

2009

Principes généraux de la chromatographie

Salle de TP de Génie Analytique

Présentation des principes généraux de la chromatographie

TYPE DE DOCUMENT : DT	N° 2-a	PAGE : 20	IND.REV/DATE : 1 – 22/08/2009
ETABLI PAR : Véronique JACOB	VERIFIE PAR : V.JACOB	APPROUVE PAR : V. JACOB	
DESTINATAIRES : Utilisateurs du laboratoire de Génie Analytique n° 001			



TABLE DES MATIERES

1	<i>Généralités</i>	1
1.1	Définitions	1
1.2	Classification	1
1.2.1	Classification selon la nature physique des phases :.....	2
1.2.2	Classification selon les phénomènes chromatographiques	2
1.2.3	Classification d'après le procédé utilisé	3
2	<i>Etude théorique de la chromatographie</i>	3
2.1	Principe de la séparation chromatographique	3
2.2	Etude théorique de la chromatographie	4
2.2.1	Théorie des plateaux.....	4
2.2.2	Théorie cinétique.....	7
3	<i>Les grandeurs fondamentales de la chromatographie</i>	11
3.1	Le chromatogramme	11
3.2	Caractéristique des pics chromatographiques	12
3.3	Facteur de rétention ou facteur de capacité k'	15
3.3.1	Définition.....	15
3.3.2	Détermination expérimentale du facteur de rétention k ou k'	15
3.4	Facteur de sélectivité α entre deux solutés	16
3.5	Résolution d'une colonne	17
3.6	Efficacité d'une colonne	18
4	<i>Optimisation d'une analyse chromatographique</i>	19
4.1	Modification de la hauteur équivalente à un plateau théorique	19
4.2	Modification du facteur de capacité	19
4.3	Modification du facteur de sélectivité	20

1 GENERALITES

1.1 DEFINITIONS

La chromatographie est une méthode de séparation non destructrice d'un mélange liquide ou gazeux en ses différents constituants. C'est également une méthode analytique qui a pour but d'identifier et de quantifier les composés d'un mélange homogène.

Le principe repose sur les équilibres de concentration des composés présents entre deux phases non miscibles en contact :

- **La phase stationnaire** qui est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support
- **La phase mobile** se déplace au contact de la phase stationnaire.

L'entraînement à des vitesses différentes des composés présents dans la colonne par la phase mobile conduit à leur séparation.

Les composés traversent la colonne avec des temps qui dépendent de leurs propriétés intrinsèques (taille, structure...) ou de leur affinité avec la phase stationnaire (polarité...). A leur sortie de la colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

1.2 CLASSIFICATION

Sous le nom de chromatographie, on regroupe un très grand nombre de techniques différentes qui, comme le montre le tableau, peuvent se classer en 3 catégories selon :

- La nature physique des phases (mobile ou stationnaire) (colonnes 1 et 2)
- Le principe du phénomène mis en jeu (type d'équilibre) (colonne 4)
- Le procédé opératoire (immobilisation de la phase stationnaire (colonne 3))

Classification générale	Méthode spécifique	Phase stationnaire	Type d'équilibre
Chromatographie en phase liquide (CLP) (phase mobile liquide)	Liquide-Liquide (CLL) ou partage	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre liquides non miscibles
	Liquide-phase greffée		Partage entre liquide et surface greffée
	Liquide-solide (CLS) ou adsorption	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Adsorption
	Echange d'ions	Solide	Echange d'ions
	Liquide-gel (CLG) ou perméation	Résine échangeuse d'ions	Partage/tamisage
Chromatographie en phase gazeuse (CPG) (phase mobile :gaz)	Gaz-liquide (CGL)	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre gaz et liquide
	Gaz-phase greffée		Partage entre gaz et surface greffée
	Gaz-solide	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Adsorption
Chromatographie en fluide supercritique (CFS) (phase mobile : fluide supercritique)		Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre fluide supercritique et surface greffée

1.2.1 CLASSIFICATION SELON LA NATURE PHYSIQUE DES PHASES :

Dans ce classement :

- la phase mobile est un fluide qui peut être soit liquide soit gazeux.
- la phase stationnaire peut-être soit un solide finement pulvérisé, soit un liquide immobilisé sur une phase fixe.

La combinaison de ces différentes possibilités permet donc de distinguer quatre types de chromatographie :

- la chromatographie liquide-liquide
- la chromatographie liquide-solide
- la chromatographie gaz-liquide
- la chromatographie gaz-solide

On répertorie 5 types de chromatographie en phase liquide et trois en phase gazeuse

1.2.2 CLASSIFICATION SELON LES PHENOMENES CHROMATOGRAPHIQUES

Les phénomènes qui donnent lieu à la séparation dépendent de la nature des phases stationnaires et on considère :

- *la chromatographie d'adsorption* : la phase stationnaire est un solide finement divisé sur lequel les molécules adhèrent par un double effet de physisorption et de chimisorption. Le paramètre physico-chimique concerné est le coefficient d'adsorption.
- *la chromatographie de partage* où la phase stationnaire est un liquide non miscible à la phase mobile. L'immobilisation du liquide dans la colonne se fait soit par imprégnation d'un matériau poreux inerte (mais cela pose des problèmes de lessivage) soit par greffage. Actuellement, les phases stationnaires sont généralement des polymères liquides qui sont greffés sur un matériau inerte poreux qui n'a qu'un rôle de support. La séparation repose sur le coefficient de partage K du soluté entre les deux phases (phénomène comparable à l'extraction liquide-liquide avec un solvant dans une ampoule à décanter).
- *la chromatographie par échange d'ions* ou la phase stationnaire est formée de macromolécules (résines) portant des groupements fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de contre ions avec des ions de même signe de l'échantillon. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique.
- *la chromatographie d'exclusion diffusion ou la chromatographie par perméation de gel* dans laquelle la phase stationnaire est constituée d'un matériau comportant des pores dont les dimensions sont choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. Ces matériaux sont souvent des gels qui se comportent comme de véritables tamis vis-à-vis

des molécules ayant des poids et des structures différents. Le coefficient de distribution prend le nom de coefficient de diffusion.

1.2.3 CLASSIFICATION D'APRES LE PROCEDE UTILISE

Selon l'immobilisation de la phase stationnaire on distingue :

- *la chromatographie sur colonne* : la phase stationnaire est contenue dans une colonne cylindrique en verre ou en métal comme souvent en CPG.
- *la chromatographie sur papier* : une surface de cellulose considérée comme support maintient par imbibition une phase stationnaire liquide.
- *la chromatographie sur couche mince (CCM)* : la phase stationnaire est dans ce cas retenue sur une surface plane (verre, matière plastique ou feuille d'aluminium) qui est recouverte d'un mince couche de 0,2 à 0,3 mm d'épaisseur de gel de silice, de cellulose, d'alumine ou même de grains de résines échangeuses d'ions.

2 Etude théorique de la chromatographie

2.1 PRINCIPE DE LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Le principe de la séparation des composés sur une colonne varie selon le type de méthode chromatographique choisie, mais elles ont toutes des points communs :

- les composés se répartissent dans deux phases non ou très peu miscibles jusqu'à l'établissement d'un équilibre. Cette partition dépend des propriétés de chaque composé vis-à-vis des phases considérées.
- le renouvellement continu de la phase mobile, remet en cause l'équilibre et entraîne, par une succession d'autres équilibres, avec la migration des substances tout au long de la phase stationnaire.
- la séparation des différents composés tient au fait que chaque constituant migre avec une vitesse qui lui est propre.

La figure ci-dessous montre comment deux espèces A et B se séparent dans une colonne par le processus d'élution. L'élution est l'entraînement d'un soluté à travers la colonne par l'addition en continue de solvant propre.

L'avancé graduelle du solvant entraîne les molécules de soluté vers le bas de la colonne en une série continue de transferts entre les deux phases.

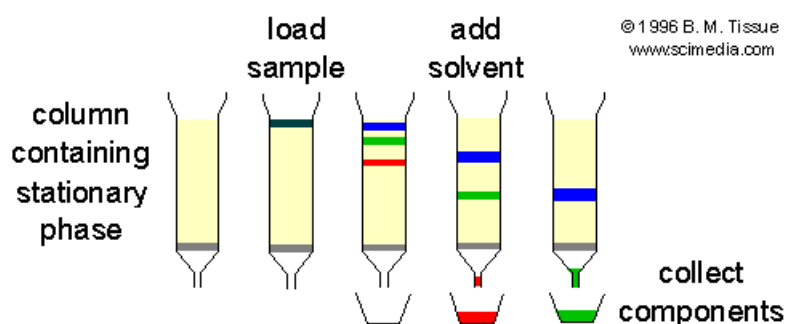


FIGURE 1 : PRINCIPE D'UNE ELUTION

On obtient une série de pics symétriques que l'on appelle chromatogramme qui est utilisé en analyse qualitative (temps de rétention) et en analyse quantitative (aire des pics). Les positions des pics sur l'axe des temps permettent d'identifier les constituants de l'échantillon tandis que les aires sous les pics mesurent leur quantité.

2.2 ETUDE THEORIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE

L'étude théorique de la chromatographie a tout d'abord été effectuée en assimilant la colonne chromatographique à une colonne à distiller où la progression des substances est considérée comme une succession d'équilibres se réalisant entièrement dans des étages ou plateaux fictifs appelés plateaux théoriques.

Cette notion de plateaux théoriques appliquée à la colonne chromatographique permet d'expliquer par des lois les phénomènes d'éluion et de séparation. Mais cette théorie présente des imperfections car elle assimile la chromatographie à une suite discontinue d'opérations et elle suppose que chaque équilibre se réalise entièrement sans tenir compte des phénomènes de diffusion et de l'écoulement continu de la phase mobile qui en réalité diminuent les échanges.

Pour compléter cette théorie, d'autres théories ont été élaborées comme la théorie cinétique dans laquelle l'aspect dynamique de la phase mobile est pris en considération ainsi que l'influence de facteurs tels que la température et la pression.

2.2.1 THEORIE DES PLATEAUX

Dans cette théorie, une colonne chromatographique est considérée comme constituée par une juxtaposition de volumes identiques contenant tous les mêmes proportions de phase stationnaire et de phase mobile. Par analogie avec la distillation et avec l'extraction chaque volume ainsi défini est appelé plateau théorique car dans chacun, les équilibres de répartition des substances entre phase mobile et phase stationnaire sont supposés se réaliser entièrement de telle sorte que l'équation exprimant l'équilibre général soit satisfaite :

$$C_s = K C_m$$

C_s : concentration de la substance dans la phase stationnaire
 C_m : concentration de la substance dans la phase mobile.

Cette relation est vérifiée uniquement lorsque ces concentrations ne sont pas très importantes (ce qui sera toujours admis).

K est le coefficient de partition d'une substance entre la phase stationnaire et la phase mobile. Pour la chromatographie :

- gaz liquide ce coefficient est appelé coefficient de partage
- d'adsorption ce coefficient est appelé coefficient de d'adsorption
- sur gel ce coefficient est appelé coefficient de diffusion...

La représentation graphique de l'équation $C_s = f(C_m)$ à une température donnée est une droite appelée isotherme de distribution.

Les valeurs de K sont très variables. Elles sont grandes (ex : 1000) lorsque la phase mobile est un gaz et petite lorsque les deux phases sont à l'état condensé.

La distribution d'un soluté entre deux phases peut s'exprimer également à partir du facteur de capacité k' qui se définit comme :

$$k' = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad K : \text{coefficient de distribution}$$

avec V_S : volume de la phase stationnaire qui est calculé par différence entre le volume total de la colonne et le volume de la phase mobile (V_M).

Ce facteur indique que lorsque l'on introduit un composé dans une colonne, sa masse totale m_T se répartit en deux quantités m_M dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire. Ces quantités restent constantes au cours de sa migration dans la colonne et ne dépendent que de m_T et de K .

k' n'est pas une constante mais varie avec les conditions opératoires (température, composition de la phase mobile...). C'est le paramètre le plus important en chromatographie pour définir le comportement d'une colonne. On évite d'avoir des valeurs de k' trop élevées pour ne pas allonger le temps d'analyse.

On définit également un coefficient de distribution qui s'exprime par :

$$D = \frac{C_m}{C_s} = \frac{1}{K}$$

2.2.1.1 HAUTEUR EQUIVALENTE D'UN PLATEAU THEORIQUE HEPT

Lorsque l'on assimile une colonne de longueur L à une succession de N plateaux théoriques identiques, il est possible d'attribuer à tout plateau une dimension qui est une fraction de cette longueur. Cette longueur H est appelée Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique ou HEPT et s'exprime généralement en mm et se déduit de la relation :

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

Il est également classique de rendre compte de l'efficacité d'une colonne en indiquant le nombre de plateaux N .

H et N caractérisent le fonctionnement de la colonne car ils dépendent de la nature des phases, de la géométrie de la colonne et de tous les facteurs influençant les équilibres.

Pour des colonnes de même longueur, celles où les équilibres se réalisent le plus rapidement ont le nombre de plateaux théoriques le plus élevé ou sont celles dont le HEPT sont les plus basses.

2.2.1.2 EQUILIBRE SUR LA COLONNE :

Pour illustrer cette théorie par un exemple, considérons le cas d'un composé qui après avoir été déposé à l'entrée d'une colonne, est soumis à une percolation par un éluant de composition fixe. Supposons, pour simplifier les calculs de ces répartitions isochrones, que l'on parte de 64 mg d'un composé pur dont le coefficient de distribution K est égal à 1. On suppose par ailleurs que la colonne fait cinq plateaux théoriques. Un plateau théorique est représenté ici par une case du tableau suivant. La colonne est vue aux instants qui correspondent aux cinq états d'équilibres successifs. A l'instant 1, le soluté se trouve concentré dans le plateau 1 : 32 mg se fixe dans la phase stationnaire et 32 mg restent dans la phase mobile. L'instant 2 correspond à l'équilibre suivant qui apparaît après avoir ajouté un volume de phase mobile égal à celui qui contient un plateau. Les deux premiers plateaux sont maintenant concernés. Dans le premier plateau 16 mg du soluté sont cédés à la phase mobile pure (K=1). Par contre dans le plateau 2, 16 mg se fixent sur la phase stationnaire. De proche en proche on arrive au profil de répartition du soluté à l'instant 5 tel qu'il est indiqué dans la 5^{ème} colonne du tableau. L'évolution dans la colonne est résumée sous forme d'un tableau comportant N colonnes (plateaux) et n lignes (équilibres successifs).

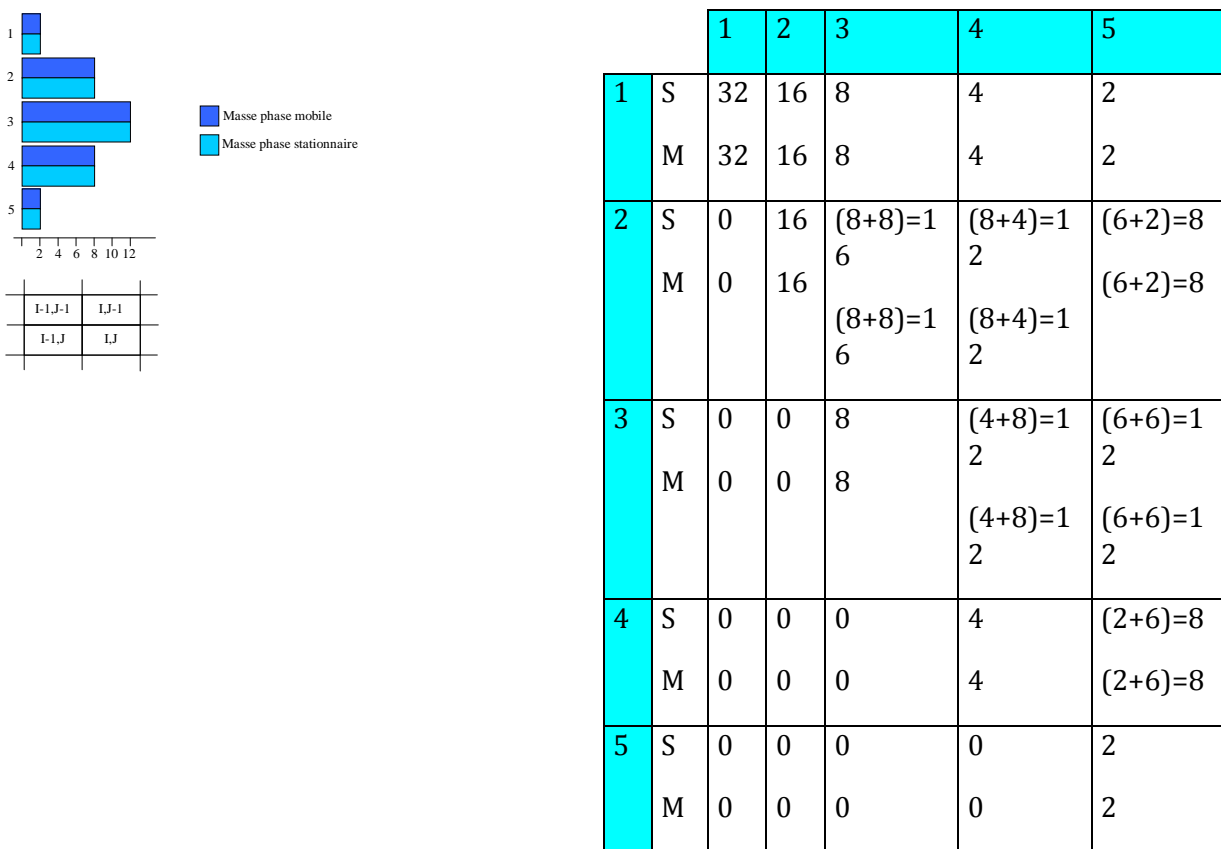


FIGURE 2 : EQUILIBRES SUR UNE COLONNE

A l'instant I, un plateau J contient une masse totale de soluté $M_T(I, J)$ qui résulte de la somme de la quantité M_M de ce soluté provenant de la phase mobile du plateau J-1 à l'instant I-1 à laquelle s'ajoute la quantité M_S déjà présente dans la phase stationnaire du plateau J à l'instant I-1.

$$M_T(I, J) = M_M(I-1, J-1) + M_S(I-1, J)$$

En posant $M_S = K * M_M$ et en écrivant que pour chaque plateau $M_T = M_M + M_S$, on peut pour chaque plateau, par une formule de récurrence, calculer M_T (ainsi que M_M et M_S) :

$$M_T(I, J) = \frac{1}{K+1} M_T(I-1, J-1) + \frac{K}{K+1} M_T(I-1, J)$$

Quand au chromatogramme, il représente la masse transitant dans la phase mobile par le N+1^{ème} plateau au cours des équilibres successifs.

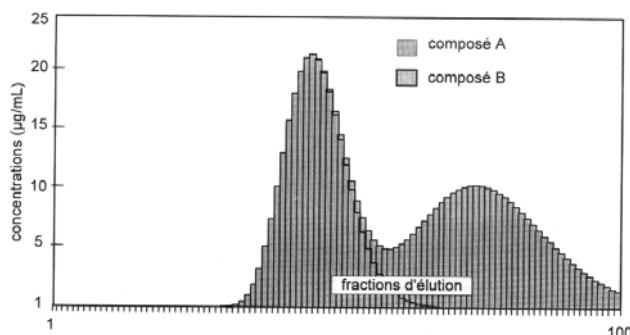


FIGURE 3 : ELUTION DE DEUX COMPOSES

Cette théorie a pour défaut de ne pas prendre en compte la dispersion dans la colonne due à la diffusion des composés.

2.2.2 THEORIE CINETIQUE

La théorie des plateaux a permis d'arriver à un certain nombre de conclusions expérimentalement vérifiées, mais elle néglige le fait que la chromatographie est un phénomène dynamique résultant du passage continu de la phase mobile sur la phase stationnaire.

Les conditions dans lesquelles s'effectuent ces passages ne sont pas sans importance sur le phénomène chromatographique comme on peut le constater lorsque l'on modifie par exemple le débit de la phase mobile. On observe en effet, un élargissement ou un rétrécissement des pics que la théorie des plateaux ne peut pas exprimer.

La théorie cinétique due à Giddings lie le nombre de plateaux d'une colonne ou plus exactement la HEPT à la vitesse d'écoulement de la phase mobile et à différents facteurs dépendant qui n'avaient pas été pris en considération par la théorie des plateaux. Cette théorie cinétique est représentée par l'équation de **Van Deemter** :

$$HEPT = H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Cette équation est généralement appliquée à la chromatographie gazeuse. Elle établit une relation simplifiée entre la vitesse linéaire d'écoulement (ou le débit) de la phase mobile u , la diffusion turbulente A , la diffusion longitudinale B et la résistance au transfert de masse C :

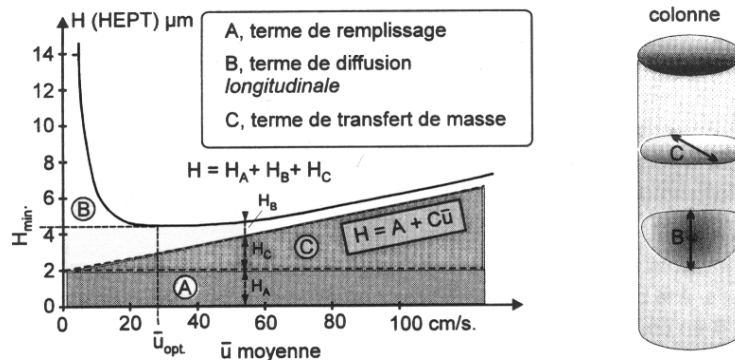


FIGURE 4 : COURBE DE VAN DEEMTER EN CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE AVEC INDICATION DES DOMAINES PROPRES A A, B ET C

Vitesse d'écoulement de la phase mobile :

La vitesse d'écoulement u de la phase mobile dépend de la température, de la pression imposée à la phase mobile et de la nature de la colonne.

A une température constante, elle est définie par la relation issue de la loi de Darcy :

$$u = \frac{\Delta P K^\circ}{L \eta}$$

Dans laquelle :

u : vitesse linéaire de la phase mobile en $cm\ s^{-1}$

ΔP : perte de charges

K° : constante de perméabilité de la colonne

L : longueur de la colonne

η : viscosité de la phase mobile

1^{er} terme : A de l'équation de Van Deemter

A exprime la diffusion turbulente due à l'écoulement irrégulier de la phase mobile à travers la phase stationnaire. Celle-ci est constituée de petites particules solides recouvertes ou non d'un film très fin de liquide. Leurs tailles et leurs formes, malgré toutes les précautions, ne sont jamais

identiques et les trajets effectués autour de chacune sont différents. La progression observée est alors le résultat moyen de tous les déplacements.

Les vitesses d'écoulement seront d'autant plus proches de la théorie que la colonne sera plus régulièrement remplie et les particules de tailles et de formes voisines.

Lorsque la substance à chromatographier se trouve dans la phase mobile, elle progresse donc également de manière irrégulière, il en résulte un élargissement de la zone dans laquelle elle se trouve par suite du phénomène de diffusion.

Le terme A, indépendant du débit de la phase mobile, ne dépend que des particules et croît avec leur diamètre.

2^{ème} terme B/u :

B/u : rend compte de l'influence de la diffusion longitudinale, c'est-à-dire la diffusion des molécules dans la direction de l'écoulement de la phase mobile.

Ce phénomène est général pour toutes les particules se trouvant dans un fluide en mouvement et est d'autant plus important que la vitesse est faible :

$$B = 2 \gamma D_m$$

D_m : est le coefficient de diffusion du composé considéré dans la phase mobile. Ce paramètre est négligeable lorsque la phase mobile est un liquide, il est de 10^4 à 10^6 fois plus important lorsqu'il s'agit d'un gaz.

Ce facteur de diffusion augmente avec l'élévation de la température mais diminue lorsque la pression croît.

γ est appelé facteur de tortuosité. Il représente l'influence de la colonne (granulométrie des particules, régularité du remplissage...). Il est d'autant plus faible que le cheminement des molécules est plus uniforme.

3^{ème} terme C :

C représente les inégalités de passage des molécules d'une phase à l'autre, il est encore appelé facteur de résistance aux transferts de masse. Ces phénomènes s'exercent à tout moment de la chromatographie (fixation, élution)

- dans la phase mobile toutes les molécules ne sont pas entraînées à la même vitesse et celles du milieu du flux progressent plus vite que celles se trouvant à l'extérieur créant ainsi des conditions de partage différentes.
- le contact phase mobile phase stationnaire ne s'effectue pas partout de manière identique et il est bien évident que le trajet à l'intérieur des anfractuosités du support est différent de celui se produisant à la surface.
- lorsque la phase stationnaire est constituée par un liquide recouvrant des particules support, les molécules de soluté fixées dans la phase stationnaire sont situées à des

distances variables de la phase mobile et l'élution ne se fait pas partout à la même vitesse. Le temps de séjour dans la phase stationnaire est fonction du chemin à parcourir.

Tous ces phénomènes entraînent des retards aux établissements d'équilibre d'autant plus accentués que le débit de la phase mobile est plus rapide. Pour atténuer ces facteurs de résistance, il y aura lieu de diminuer les distances à parcourir dans chaque phase en réduisant le diamètre des particules, l'épaisseur de la phase stationnaire et en utilisant une colonne régulièrement remplie et bien tassée.

La courbe représentant l'équation de Van Deemter est une hyperbole. Elle montre que la variation de la HEPT en fonction de la vitesse d'écoulement passe par une valeur minimale calculée en cherchant la valeur de u correspondant à l'annulation de la dérivée première de cette fonction :

$$f'(u) = -\frac{B}{u^2} + C$$

pour que $f'(u) = 0$ il faut que $u_o = \sqrt{\frac{B}{C}}$. Dans ce cas, la hauteur efficace d'un plateau théorique est $H = A + 2\sqrt{BC}$

Pour $u > u_o$ l'augmentation du débit provoque une augmentation de la HEPT. Les temps de contact entre les deux phases sont courts et les équilibres n'ont pas le temps de s'établir complètement.

Pour $u < u_o$ Les phénomènes de diffusion longitudinale deviennent prépondérants et entraînent également une augmentation de la HEPT.

Ces constatations faites pour le débit ont également été observées pour la température en chromatographie en phase gazeuse avec une équation équivalente :

$$HEPT = H = A + \frac{B}{T} + CT$$

De manière pratique, il convient donc de rechercher les conditions opératoires qui, pour une colonne donnée, permettent d'obtenir la plus grande efficacité c'est-à-dire la plus faible valeur de la HEPT.

La valeur des paramètres A, B, C est difficile à effectuer, il est possible de tracer expérimentalement l'équation précédente pour une colonne de longueur L en fonction soit du débit soit de la température et d'en déduire les coefficients.

L'équation de Van Deemter initialement appliquée à la CPG peut être également appliquée aux autres types de chromatographie dans lesquelles les vitesses d'écoulement de la phase mobile occupent une place prépondérante. Cependant la HEPT croît régulièrement avec le débit ce qui est dû au fait que dans les liquides le terme B est très faible et que ce facteur n'interviendrait que pour des valeurs de u très petites, pratiquement jamais utilisées.

3 LES GRANDEURS FONDAMENTALES DE LA CHROMATOGRAPHIE

3.1 LE CHROMATOGRAMME

Le chromatogramme est un diagramme à deux dimensions présenté sur un écran ou sur papier. Il montre l'évolution d'un paramètre qui dépend de la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne en fonction du temps :

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

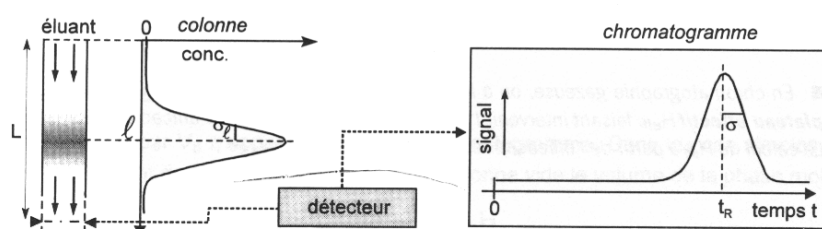


FIGURE 5 : REPRESENTATION D'UN CHROMATOGRAMME

Le temps d'éluion est porté en abscisse et le signal du détecteur en ordonnée. La courbe est formée d'autant de pics distincts qu'il y a de composés séparés et détectés en sortie de la colonne. La séparation est totale quand le chromatogramme présente autant de pics revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser.

Les pics chromatographiques idéaux sont des représentations des profils de concentration de soluté qui devraient être théoriquement Gaussiens. Par contre, les pics réels sont quelquefois loin de présenter des pics d'aspect gaussien. Il y a plusieurs raisons à cela :

- le coefficient de distribution K est rarement constant avec la concentration. Il se produit une irrégularité de concentration dans la zone de dépôt de la substance en tête de colonne.
- la vitesse d'écoulement de la phase mobile n'est pas constante sur la section. La vitesse est nulle au niveau de la paroi et maximale au centre de la colonne.

Dans ce cas, le partage et la migration sont modifiés et les tracés ne sont plus symétriques :

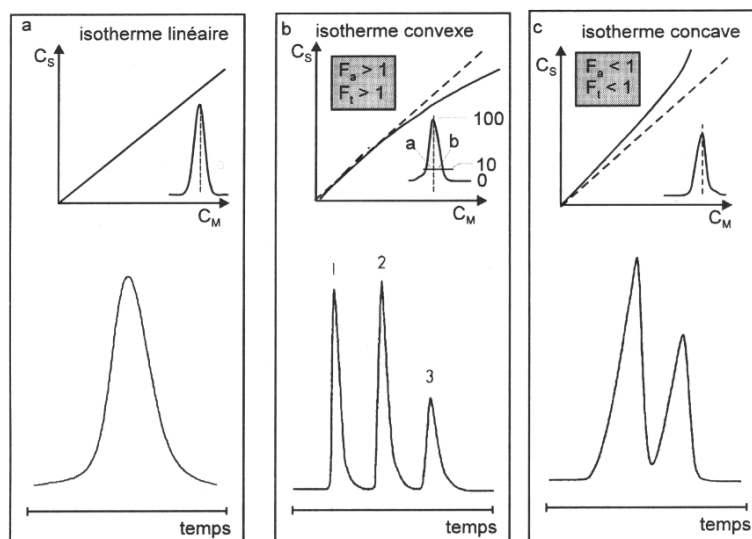


FIGURE 6 : ISOTHERMES DE DISTRIBUTION. A) SITUATION IDEALE CORRESPONDANT A L'INVARIANCE DE CONCENTRATION. B) SITUATION DANS LAQUELLE LA PHASE STATIONNAIRE EST SATURÉE. C) SITUATION INVERSE LE COMPOSE EST TROP RETENU.

Fig a : la distribution est linéaire (K et u constants). La concentration n'intervient pas et la vitesse de déplacement de la substance est la même en tout point de la colonne (courbe gaussienne).

Fig b et c : Les isothermes de distribution ne sont plus linéaires et varient en fonction de la concentration. Deux cas peuvent se présenter :

Fig b : La phase stationnaire est saturée. De ce fait la montée du pic est plus rapide que la descente. Autrement dit la migration devient plus importante et il s'ensuit que les points du chromatogramme où la concentration est plus élevée migrent plus vite que ceux où la concentration est plus faible et la zone d'élution n'est donc plus régulière et se déforme.

Fig c : Le constituant est trop retenu sur la colonne. Le temps de rétention est allongé et la montée du pic est plus lente que la descente. Ce cas est moins fréquent.

3.2 CARACTERISTIQUE DES PICS CHROMATOGRAPHIQUES

Le pic chromatographique est caractérisé par plusieurs dimensions :

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

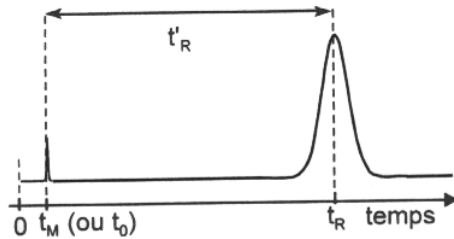
σ : l'écart-type du pic (qui est égal à la demi-largeur du pic à 60,6% de sa hauteur totale)

variance $v = \sigma^2$

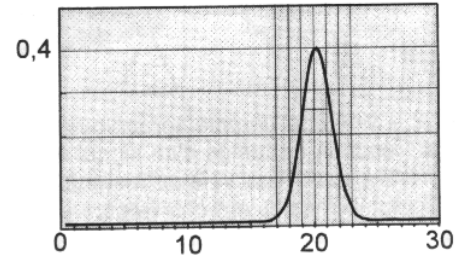
ω : la largeur de la base du pic mesurée à 13,5% de la hauteur totale

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

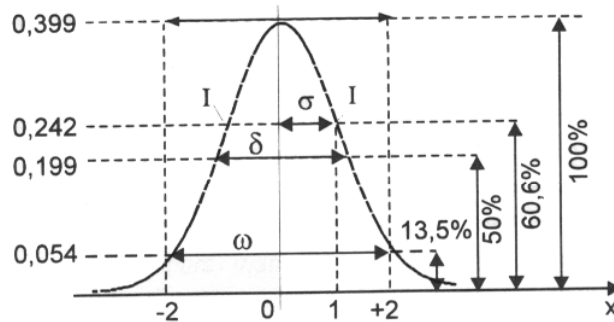
a temps de rétention



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



c caractéristiques du pic idéal



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

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

d comparaison entre un chromatogramme réel et des courbes gaussiennes

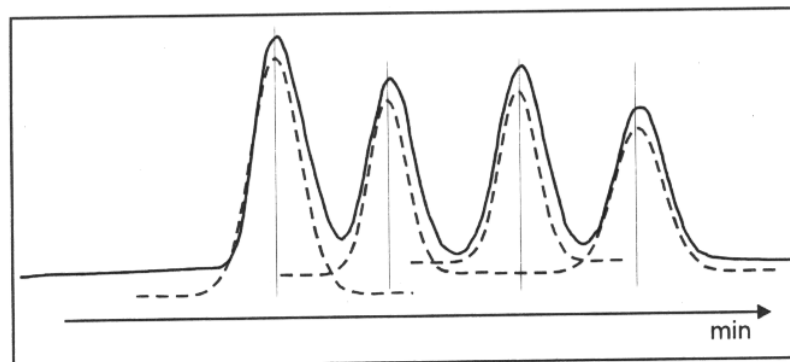


FIGURE 7 : PICS CHROMATOGRAPHIQUES. A) NOTION DE TEMPS DE RETENTION. B) EXEMPLE DE TRACE DE LA FONCTION DE GAUSS. C) SIGNIFICATION DES TROIS PARAMETRES CLASSIQUES ET RESUME DES CARACTERISTIQUE D'UN COURBE DE GAUSS. D) UN EXEMPLE DE CHROMATOGRAMME REEL QUI MONTRE QUE L'ELUTION DES COMPOSES PEUT CONDUIRE A DES PICS RESSEMBLANT VRAIMENT A DES COURBES GAUSSIENNES/

Autre méthode :

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

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

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

Le temps de rétention est indépendant

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

Par contre il dépend :

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

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

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

$$t'_R = t_R - t_M$$

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

$$V_R = t_R * D$$

On peut également calculer le volume mort correspondant au volume de la phase mobile dans la colonne (volume interstitiel) :

$$V_M = t_M * D$$

3.3 FACTEUR DE RETENTION OU FACTEUR DE CAPACITE K'

3.3.1 DEFINITION

Quand on introduit un composé dans la colonne, sa masse totale m_T se répartit en deux quantités m_M dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire. Ces quantités restent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Elles dépendent de m_T et de K . Leur rapport est fixe et est appelé facteur de rétention :

$$k' = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad K : \text{coefficient de distribution}$$

avec V_S : volume de la phase stationnaire qui est calculé par différence entre le volume total de la colonne et le volume de la phase mobile (V_M).

k' n'est pas une constante mais varie avec les conditions opératoires (température, composition de la phase mobile...). C'est le paramètre le plus important en chromatographie pour définir le comportement d'une colonne. On évite d'avoir des valeurs de k' trop élevées pour ne pas allonger le temps d'analyse.

3.3.2 DETERMINATION EXPERIMENTALE DU FACTEUR DE RETENTION K OU K'

k' peut se déterminer directement à partir du chromatogramme. On montre que :

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

avec t_R : temps de rétention du soluté

t_M : temps mort

En effet, la vitesse linéaire moyenne d'un soluté s'exprime par :

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad \text{avec } L : \text{longueur de la colonne}$$

celle de la phase mobile est : $u = \frac{L}{t_M}$

La vitesse de déplacement du soluté dans la phase mobile est liée à la vitesse de la phase mobile que multiplie un facteur de rétention :

$$\bar{v} = u * f_{\text{rétention}}$$

Ce facteur de rétention est égal à : $f_{rét} = \frac{m_M}{m_T}$

soit $\bar{v} = u \frac{m_M}{m_M + m_S} = u \frac{1}{1 + \frac{m_S}{m_M}} = u \frac{1}{1 + k'}$

soit $\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \frac{1}{1 + k'}$

soit en réarrangeant : $k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$ ou $k' = \frac{t'_R}{t_M}$

Cette relation est également souvent rencontrée sous la forme :

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

3.4 FACTEUR DE SELECTIVITE α ENTRE DEUX SOLUTES

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

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

α est toujours supérieur à 1

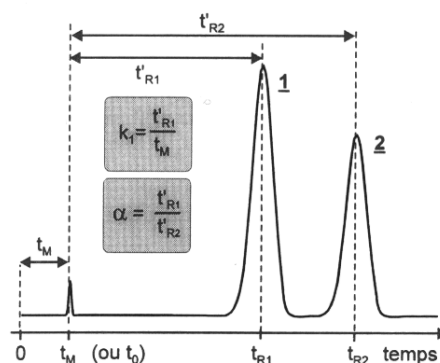


FIGURE 8 : SELECTIVITE

3.5 RESOLUTION D'UNE COLONNE

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

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

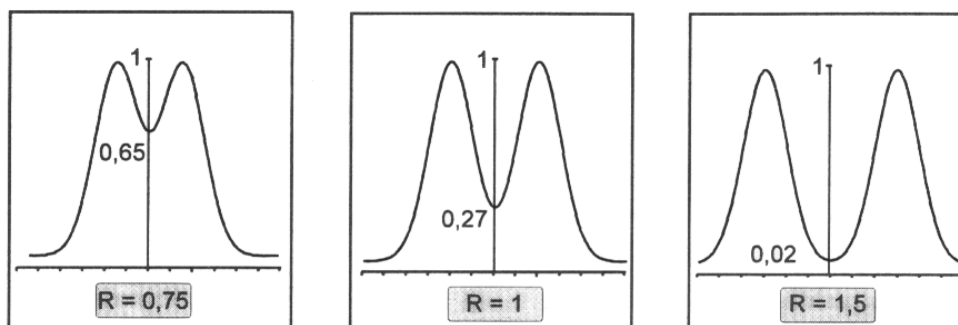


FIGURE 9 : FACTEUR DE RESOLUTION. A PARTIR DE 1,5 ON CONSIDERE QUE LES PICS SONT RESOLUS, LA VALLEE ENTRE LES PICS ETANT D'ENVIRON 2%

Une résolution de 1,5 permet la séparation pratiquement complète de 1 et 2, ce qui n'est pas le cas pour une résolution de 0,75.

Pour une résolution de 1 le pic de 1 contient environ 4% de 2 et le pic de 2 environ 4% de 1. Pour une résolution de 1,5 le chevauchement est d'environ 0.3%.

Pour améliorer la résolution, il faut soit allonger la longueur de la colonne pour avoir un nombre de plateaux théoriques plus grand, soit changer les conditions opératoires de l'analyse (température, phase mobile...).

On établit facilement l'équation qui lie la résolution d'une colonne et le nombre de ces plateaux théoriques ainsi que les facteurs de capacité et de sélectivité de deux solutés sur la colonne :

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

où k'_2 est le facteur de capacité de l'espèce la plus lente et α le facteur de sélectivité.

3.6 EFFICACITE D'UNE COLONNE

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

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

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

- Le nombre de plateaux théoriques peut varier de quelques centaines à plusieurs centaines de milliers.
- Les valeurs de H sont comprises entre quelques dixièmes de centimètre à moins d'un millième de centimètre.

L'efficacité de la colonne est calculée à partir du pic chromatographique que l'on assimilera à une courbe de Gauss. La dispersion d'un pic est caractérisée par son écart type σ et sa variance σ^2 .

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

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

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

Détermination de H où de N :

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

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

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

Démonstration :

Pour pouvoir exprimer N où H en fonction du temps de rétention, il faut exprimer l'écart type en unité de temps τ . La relation qui lie ces deux écarts-types est :

$$\tau = \frac{\sigma}{v}$$

avec $\omega = 4 \tau$ (ω est exprimé en unité de temps)

$$\text{et } \bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

$$\text{soit } H = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{(\bar{\tau v})^2}{L} = \frac{\left(\frac{\omega}{4}\right)^2 \left(\frac{L}{t_R}\right)^2}{L} = \frac{L\omega^2}{16t_R^2}$$

$$\text{ou encore } N = \frac{L}{H} = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2}$$

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

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

On utilise généralement cette dernière équation car les pics sont souvent déformés à la base.

Efficacité réelle d'une colonne

N et H sont deux paramètres utilisés dans la littérature et par les fabricants d'appareils pour évaluer les performances d'une colonne. Ils sont donnés pour un soluté défini dans les conditions définies.

Lorsque l'on veut comparer les performances de deux colonnes de conception différentes, il est préférable de remplacer t_R par le temps réduit t'_R qui ne tient pas compte du temps mort t_M passé pour tout composé dans la phase mobile. Les expressions deviennent :

$$N_{eff} = 5,54 \left(\frac{t'_R}{\delta} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N_{eff} = 16 \left(\frac{t'_R}{\omega} \right)^2$$

Ces grandeurs corrigées ne sont utiles à considérer que si le temps mort est grand par rapport au temps de rétention du composé. Ceci est notamment le cas en CPG lorsque l'on veut comparer les performances d'une colonne capillaire et d'une colonne remplie.

4 OPTIMISATION D'UNE ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

La résolution et le temps d'éluion sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante du ou des composés intéressants en un minimum de temps. Les paramètres qui conditionnent R et t_R sont le nombre de plateaux théoriques N , le facteur de capacité α et le facteur de sélectivité k'_B :

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

4.1 MODIFICATION DE LA HAUTEUR EQUIVALENTE A UN PLATEAU THEORIQUE

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

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

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

4.2 MODIFICATION DU FACTEUR DE CAPACITE

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

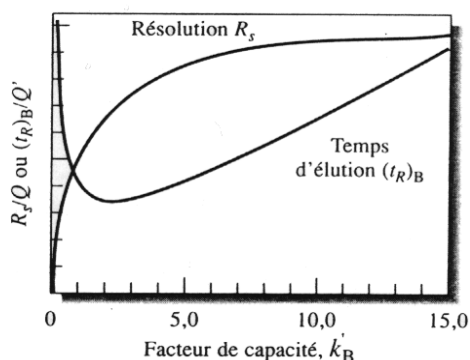


FIGURE 10 : OPTIMISATION D'UN ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

On voit sur le graphique que pour :

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

Les valeurs optimales de k' sont généralement comprises entre 2 et 5.

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

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

4.3 MODIFICATION DU FACTEUR DE SELECTIVITE

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

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

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