

Cours : Chromatographie Aspects généraux

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles.

I) Principe

La chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire. Celle-ci retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon dilué selon l'intensité des forces d'interactions de faible énergie (comme les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogène, etc.) réalisées entre les différentes espèces moléculaires et la phase stationnaire.

II) Types de chromatographie

Il existe plusieurs variantes de techniques chromatographiques, classées de plusieurs manières différentes : **(Figure 1 et 2)**

- 1- selon la nature des phases (mobile et stationnaire).
- 2- selon Le procédé opératoire.
- 3- selon le principe des phénomènes mis-en dans la séparation (type d'équilibre).

III.1 Classification selon la nature physique des phases

Selon la nature de la phase mobile on distingue :

- Chromatographie en phase liquide (CPL)
- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- Chromatographie en phase supercritique (CPS)

Selon la nature de la phase stationnaire on distingue :

- Chromatographie liquide/solide (CLS)
- Chromatographie liquide/liquide (CLL)
- Chromatographie gaz/solide (CGS)
- Chromatographie gaz/liquide (CGL).

III.2 Classification d'après le procédé opératoire

Selon le support de la chromatographie on distingue :

Chromatographie planaire : la phase stationnaire est présente à la surface d'un support plat on distingue deux types

- Chromatographie sur papier (CP) : une surface plane de cellulose considérée comme support maintient par imbibition une phase stationnaire liquide.
- Chromatographie sur couche mince (C.C.M) la phase stationnaire est étalée sur une surface plane (chromatographie planaire)

Chromatographie sur colonne (CC) ; La phase stationnaire est maintenue dans un tube étroit et la phase mobile y progresse par gravité ou sous l'action d'une différence de pression HPLC.

III.3 Classification selon le principe des phénomènes chromatographiques

La classification des chromatographies peut se faire en fonction des phénomènes ou bien des mécanismes de séparation. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer

Cours : Chromatographie Aspects généraux

entre les phases fixe et mobile sont : La solubilité dans un solvant liquide ; la taille (la forme) ; la polarité ; la charge électrique ; la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers.

IV) Terminologie générale de la chromatographie.

- **Soluté** : Toute substance constituant d'un mélange, séparée par chromatographie.
- **Phase mobile** : Vecteur, liquide ou gazeux, qui déplace le soluté.
- **Phase stationnaire** : Produit qui, par ses affinités avec les solutés, va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace.
- **Support** : Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire.
- **Remplissage** : l'ensemble des produits (adsorbant, support + phase stationnaire, etc...) qui garnissent une colonne chromatographique.
- **Colonne chromatographique** : Tube de diamètre et longueur variable, en verre, métal, ou autre substance, à l'intérieur duquel s'opèrent les séparations chromatographiques.
- **Développant** : Phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, de telle manière qu'ils demeurent dans celle-ci : cas de la CP et de la CCM
- **Chromatogramme** : Diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur (par rapport à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution
- **Éluant** : Une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, jusqu'à ce qu'ils sortent de celle-ci
- **Elution** est l'entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile. En chromatographie liquide solide, la phase mobile peut être appelée

V) Notions fondamentales

V.1) Grandeurs de rétention :

La vitesse de passage de la phase mobile est constante. Chacun des solutés se déplace indépendamment les uns des autres avec une vitesse qui leur est propre et qui dépend de leur comportement vis-à-vis des deux phases, notamment de leur affinité avec la phase stationnaire. La répartition d'un soluté dans la colonne après un certain « temps de passage » peut être représentée par une courbe d'allure sensiblement gaussienne si ce « temps de passage » est suffisamment long. On définit ainsi : Temps de rétention ; Volume de rétention ; Coefficient de distribution et Facteur de rétention.

1) Pic

Si la quantité injectée est petite on obtient pour chaque composé élué un pic symétrique et gaussien (figure 3). On définit ainsi les paramètres suivants :

Cours : Chromatographie Aspects généraux

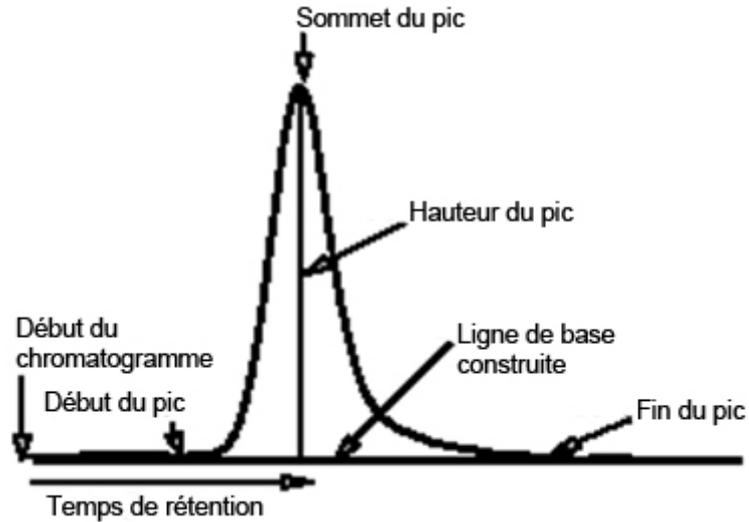


Figure 4. Représentation d'un pic chromatographique

2) Notion de temps (Figure 4)

T_0 Temps du début de l'injection

Temps mort : aussi dit T_m , est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).

Temps de rétention T_r : Le temps de rétention (t_r) est le temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne

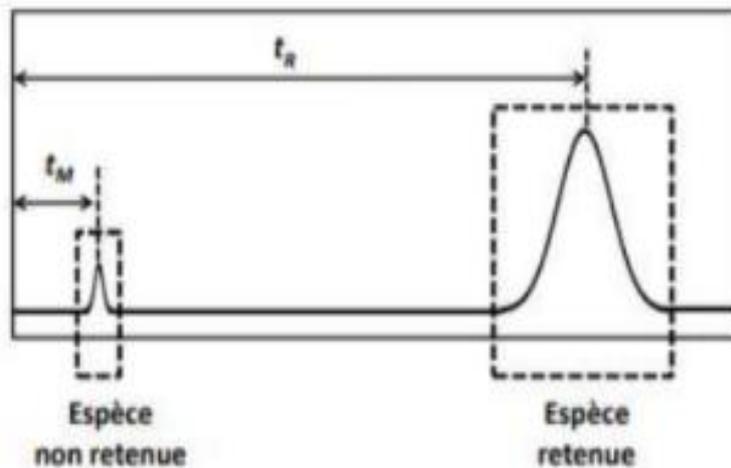


Figure 4. Notion du temps

Temps de rétention réduit T_r' : Temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit
 $T_r' = T_r - T_m$Equation 1

Cours : Chromatographie Aspects généraux

3) Notion de volume

-Volume mort : C'est le Volume (V_m) volume de la phase mobile contenu dans la colonne chromatographique. Si D est le débit de la phase mobile (D supposé constant) donc

$$V_m = T_m \times D \dots\dots\dots\text{équation 2}$$

Débit de la phase mobile D = volume de phase mobile circulant au travers de la colonne chromatographique par unité de temps (ml.min⁻¹).

-Volume de rétention V_r (élution) volume de phase mobile nécessaire pour faire migrer le soluté au travers de la phase stationnaire.

$$V_r = T_r \times D \dots\dots\dots\text{équation 3}$$

-Volume de rétention réduit V_r' : par analogie au temps de rétention réduit on définit le Volume de rétention réduit par l'équation suivante

$$V_r' = V_r - V_m \dots\dots\dots\text{équation 4}$$

4) Vitesse moyenne linéaire de déplacement

-Vitesse moyenne linéaire de la phase mobile : (espèce non retenue)

$$u = L / T_m$$

-Vitesse linéaire moyenne de progression du soluté (espèce retenue)

$$V = L / T_r$$

5) Facteur de capacité

Le facteur de capacité (ou facteur de rétention) k' exprime le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile. Ce facteur sans dimension, peut être relié au temps de rétention par l'expression

$$k' = (t_r - t_m) / t_m$$

k' est aussi le rapport du temps passé par une espèce dans la phase stationnaire au temps passé par cette même espèce dans la phase mobile.

De faibles valeurs de k' indiquent des composés peu retenus. Des valeurs élevées de k' indiquent des composés fortement retenus, en pratique

$$1 < k' < 10.$$

6) Facteur de sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité ou de séparation α . Ce facteur est égal au rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser la séparation. Il s'exprime par :

$$\alpha = \frac{(t_{r2} - t_m)}{(t_{r1} - t_m)} = k'_2 / k'_1$$

Avec $k'_2 > k'_1$ Il s'agit du rapport des temps de rétention réduits

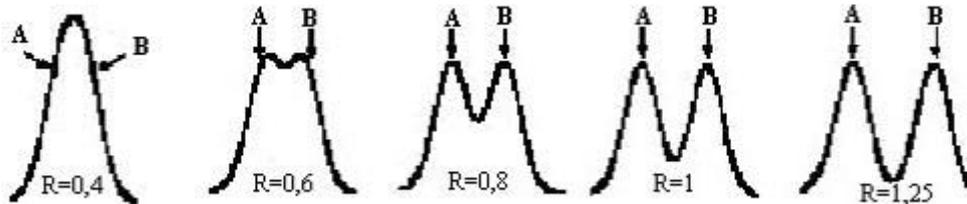
k'_2 ': facteur de capacité du composé 2 ; **k'_1 '**: facteur de capacité du composé 1 ; $\alpha = 1$ aucune séparation ne s'effectue aussi le temps de rétention est le même. La sélectivité doit être supérieure à 1. Deux composés ne peuvent être séparés sauf s'ils ont $k' \neq 0$

7) Facteur de résolution

Cours : Chromatographie Aspects généraux

Le facteur R entre deux solutés : permet de traduire numériquement la qualité de la séparation entre deux pics.

$$R_s = 2 \frac{(tR2 - tR1)}{\omega_2 + \omega_1}$$



Étant les largeurs à la base,

8) Analyse qualitative

8.1) Grandeurs de retentions

Temps, volume,.....

8.2) Performances des colonnes chromatographiques

8.1.1) Facteur de capacité

Soit t_m le temps mis pour la phase mobile à traverser la colonne, et t_r le temps de rétention de chaque soluté. Le facteur de capacité de la colonne k' s'exprime de la manière suivante :

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

8.1.2) Grandeurs de séparation

• Efficacité d'une colonne

Il est nécessaire de pouvoir comparer l'efficacité de colonnes de chromatographie en s'affranchissant de l'affinité du substrat pour les différentes phases. Pour cela, la colonne est divisée en compartiments élémentaires théoriques dans lesquels se produit un équilibre thermodynamique rapide et réversible entre la phase stationnaire et la phase mobile (Figure9). Plus le nombre de plateaux théoriques est élevé, plus la colonne est considérée comme efficace.

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne.

Il existe plusieurs méthodes pour calculer le nombre de plateaux théoriques (N) qui sont dépendantes de la forme du pic chromatographique et des différentes grandeurs qui le caractérisent

Les pics chromatographiques ont une allure gaussienne, l'aire des pics est calculée en assimilant le pic à un triangle.

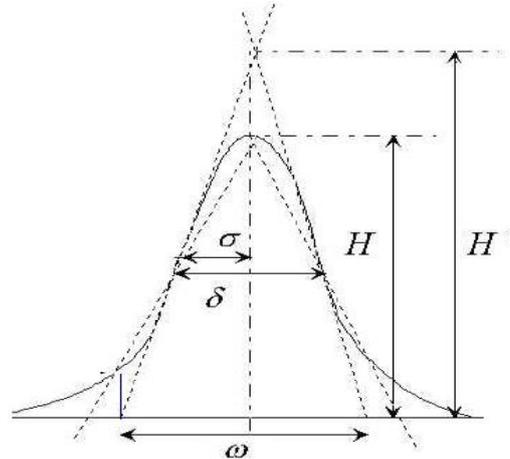
La largeur d'une courbe de Gauss est définie par : σ , δ , ω ou :

σ = écart type = $\frac{1}{2}$ largeur du pic à la hauteur des points d'inflexion, à 60,6% de la hauteur

δ = $2,35 \sigma$ = largeur à mi-hauteur.....**équation 1**

ω = 4σ = $1,7\delta$ = largeur mesurée à 13,5% de la hauteur = largeur à la base du pic**équation 2**

Cours : Chromatographie Aspects généraux



De ce fait N est calculé comme suit :

$$N = (t_R/\sigma)^2 \text{ Ou } N = 16(t_R/\omega)^2 \text{ Ou } = 5.54 (t_R/\delta)^2$$

- **Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT)**

Pour exprimer l'efficacité d'une colonne de longueur L et de N plateaux théoriques, on définit la hauteur H équivalente à un plateau théorique: $H = L/N$

H est appelé la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), ce paramètre varie entre 10 et 0,01 mm. Le paramètre H est intéressant car il est indépendant de la longueur de la colonne.

- **Résolution des colonnes.**

La résolution R permet de mesurer la qualité d'une séparation chromatographique, est définie par la relation:

$$R = 2 \cdot (t_{RB} - t_{RA}) / (W_A + W_B)$$

avec t_r , temps de rétention des 2 pics contigus

et ω_0 , largeur de ces pics à leur base.

si $R < 1$ la résolution est mauvaise

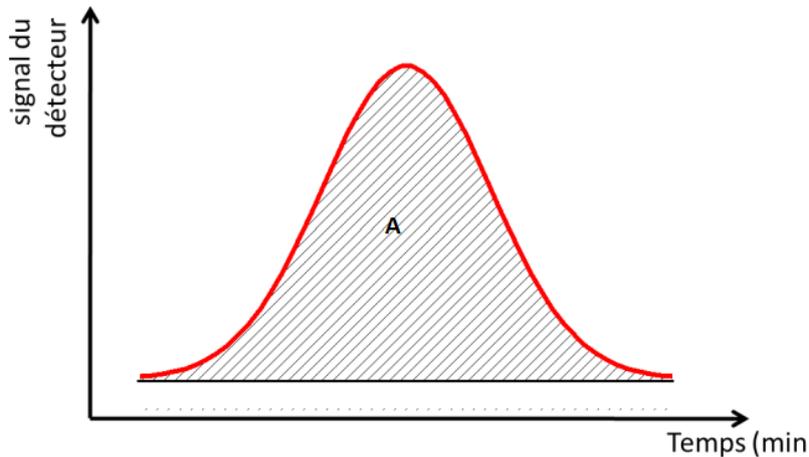
si $1 < R < 1,5$ la résolution est acceptable

si $R > 1,5$ la résolution est bonne.

9) Analyse quantitative

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

Cours : Chromatographie Aspects généraux



Une fois identifiés le ou les solutés intéressants, celui-ci permet l'analyse quantitative grâce

à la relation: $m_i = K_i A_i$

m_i : Masse du soluté i injecté

A_i : Aire du pic représentant ce soluté (aire d'élution).

K_i : Coefficient de proportionnalité ou de réponse

1) Mesure de l'aire de pic A_i

Il existe deux techniques ; manuelle et automatique

Technique manuelle

On utilise essentiellement la triangulation manuelle (Figure page 3).

$A_i = 1.032$ aire du triangle.....1

Aire du triangle= $\frac{1}{2} H' \cdot \omega$ avec $H' = 1.214H$

$A_i = 0.627 \cdot H \cdot \omega$

2) Détermination du coefficient de proportionnalité

2.1) méthode d'étalonnage externe

Cette méthode est basée sur la comparaison de deux chromatogrammes (étalonnage et dosage) effectués dans des conditions identiques.

Pour solution étalon : on injecte un volume V_i contenant une masse m_i connue

$m_i = C_i \times V_i = K_i \times A_i$ 1

Pour le soluté à doser : on injecte un volume V_x contenant une masse m_x et on mesure m_x ou C_x

$m_x = C_x \times V_x = K_x \times A_x$ 2

m_x : masse de l'échantillon à doser

C_x : concentration inconnue

V_x volume injectée de l'échantillon à doser

A_x : aire de l'échantillon

K_x : coefficient de réponse de x

Sachant que K et V sont identiques donc

$C_x / C_i = A_x / A_i$ donc

$C_x = C_i \cdot A_x / A_i$