Chapitre II

La chromatographie: notions de base.

Chapitre II

- II-1-Définition.
- II-2-Principe de la séparation.
- II-3-Classification des méthodes chromatographiques.
- II-4-Choix de la méthodes chromatographiques.
- II-5-Grandeurs chromatographiques.
- II-6-Equation de Van Deemter.
- II-7-Optimisation d'une analyse chromatographique.

II-1-Définition:

- **La chromatographie** est une méthode qui permet de séparer les constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeux. C'est une technique de séparation très puissante qui permet de travailler sur des quantités allant jusqu'au **µg**

- Le mot chromatographie a été utilisé pour la première fois par le chimiste Tswett vers 1906, lors de la séparation de pigments d'épinard sur une colonne en $CaCO_3$. Le mot chromatographie vient du grec: Khroma= couleur; Graphein= écrire

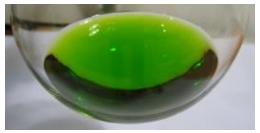
- Les séparations chromatographiques mettent en œuvre des techniques basés sur des propriétés physico-chimiques des molécules:

1- **La solubilité**: tendance d'une molécule a se dissoudre dans un liquide.

2- **La volatilité**: tendance d'une molécule a passer a l'état vapeur.

3- **L'adsorption**: tendance d'une molécule a se lier a un solide finement divisé.

Colonne en $CaCO_3$ avant la séparation



Échantillon d'épinard en solution

Colonne en $CaCO_3$ après séparation

II-2-Principe de la séparation :

- Le principe de la chromatographie consiste à **entrainer l'échantillons** à l'aide d'un **éluant** (gazeux ou liquide) appelé ici **phase mobile (PM)**, qui se déplace au contact d'une seconde **phase fixée** sur un support (colonne ou surface plane). Celle-ci, dite **stationnaire (PS)**, est insoluble dans la première.
- Si les différents composés de l'échantillon (**Soluté**) présentent **des affinités différentes** pour le couple **PM/PS**; ils vont être plus au moins ralenti dans leur progression par la phase stationnaire. Sous l'effet antagoniste des **forces de rétention** soluté/PS et des **forces d'entrainement** soluté/PM. Ces composé vont pouvoir être recueillis séparément à l'issue de cette **migration**.
- Chaque composé est caractérisé par un ***coefficient de distribution de Nernst*** **K** (appelé également ***coefficient de partition***) défini comme suit:

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

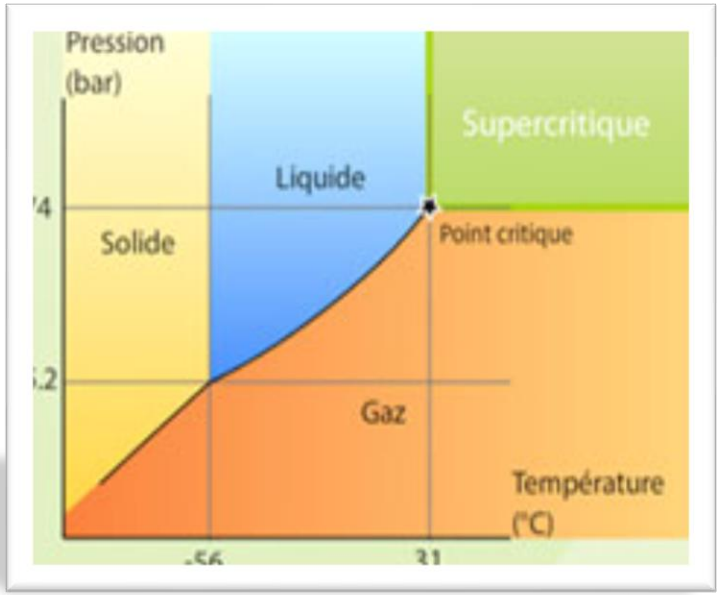
- K dépend de la **température** et de **trois forces d'interaction**: PS/soluté, PM/soluté et PM/PS.

II-3-Classification des méthodes chromatographiques:

- Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon trois modalités différentes :
  1. Classification selon la nature physique des phases.
  2. Classification selon le phénomène mis en œuvre.
  3. Classification selon le procédé opératoire.

1. Classification selon la nature physique des phases.

- la **phase mobile** est un fluide; soit un liquide, soit un gaz, ou un fluide supercritique et la **phase stationnaire** est soit un solide, soit un liquide. On distingue:
  - chromatographie liquide—solide (CLS)
  - chromatographie liquide—liquide (CLL)
  - chromatographie gaz—solide (CGS)
  - chromatographie gaz—liquide (CGL)
  - chromatographie supercritique (SFC); les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz, par exemple le CO_2 à 50°C et 150 bar.



II-3-Classification des méthodes chromatographiques:

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

2. Classification selon le phénomène mis en œuvre:

- La **chromatographie d'adsorption** (lorsque **la phase stationnaire est un solide**); par extension on pourrait y rattacher la **chromatographie d'affinité**, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).

- La **chromatographie d'échange d'ions**, où **la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels** acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.

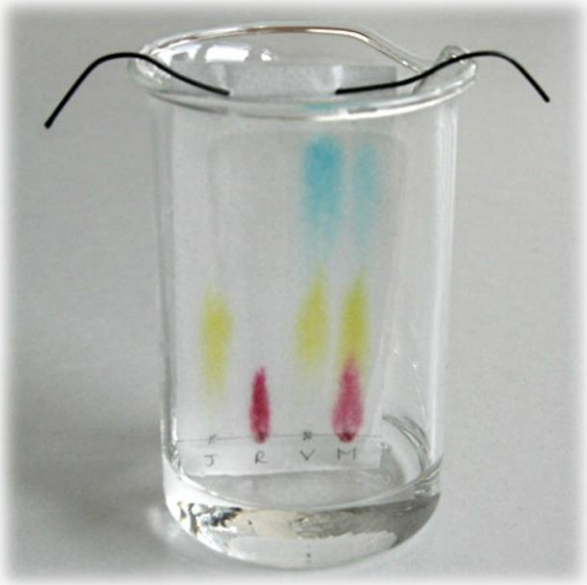
- La **chromatographie de partage**, lorsque **la phase stationnaire est un liquide non miscible** avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).

- La **chromatographie d'exclusion** où **la phase stationnaire poreuse** se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel.

II-3-Classification des méthodes chromatographiques:

3. Classification selon le procédé opératoire:

- Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distingue :
  - La chromatographie sur **colonne**
  - La chromatographie sur **papier**
  - La chromatographie sur **couche mince.**



- Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distingue:
  - La **chromatographie** par **développement** (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire)
  - La **chromatographie d'élution** (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).

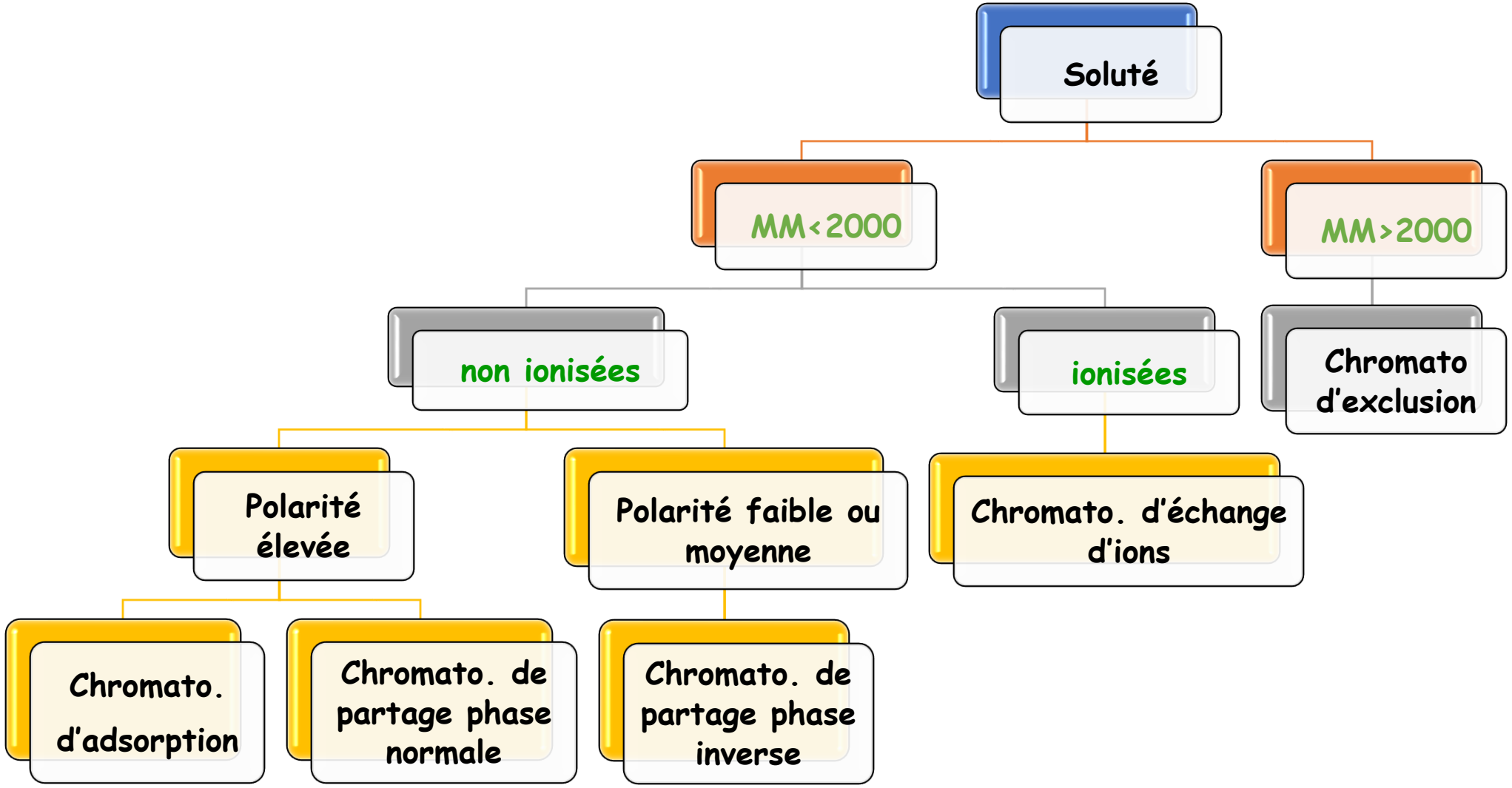
II-4-Choix de la méthodes chromatographiques :

- Le choix entre les différentes techniques chromatographiques dépend de deux facteurs essentiels:

1. de la nature physique du soluté : gaz, liquide, solide, macromolécule, espèce organique (polaire ou non polaire), ionique

2. du but de l'analyse : identification, contrôle de pureté, purification de produits, suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages, quantification…

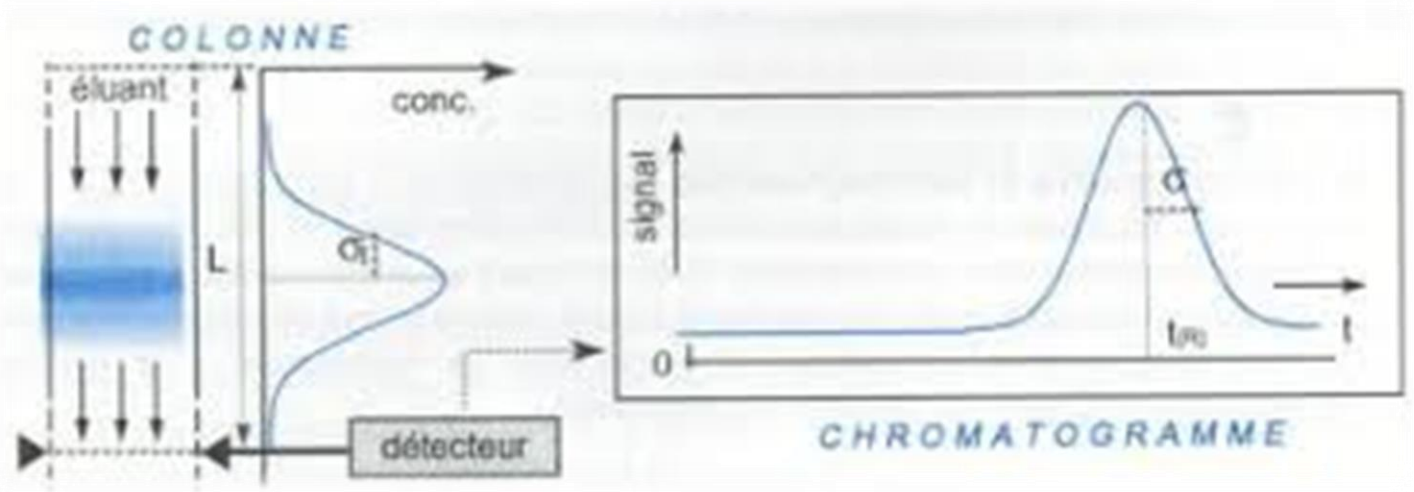
II-4-Choix de la méthodes chromatographiques :



II-5-Grandeurs chromatographiques :

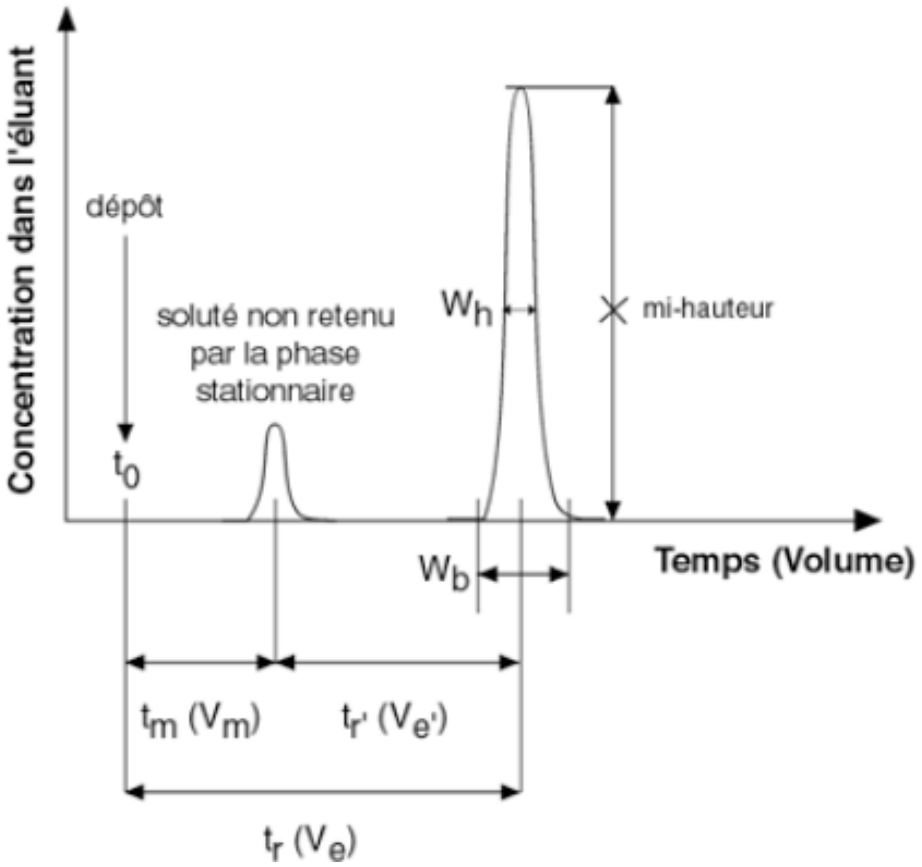
- Tous les instruments chromatographiques comportent une colonne renfermant la phase stationnaire ainsi qu'un détecteur situé en aval pour repérer les changements de composition de la phase mobile au cours de son élution, a chaque séparation correspond un enregistrement appelé «**Chromatogramme**» :

- Le **Chromatogramme** : est une courbe, idéalement, Gaussien en fonction du **temps de rétention t_R** ce dernier présente le temps mis par le soluté pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la phase stationnaire.



- Le temps de rétention est caractéristique d'une espèce pour des conditions d'analyse données et peuvent servir à **l'analyse qualitative**. La surface et la hauteur d'un pic est fonction de la quantité du constituant. Le temps de rétention est indépendant de la quantité d'échantillon injectée. Il est fonction de la nature et la vitesse de la phase mobile

II-5-Grandeurs chromatographiques :



t_0: début de l'injection

V_m: volume mort de la colonne

t_m: temps mort

V_e: volume d'élution (ou de rétention V_r) d'un composé

t_r: temps de rétention (d'élution, t_e) d'un composé

V_e (volume d'élution)=d (débit) x t (temps)

$V_{e'}$: volume d'élution réduit ($V_e=V_{e'}+V_m$)

$t_{r'}$: temps de rétention réduit ($t_r=t_{r'}+t_m$)

W_b: largeur du pic à la base (ω)

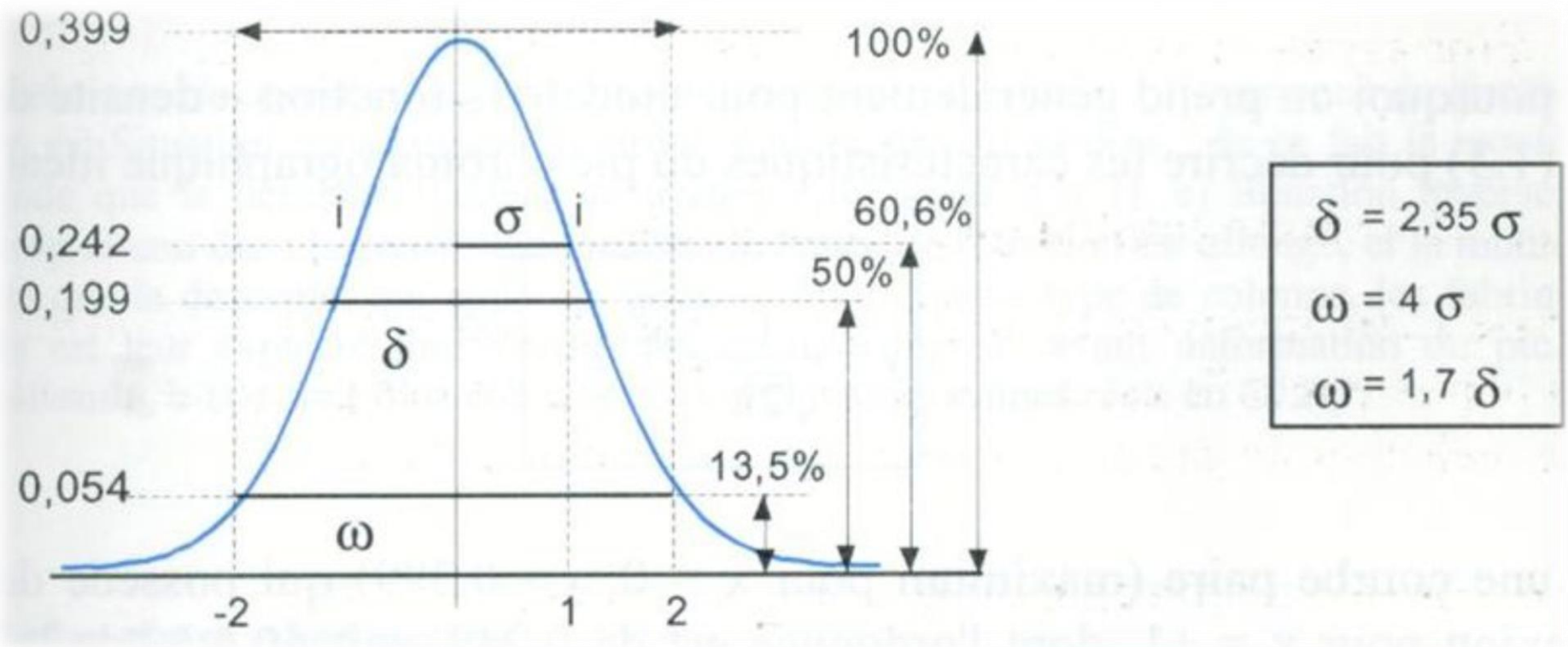
W_h: largeur du pic à mi-hauteur (δ)

Facteur de rétention ou facteur de capacité K $\mathbf{K = \frac{t_r'}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m}}$

Idéalement 1<k<10 pour les différents solutés d'un mélange

II-5-Grandeurs chromatographiques :

- Un pic d'élution idéal a le même aspect que la représentation graphique de la **courbe de Gauss**. En chromatographie **δ** désigne la **largeur à mi-hauteur (δ=2,35σ)** et **σ^2 la variance du pic**. La largeur du pic,**ω (ou W_b)**, est mesurée à **13,5%** de la hauteur, on a **ω=4σ**.

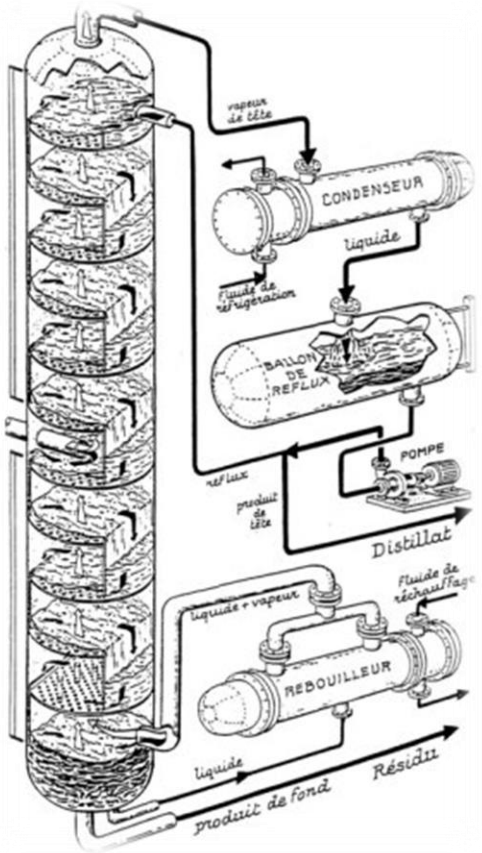


II-5-Grandeurs chromatographiques :

- Pour définir chaque composé et comparer les performances des analyses chromatographiques, on utilise divers paramètres en plus des temps de rétention t_R

- **1- Efficacité N** : correspond au nombre de plateaux théoriques de la colonne: $N = 16\,(t_R^2 / \omega^2) = 5{,}54\,(t_R^2 / \delta^2)$

  - Dans leurs études théoriques, les chimistes ***Martin*** et ***Synge*** traitent la colonne chromatographique comme si elle était constituée d'une série de plateaux semblables à ceux qui existent dans la distillation fractionnée du pétrole.



II-5-Grandeurs chromatographiques :

- **2- La hauteur équivalente à un plateau théorique H** : ou (HEPT) pour une colonne de longueur L, elle vaut $H = L / N$
- **3- Volume d'élution** : ou (de rétention) V_R; désigne le volume de phase mobile nécessaire pour faire migrer le soluté d'une extrémité à l'autre de la colonne.
- **4- Volume mort** : V_m; correspond au volume de phase mobile dans la colonne.
- **5- Volume de phase stationnaire** : V_S; volume occupé dans la colonne par la phase stationnaire.
- **6- Rapport de phase** : β ;rapport entre le volume mort de la colonne et le volume de phase stationnaire. Caractéristique essentielle de toute colonne: $\beta = V_m / V_s$
- **7- Facteur de rétention** : (ou de capacité) k, correspond au rapport de la quantité fixée (ms) sur la phase stationnaire et de celle restée dans la phase mobile (mm). Ce paramètre rend compte de la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir un soluté. Il correspond également au rapport des temps passés dans ces deux phases:

$$K = \frac{t_r'}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad \text{ou encore} \quad t_R = t_m(1+K)$$

II-5-Grandeurs chromatographiques :

- **8- Sélectivité α :** correspond au rapport des facteurs de rétention K; précise l'aptitude de la colonne à séparer deux composés. **α est toujours > 1**.

$$\alpha = \frac{K_{(2)}}{K_{(1)}} = \frac{t_{R(2)} - t_m}{t_{R(1)} - t_m}$$

- **9- Facteur de résolution R:** traduit la plus ou moins bonne séparation entre deux composés. On peut y accéder à partir du chromatogramme:

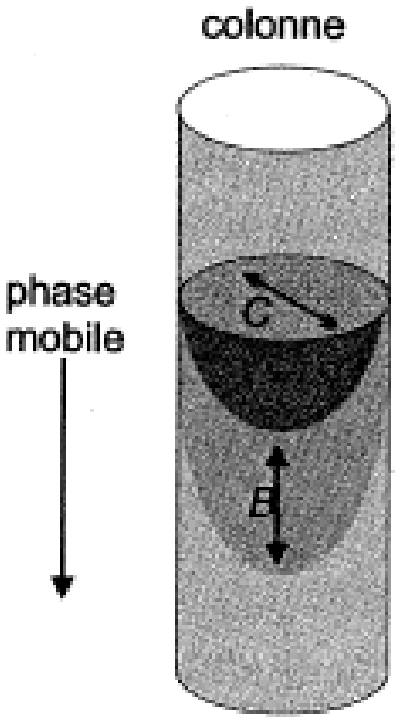
$$R = 2\,\frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2}$$

- Pour faire apparaitre les principaux facteurs qui influent sur le facteur de résolution on utilise souvent l'expression approchée suivante:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{k_2}{1 + k_2}\right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{a}\right)$$

II-6-Effet de la vitesse d'élution sur l'efficacité de la colonne; Equation de Van Deemter:

- L'éfficacité d'une colonne est directement liée aux nombres de plateaux théoriques; pour obtenir le nombre maximal de ce dernier **N** dans une colonne, il faut définir les conditions où la hauteur de plateau réduite **H** est minimale (**N = L / H**).
- Donc, il faut étudier les différents mécanismes d'élargissement d'un pic de soluté au cours de sa progression au sein d'une colonne chromatographique.
- On peut considérer que l'étalement d'un pic de soluté a trois origines :
  - ✓ **La dispersion des molécules par diffusion longitudinale.**
  - ✓ **L'existence de « chemins multiples » dus au remplissage.**
  - ✓ **La résistance au transfert de masse dans chacune des deux phases.**



- Le calcule de la variance correspondant à chacun de ces facteurs a été mis en évidence pour la première fois par **Van Deemter**:

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

II-6-Effet de la vitesse d'élution sur l'efficacité de la colonne; Equation de Van Deemter:

A : Coefficient de diffusion turbulente ou terme de remplissage

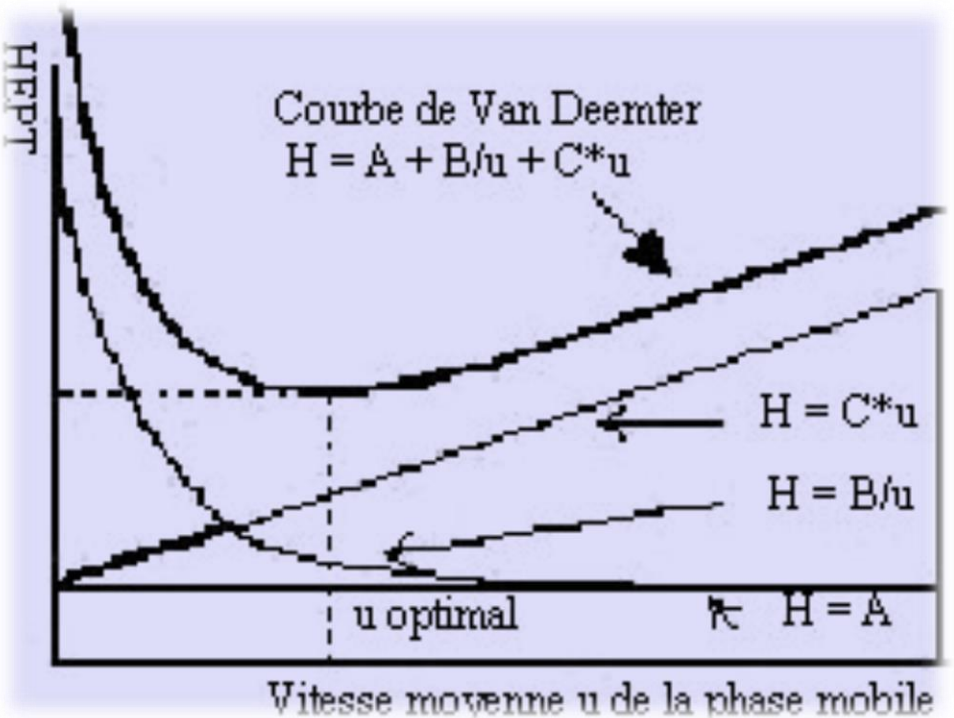
Chemins préférentiels par le soluté, dus à la granulométrie de la phase stationnaire (taille et répartition des particules) **A** est donc lié au diamètre des particules de la phase stationnaire et à la régularité du remplissage.

B : Coefficient de diffusion longitudinale

C'est la migration du soluté des régions les plus concentrées vers les régions plus diluées. Le coefficient de diffusion est plus important dans les gaz que dans les liquides

C : Coefficient de transfert de masse du soluté entre les deux phases.

U: est la vitesse moyenne de la phase mobile (cm/s)



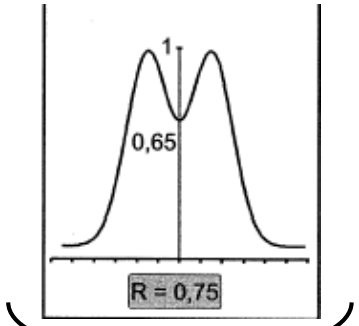
- **En conclusion:** les colonnes les plus efficaces sont celles régulièrement remplies et bien tassées où le diamètre des particules est le plus faible possible, avec un débit optimal de phase mobile.

II-7-Optimisation d'une analyse chromatographique:

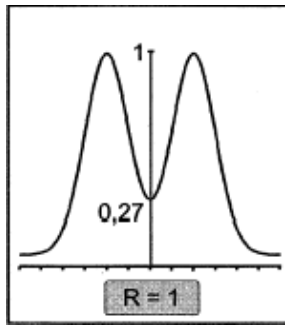
- Selon l'expression mathématique de la résolution mentionné précédemment $R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{k_2}{1+k_2}\right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{a}\right)$ cette dernière dépend des paramètres chromatographiques suivantes:

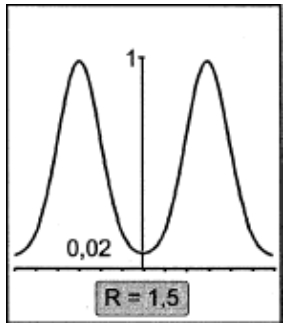
1. la racine carrée du nombre de plateaux théoriques $\sqrt{N}$
2. le facteur de rétention (ou de capacité) k'_2
3. le facteur de la sélectivité α

- Par conséquence, afin d'optimiser une analyse chromatographique et avoir des pics bien séparés, il faut d'abord optimiser ces trois facteurs



Chromatogramme avant optimisation





Chromatogramme après optimisation

II-7-Optimisation d'une analyse chromatographique:

1. la racine carrée du nombre de plateaux théoriques $\sqrt{N}$:

❖ pour obtenir un nombre maximal des plateaux théoriques dans une colonne **N**, il faut définir les conditions où la hauteur de plateau réduite **H** est minimale (**N = L / H**). Les méthodes permettant de minimiser H sont la diminution:

a. du diamètre des particules de la phase stationnaire.

b. du diamètre du support.

c. de la température (CPG).

2. le facteur de rétention (ou de capacité) k'_2

❖ La séparation peut souvent être améliorée de manière significative en modifiant le facteur de capacité k'_2. La résolution **R** augmente avec k'_2 dans les deux cas suivantes:

a. Diminution de la température dans le cas de la chromatographie en phase gazeuse CPG.

b. La modification de la composition de la phase mobile dans le cas de la chromatographie liquide.

II-7-Optimisation d'une analyse chromatographique:

3. le facteur de la sélectivité **α**:

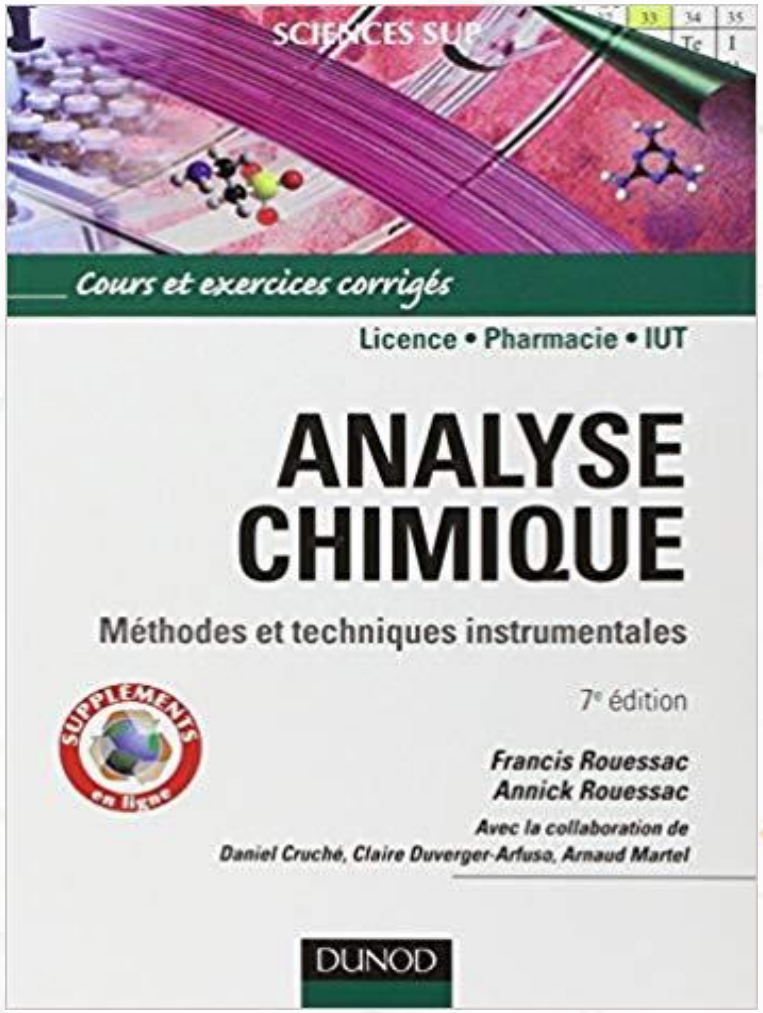
Inutile d'optimiser **N** et **k** si le facteur de sélectivité **α** égal 1, plusieurs options sont possibles afin d'augmenter **α** tout en conservant 1<**k**<10 :

a. modifier la phase mobile

b. modifier la température de la colonne

c. modifier la composition de la phase stationnaire

Références


SCIENCES SUP
Cours et exercices corrigés
Licence • Pharmacie • IUT
ANALYSE CHIMIQUE
Méthodes et techniques instrumentales
7e édition
SUPPLÉMENTS en ligne
Francis Rouessac
Annick Rouessac
Avec la collaboration de
Daniel Cruché, Claire Duverger-Arfuso, Arnaud Martel
DUNOD