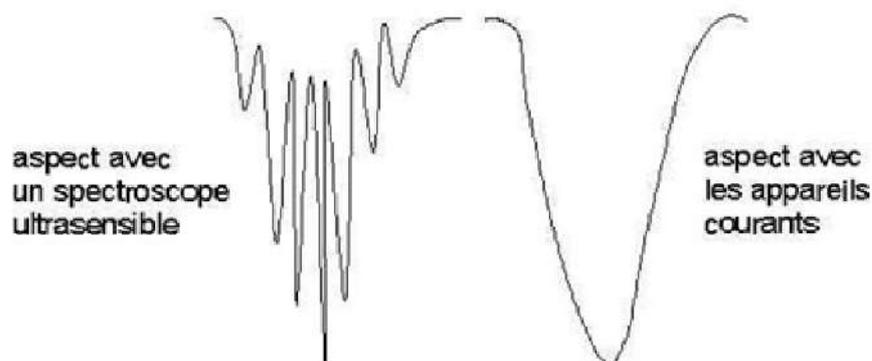


Figure 56 : l'aspect des bandes d'absorption.

3. THEORIE

3.1. MODES DE VIBRATION

Il existe deux types de vibration moléculaire :

3.1.1. Vibration d'allongement (vibration de valence) ou (étirement)

Ce mode concerne la vibration de la molécule le long des liaisons, ce qui a pour effet d'augmenter ou de diminuer la distance entre deux atomes.

On trouve

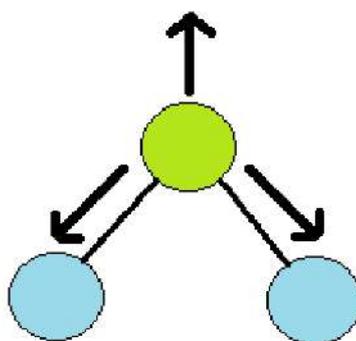


Figure 57 : Schémas de l'allongement symétrique.

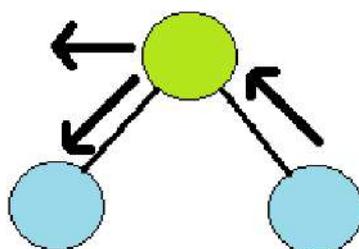


Figure 58 : Schémas de l'allongement asymétrique.

En résumé le stretching n'affecte que les longueurs de liaisons, c'est une caractéristique des différents types de liaison.

3.1.2. Vibration de déformation (flexion-bending)

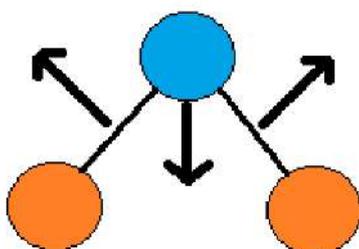


Figure 59 : Schémas générale de déformation.

C'est un mouvement qui modifie la valeur de l'angle formé par trois atomes, où mouvement d'un groupe d'atome par rapport au reste de la molécule.

A) Les déformations dans le plan

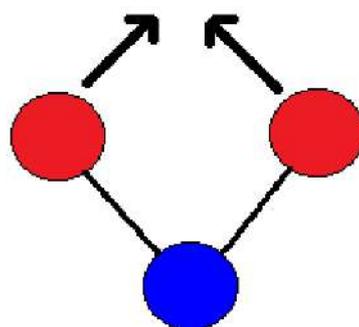


Figure 60 : Schémas cisaillement (scissoring).

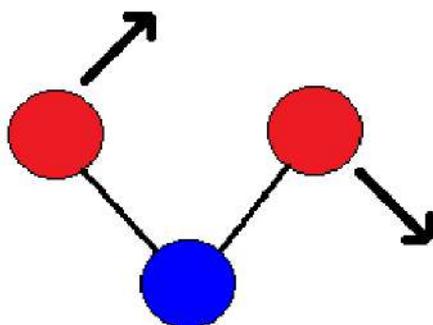


Figure 61 : Schémas rotation plane (roking).

B) Les déformations en dehors du plan

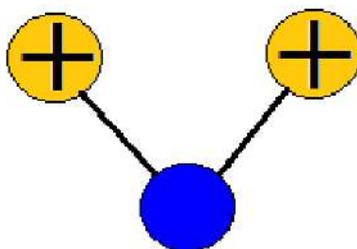


Figure 62 : Schémas agitation (wagging).

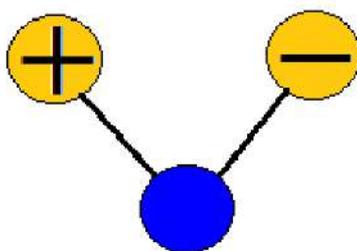


Figure 63 : Schémas torsion (twisting).

3.2. NOMBRE DE MODE DE VIBRATION

Une molécule composée de N atomes est définie par $3N$ coordonnées, appelées degrés de liberté. Le mouvement de translation de la molécule est défini par trois degrés de liberté. Les $3N-3$ degrés de liberté restants sont appelés degrés de liberté internes. Il faut 3 degrés pour définir les mouvements de rotation. Le nombre de mouvement vibrant interne est donc de $3N-6$. Donc absorption $3N-6$ possible.

Tableau 10 : Nombre de mode de vibration.

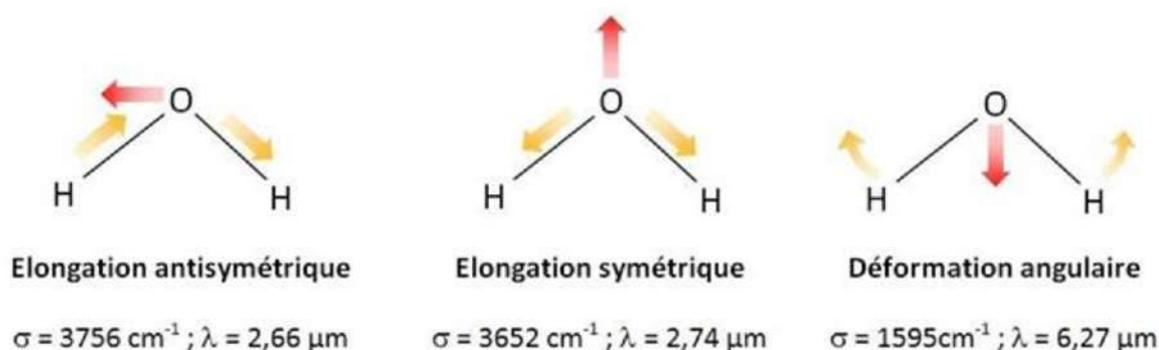
N atomes	Degrés de liberté	Translation	Rotation	Vibration
Molécule linéaire	3N	3	2	3N – 5
Molécule non-linéaire	3N	3	3	3N – 6

En fait ce nombre théorique de mode de vibration ne correspond pas au nombre de bande d'absorption spectrale.

Même certaines bandes théoriquement prévisibles peuvent ne pas apparaître pour diverses raisons :

- La fréquence fondamentale est en dehors de la région $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$.
- La bande fondamentale a une intensité trop faible pour être visible dans le spectre.
- Deux vibrations fondamentales ont des fréquences si proches que leurs bandes se confondent.
- Le fait que certains modes de vibration n'entraînent pas d'absorption IR car ils n'accompagnent pas une modification du mouvement dipolaire de la molécule.

Pour une molécule courbée comme H_2O ($N = 3$) : il y aura 3 modes de vibration normaux ou 3 fréquences de vibration possibles.

**Figure 64** : Schémas des modes de vibration de H_2O .

- **Les vibrations d'élongation symétriques** : les atomes liés s'approchent ou s'éloignent de façon symétrique.
- **Vibrations d'étirement antisymétriques** : de même mais cette fois-ci lorsqu'une liaison est comprimée, l'autre est étirée..
- **Vibrations de déformation d'angle.**

Pour une molécule linéaire comme CO₂ (N=3) : 2 angles suffisent à décrire sa rotation (la rotation autour de l'axe de la molécule n'a pas de signification physique).

Il y a donc $3N - 5$ modes de vibrations normaux soit ici 4 mouvements de vibration indépendants.

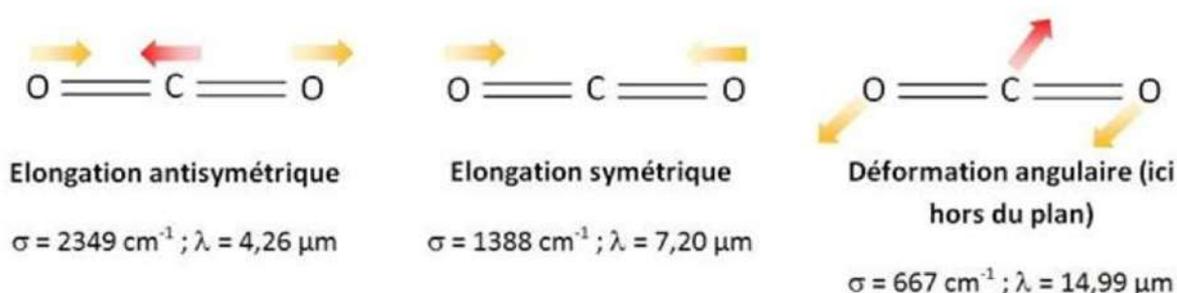


Figure 65 : Schémas des modes de vibration de CO₂.

- **Les vibrations d'élongation symétriques** : l'atome de carbone est entraîné vers l'un ou l'autre atome d'oxygène.
- **Les vibrations d'élongation antisymétriques** : les deux atomes d'oxygène ont des mouvements dans le même sens contrairement au mouvement de l'atome de carbone.
- **Les vibrations de déformation d'angle dans le plan** : les deux atomes d'oxygène ont des mouvements dans le même sens contrairement à l'atome de carbone ; les liaisons ne sont plus alors parallèles.
- **Les vibrations de déformation d'angle hors du plan** : (même description que ci-dessus mais hors du plan).

La vibration naturelle (valence, déformation) d'une molécule modifiée la distribution de charge au niveau de liaison, ce qui a pour effet de créer un champ électrique alternatif. La fréquence de la radiation IR doit être égale à la fréquence du champ électrique alternatif pour qu'il y ait absorption.

Le calcul de la fréquence de l'onde électromagnétique qui induit la vibration d'élongation est donnée par la loi de HOOKE.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (30)$$

ν = fréquence de vibration exprimée en cm^{-1} .

c = célérité de la lumière en cm/s

k = constante de liaison dynes/cm

μ = masse réduite

Par définition :

$$\mu = \frac{m_1 \times m_2}{m_1 + m_2} \quad (31)$$

En générale k est de l'ordre de $5 \cdot 10^5$ dyne/cm pour la liaison simple deux à trois fois plus grande pour les liaisons doubles et triples.

Ce qui permet de déterminer la longueur d'onde de la radiation absorbée.

Longueur d'onde :

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (32)$$

En spectroscopie, plutôt que d'utiliser la longueur d'onde ou la fréquence, on préfère utiliser l'inverse de la longueur d'onde appelé nombre d'onde et exprimé en cm^{-1} .

Nombre d'onde :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (33)$$

L'étude théorique dans le cas de la vibration d'une molécule diatomique est très difficile à réaliser pour les molécules de tailles plus importantes. Comme c'est le cas des molécules organiques et surtout de ceux qui ont un intérêt pharmaceutique.

Si par exemple dans une molécule, deux atomes vibrent avec une intensité importante, et où le reste de la molécule reste quasi immobile, on peut envisager dans une certaine approximation l'attribution d'une fréquence observable dans le spectre aux deux atomes. Or plusieurs groupes de deux atomes vibrent à des fréquences voisines, y a possibilité de couplage, les vibrations sont dites de combinaison. Si une vibration est très forte, elle peut renforcer l'amplitude d'une vibration de nombre d'onde voisin, c'est la résonance de Fermi.

De l'équation de nombre d'onde $\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$, on constate que k et μ sont des variables, ainsi la constante k varie proportionnellement avec le nombre d'onde et la masse réduite est inversement proportionnelle pour une transition de vibration.

1) influence de la masse des deux atomes.

D'une façon générale, plus les masses de l'un au moins des deux atomes concernés par la vibration deviennent grandes plus le nombre d'onde se déplace vers les faibles valeurs.

Les bandes correspondantes aux liaisons qui font intervenir l'hydrogène, se trouvent dans la zone des grands nombres d'onde ($4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$).

3.2.1. Influence de la masse des deux atomes.

D'une façon générale, plus les masses de l'un au moins des deux atomes concernés par la vibration devient grandes plus le nombre d'onde se déplace vers les faibles valeurs.

Les bandes correspondantes aux liaisons qui font intervenir l'hydrogène, se trouve dans la zone des grands nombres d'onde ($4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$).

Tableau 11 : Fréquence de vibration (Atome – Hydrogène).

Liaison	m_2	μ	$\bar{\nu}$
C – H	1	0,9231	3000
C – C	12		1200
C – O	16		1100
C – Cl	35,5		800
C – Br	79,9		550

Les bandes correspondantes aux liaisons qui font intervenir l'hydrogène, se trouve dans la zone des grands nombres d'onde ($4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$).

3.2.2. Influence de la constante de rappel.

Elle est sensiblement proportionnelle au nombre de liaison.

Tableau 12 : Variation de la fréquence de vibration avec le nombre de liaison.

Liaison	dynes/cm	$\bar{\nu}$
C – C	05.10^5	1200 – 1100
C = C	10.10^5	1700 – 1600
C \equiv C	15.10^5	2250 – 2100

Et inversement proportionnelle à la longueur de liaison.

Tableau 13 : Variation de la fréquence de vibration avec la longueur de la liaison.

Liaison	
C = O	1200 – 1100
C = S	1700 – 1600

3.2.3. Influence de la vibration de valence.

Les vibrations asymétriques absorbent l'énergie la plus forte, donc elles présentent le plus grand nombre d'onde, que les vibrations symétriques.

3.2.4. Influence de l'environnement.

Il résulte que tous ce qui tend à diminuer la force des liaisons ou à allonger cette liaison, entraine un déplacement du nombre d'onde vers les faibles valeurs. Tel que les liaisons d'hydrogène et la conjugaison.

L'énergie nécessaire pour obtenir une vibration de déformation est toujours plus faible que celle qui correspond à une vibration de valence. La zone de spectre qui leur est attribuée correspond donc au faible nombre d'onde, cette région à été comparée aux empreintes digitales d'un être humain, elle permet de distinguer les substances chimiques les plus voisines, par exemple deux formes cristallines d'une même substance. Les dia stéréos isomères d'un dérivé aromatique.

4. INSTRUMENTATION ET ECHANTILLONNAGE

4.1. APPAREILLAGE

Deux techniques principales sont utilisées pour l'obtention des spectres infrarouge. La première, et la plus ancienne, est dite à onde continue (Continuous Wave ou CW) et est relativement simple à mettre en œuvre et à comprendre, la seconde est dite à transformée de Fourier (Fourier's Transform ou FT), beaucoup plus précise, rapide, mais dont la théorie sous-jacente est moins accessible.

4.1.1. Le spectromètre à onde continue.

Le spectromètre se présente la plupart du temps sous la forme d'un double faisceau. Le premier est destiné à recevoir l'échantillon à analyser et le second la référence.

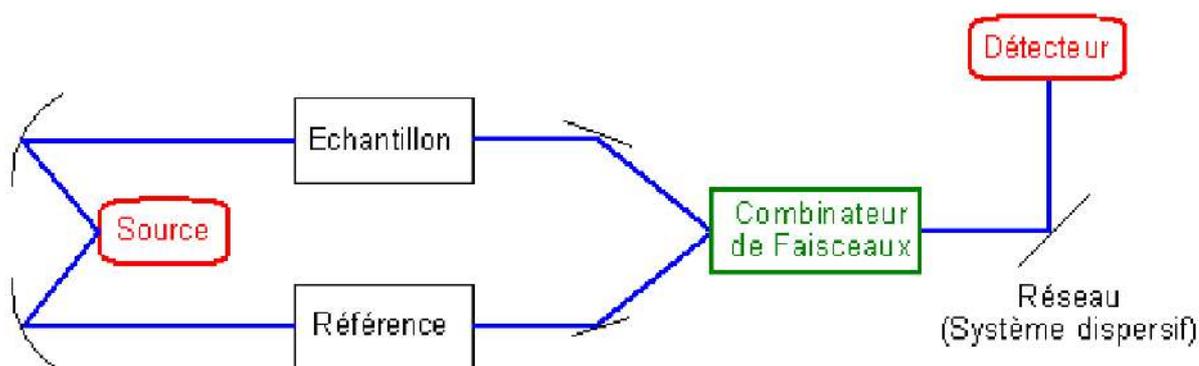


Figure 66 : Schéma de fonctionnement d'un spectromètre à double faisceau.

Les signaux de chaque faisceau sont alors combinés de manière à faire disparaître l'influence de la référence puis un système dispersif monochromateur (prisme ou réseau) sépare les différentes longueurs d'onde présentes dont l'intensité est ensuite mesurée par le détecteur. Certains appareils sont toutefois à simple faisceau, le spectre de référence étant alors enregistré avant l'expérience puis soustrait lors du traitement.

Cette technique, relativement ancienne, nécessite un temps important puisque chaque longueur d'onde doit être traitée séparément, la résolution étant d'autant plus grande que la vitesse de balayage est lente, si l'on ajoute la perte d'énergie associée et la faible sensibilité (le rapport signal sur bruit peut être amélioré en enregistrant plusieurs fois le même spectre et en additionnant les signaux obtenus, mais le temps d'acquisition est multiplié d'autant), on peut aisément comprendre que cette technique soit aujourd'hui de plus en plus abandonnée au bénéfice des appareils à transformée de Fourier.

4.1.2. Le spectromètre à transformée de Fourier.

Le spectromètre à transformée de Fourier est basé sur un interféromètre de Michelson. Lors de l'acquisition du spectre, un miroir mobile coulisse régulièrement conduisant à une figure d'interférence qui est enregistrée par le détecteur en fonction de la différence de marche p .

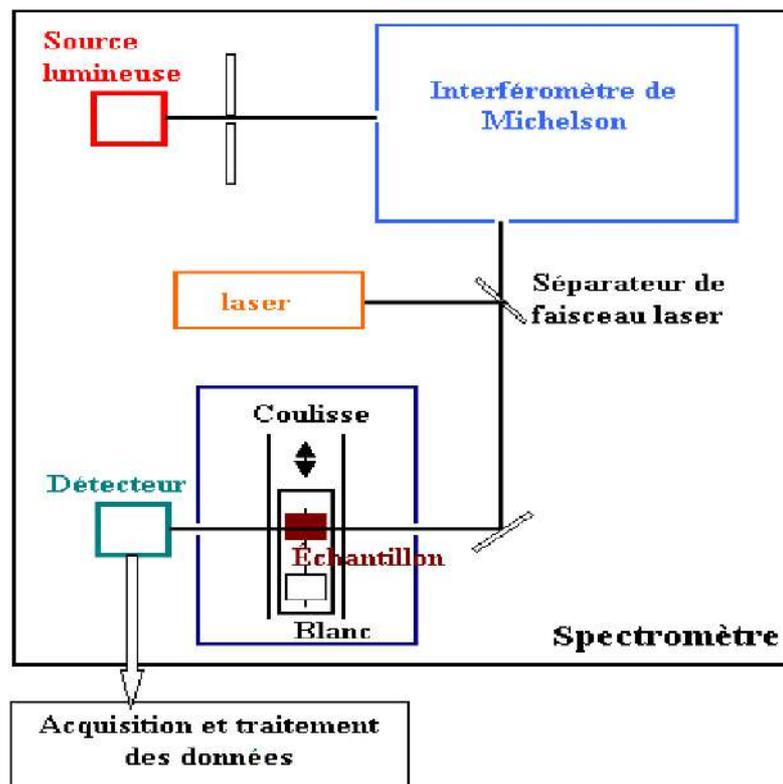


Figure 67 : Schéma de principe d'un spectromètre à transformée de Fourier.

Chaque longueur d'onde interfère séparément (cohérence temporelle) et conduit à une intensité résultante :

Le signal mesuré par le détecteur correspond à la somme des intensités relatives à chaque longueur d'onde.

L'avantage de cette technique est que l'ensemble des longueurs d'onde est étudié simultanément, ce qui conduit à un gain de temps important et permet l'acquisition

de plusieurs spectres augmentant le rapport signal/bruit de celui-ci. La résolution est aussi meilleure : il est possible de montrer que la résolution est inversement proportionnelle à la différence de chemin optique maximale entre les deux bras de l'interféromètre. Ainsi, une résolution de $0,1 \text{ cm}^{-1}$ ne nécessite qu'un déplacement du miroir que de 5 cm.

4.1.3. Les éléments d'un spectromètre.

Les éléments principaux d'un spectromètre IR sont une source de rayonnement infrarouge, un système de séparation des rayonnements ou système dispersif (monochromateur), un détecteur du signal et un enregistreur.

A) La source : Dans la plupart des cas, on travaille dans la région de l'infrarouge moyen (4000 et 400 cm^{-1}). On utilise alors une source Global à base de carbure de silicium.

B) Le système de séparation des rayonnements (monochromateur) :

L'échantillon est éclairé avec un rayonnement IR poly chromatique.

Pour les spectromètres à balayage, on utilise comme système dispersif les prismes ou les réseaux de diffraction.

Pour les spectromètres à transformée de Fourier, on utilise un interféromètre (Interféromètre de Michelson). L'interféromètre possède trois principaux composants : une séparatrice, un miroir fixe et un miroir mobile.

C) Le détecteur : La détection du signal a lieu par un composant assurant la conversion de la radiation incidente en un signal électrique. Le détecteur utilisé est de type thermique. Il détecte les variations de température et les transforme en variation d'intensité.

Remarque : La spectroscopie IR à balayage, relativement ancienne, nécessite un temps important. Les avantages de la FTIR sont un gain de temps important et une grande précision sur la fréquence.

4.2. ECHANTILLONNAGE

Il est possible de faire des spectres IR de composés solides, liquides ou gazeux.

Suivant l'état physique de l'échantillon, les techniques diffèrent.

Pour les cellules, il faut choisir un matériau n'absorbant pas en IR : souvent NaCl ou KBr.

Si le composé est liquide, on en dépose une goutte entre les fenêtres de la cellule pour constituer un film de liquide.

S'il est solide, il pourra soit être mis en solution dans un solvant, soit être mélangé à du KBr anhydre, la poudre obtenue étant alors soumise à une forte pression à l'aide d'une presse pour obtenir une pastille. Enfin, il peut être placé en suspension dans une paraffine liquide (du **Nujol** par exemple).

Les composés gazeux sont étudiés dans des cellules à gaz de grands volumes.

5. INTERPRÉTATION D'UN SPECTRE D'ABSORPTION IR

L'analyse de l'attribution des bandes apporte deux niveaux de renseignement :

- La nature des fonctions présentes dans la molécule
- La nature structurale

Mais l'identification complète de la molécule est très rare. Les bandes seront analysées selon leurs :

- Position (cm^{-1})
- Intensité (faible, moyenne, forte)
- Forme (large ou étroite)

Donc la spectrométrie IR fournit une solution rapide à l'identification d'un composé organique. Il suffit de vérifier l'identité de chacune des bandes du spectre de référence et du spectre du produit étudié, tracés dans les mêmes conditions d'échantillonnage (gaz, liquides ou solides) et avec des appareils de mêmes performances. Le nombre d'onde doit être considéré comme déterminé avec une précision de 5 à 10 cm^{-1} selon les zones du spectre.

5.1. FREQUENCES CARACTERISTIQUES DES GROUPEMENTS ORGANIQUES

Les domaines attribués à diverse fréquences d'allongement et de déformation ainsi que les caractéristiques de quelques groupes d'atomes sont indiqués dans le tableau 14 des vibrations en Infra Rouge... bien que ces domaines soient relativement étroits, il convient de ne pas oublier que la fréquence exacte à laquelle absorbe un groupe donné peut varier en fonction de l'environnement existant à l'intérieur de la molécule et l'état physique de la substance.

Tableau 14 : Fréquences d'allongement et de déformation de quelques groupes d'atomes.

Groupement	Liaison	Nombre d'onde en cm^{-1}	Vibration	Bande
Alcools	O-H	3640-3620	élongation	intense et large
Acides	O-H	3550-3500	élongation	intense et très large
-CH ₃	C-H	2960-2890	élongation	forte
Aldéhydes	C=O	1740-1720	élongation	Doublet ; forte
Cétones	C=O	1725-1705	élongation	forte
Acides	C=O	1800-1740	élongation	forte
Esters	C=O	1750-1730	élongation	forte
C=C	C=C	1645	élongation	moyenne
-CH ₂ -	C-H	1470	déformation	moyenne
-CH	C-H	1340	déformation	faible
Esters	C-O	1300-1050	élongation	Doublet ; moyenne
Acides	C-O	1190-1075	élongation	forte
Alcools	C-O	1150-1050	élongation	variable

5.2. DEMARCHE D'ANALYSE D'UN SPECTRE IR

Pour analyser le spectre d'une substance inconnue, on identifie en premier l'existence ou l'inexistence des groupements fonctionnels majeurs.

Les pics C=O ; O-H ; N-H ; C-O ; C=C ; C=N et NO₂ sont les plus remarquables et donnent immédiatement, s'ils sont présents, une information structurale.

Ne pas faire une analyse détaillée des adsorptions C-H vers 3000 cm⁻¹ (presque tous les composés en ont !).

Un groupe carbonyle est-il présent ?

Les groupes C=O donnent une adsorption intense dans la région 1820-1600 cm⁻¹.

La bande est souvent la plus intense du spectre. Sa largeur est moyenne. Vous ne pouvez pas la rater.

Si un groupe C=O est présent :

1. Acide (COOH) : si OH est aussi présent. La bande OH est très large 3400-2400 cm⁻¹ (elle recouvre les C-H).

2. Amide (O=C-NHR) monosubstituée sur l'azote ou (O=C-NH₂) non substituée sur l'azote : vérifiez qu'il y a une ou deux bandes N-H dans la zone 3500 cm⁻¹ (intensité moyenne à forte).

3. Esters (O=C-O-R) : vérifiez la présence de C-O (absorption intense vers 1300-1000 cm⁻¹).

4. Anhydrides (O=C-O-C=O) : vérifiez la présence de deux absorption C=O vers 1810-1760 cm⁻¹.

5. Aldéhydes (O=C-H) : vérifiez la présence C-H aldéhyde : deux bandes d'intensité moyenne vers 2850 et 2750 cm⁻¹.

6. Cétones (O=C-R) : si les 5 choix précédents sont éliminés.

Si un groupe C=O est absent :

1. Alcools (-C-OH) et phénols : recherchez la bande O-H large dans la zone 3600-300 cm⁻¹ ; confirmé par la présence d'une bande C-O entre 1300-1000 cm⁻¹.

2. Amines primaires (RNH₂) et secondaires (RNHR') : vérifiez l'absorption N-H (intensité moyenne) vers 3500 cm⁻¹.

3. Ethers (C-O-C) : recherchez la présence de la bande C-O (et l'absence O-H) vers 1300-1000 cm⁻¹.

4. Double liaison et (ou) noyau aromatique

Alcène : absorption assez faible vers 1650 cm^{-1} . On confirme l'existence C=C en consultant la région des =C–H au-delà de 3000 cm^{-1} .

Aromatique : absorption d'intensité moyenne à forte dans la région $1650\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$. On confirme l'existence C=C en consultant la région des (=C–H) au delà de 3000 cm^{-1} .

5. Triples liaison

Nitriles (C:N) : absorption d'intensité moyenne, pic très fin vers 2250 cm^{-1} .

Alcynes (–C:C–) : absorption fine d'intensité faible vers 2150 cm^{-1} . Pour alcynes vrais, recherchez aussi si C–H est présent vers 3300 cm^{-1} .

6. Fonction "NITRO" : NO_2 présente 2 bandes fortes vers $1600\text{-}1500$ et $1390\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$.

7. Hydrocarbure saturés

Si aucune des informations ci-dessus n'a été observée.

Si les absorptions principales sont situées dans la région des C–H en dessous de 3000 cm^{-1} .

Si le spectre est très simple, seulement des absorptions vers $1450\text{-}1375$ et peut-être 720 cm^{-1} .

REFERENCES

-
1. Andersson, J. T. (2014). Detectors. *Practical Gas Chromatography*, 205–248. doi:10.1007/978-3-642-54640-2_6
 2. Beć, K. B., Grabska, J., & Huck, C. W. (2020). Physical principles of infrared spectroscopy. *Comprehensive Analytical Chemistry*. doi: 10.1016/bs.coac.2020.08.001
 3. Blinder, S. M. (2004). Molecular Spectroscopy. *Introduction to Quantum Mechanics*, 217–241. doi:10.1016/b978-0-12-106051-0.50020-x
 4. Dagdigian, P. J. (2014). Fundamentals of optical spectroscopy. *Laser Spectroscopy for Sensing*, 3–33. doi:10.1533/9780857098733.1.3
 5. De Coning, P., et Swinley, J. (2019). GC detectors. *A Practical Guide to Gas Analysis by Gas Chromatography*, 247–290. doi:10.1016/b978-0-12-818888-0.00008-5
 6. Dutta, A. (2017). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, 73–93. doi:10.1016/b978-0-323-46140-5.00004-2
 7. G. Mahuzier, M. Hamon, D. Ferrier, P. Prognon. (1999) *Chimie analytique Tome 2 Méthodes de séparation* éditeur. Masson.
 8. Gomis Yagües, Vicente (2008) *Chromatographie : principes généraux*. collections Manuels.
 9. Haddadi G. H. *Méthodes Séparatives*. Polycopié de cours.
 10. Harris, D. C. (2011). *Quantitative chemical analysis*. New York, NY: W. H. Freeman and Co.
 11. House, J. E. (2018). Molecular Rotation and Spectroscopy. *Fundamentals of Quantum Mechanics*, 137–158. doi:10.1016/b978-0-12-809242-2.00007-3
 12. House, J. E. (2018). Molecular Spectroscopy. *Fundamentals of Quantum Mechanics*, 271–296. doi:10.1016/b978-0-12-809242-2.00011-5
 13. Kafle, B. P. (2020). Infrared (IR) spectroscopy. *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, 199–243. doi:10.1016/b978-0-12-814866-2.00007-5
 14. Kenouche S. (2016) *Spectrométrie optique : théorie et expérience*. Polycopié de cours
 15. Klee, M. S. (2012). Detectors. *Gas Chromatography*, 307–347. doi:10.1016/b978-0-12-385540-4.00012-2

-
16. Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., & Segura-Carretero, A. (2018). Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Modern Techniques for Food Authentication*, 459–526. doi:10.1016/b978-0-12-814264-6.00013-x
 17. M.Hamon, F.Pellerin, M.Guernet, G.Mahuzier. (1998) *Chimie analytique Tome 3 Méthodes spectrales et analyse organique*. Masson.
 18. Ni, L., Geng, X., Li, S., Ning, H., Gao, Y., & Guan, Y. (2019). A flame photometric detector with a silicon photodiode assembly for sulfur detection. *Talanta*, 120283. doi:10.1016/j.talanta.2019.120283
 19. Ouellette, R. J., & Rawn, J. D. (2018). UV–Visible and Infrared Spectroscopy. *Organic Chemistry*, 409–425. doi:10.1016/b978-0-12-812838-1.50014-1
 20. Poole, C. F. (2016). Detectors. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.11719-6
 21. Salvato, F., Gallo de Carvalho, M. C. da C., & Lima Leite, A. de. (2012). Strategies for Protein Separation. *Integrative Proteomics*. doi:10.5772/29363
 22. Smith, B. C. (2002). Fundamentals of Molecular Absorption Spectroscopy. *Quantitative Spectroscopy: Theory and Practice*, 1–41. doi:10.1016/b978-012650358-6/50002-6
 23. Stephanos, J. J., & Addison, A. W. (2017). Vibrational Rotational Spectroscopy. *Electrons, Atoms, and Molecules in Inorganic Chemistry*, 505–584. doi:10.1016/b978-0-12-811048-5.00009-2
 24. Sun, J., Guan, F., Cui, D., Chen, X., Zhang, L., & Chen, J. (2013). An improved photoionization detector with a micro gas chromatography column for portable rapid gas chromatography system. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 188, 513–518. doi:10.1016/j.snb.2013.07.066
 25. Touchstone, J. C. (1993). History of Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 16(8), 1647–1665. doi:10.1080/10826079308021679