

CHROMATOGRAPHIE GENERALITES

Introduction

1 Définitions

2 Classification

- 2.1 Suivant la nature des phases
- 2.2 Suivant le mécanisme d'échange
- 2.3 Suivant le procédé utilisé

3 Théorie de base de la chromatographie

- 3.1 Théorie des plateaux
- 3.2 Théorie cinétique

4 Chromatogramme – grandeurs caractéristiques

- 4.1 Grandeurs caractéristiques
- 4.2 Facteur de séparation ou de sélectivité α
- 4.3 Nombre de plateaux théoriques N \rightarrow Efficacité (largeurs des pics)
- 4.4 Résolution
- 4.5 Facteur d'asymétrie

5 Facteurs affectant la rétention

- 5.1 Polarité
- 5.2 Température
- 5.3 Débit

6 Optimisation en chromatographie

- 6.1 Influence de α sur R_s (K' et N cte)
- 6.2 Influence de k sur R_s
- 6.3 Influence de N sur R_s

7 Analyse quantitative

- 7.1 Etalonnage externe
- 7.2 Etalonnage interne

8 Domaines d'applications

Introduction

➤ Historique :

- 1903 : **Tswett** sépare des pigments végétaux (chlorophylles) sur une colonne remplie de CaCO_3 (phase stationnaire) + solvant (phase mobile)
- Observation → les composés se séparent en pls zones colorées parce qu'∃ des interactions ≠tes avec la PS(phase stationnaire) et la PM (phase mobile).

1 Définitions

• **chromatographie** =

- Techniques de séparation des constituants d'un mélange homogène qui est basée sur un processus de migration différentielle, où les analytes se répartissent en 2 phases, l'une mobile par rapport à l'autre (φ_s et φ_m).

• **Chromatogramme** =

- signal enregistré en fct° du volume d'élution

• **phase stationnaire(φ_s)** =

phase qui reste en place ds une colonne ou sur une plaque

• **phase mobile(φ_m) = éluant**

phase qui se déplace sur ou à travers la φ_s
elle entraîne les constituants à analyser

• **éluat** =

solution recueillit à la sortie de la colonne

la chromato permet l'identification et le dosage des substances

• **élution** =

processus au cours duquel on sépare les phases

2 Classification

2.1 Suivant la nature des phases

- chromatographie en phase liquide :

PM=liq PS=solide (LS)
 PS=liquide (LL)
 PS=résine échangeuse d'ion
 PS=Gel

- chromatographie en phase gazeuse :

PM=gaz PS =solide (GS)
 PS =liquide (GL)

2.2 Suivant le mécanisme d'échange

- Coefficient de distribution K_d du soluté entre φ_s et φ_m :

$$K_d = \frac{C_s}{C_m}$$

=conc du soluté ds φ_s /conc ds φ_m

c'est parce que les K_d sont \neq que les substances se séparent

- Chromatographie :

- d'absorption (L/S)
- de partage (L/L)
- d'échange d'ion
- d'appariement d'ion
- exclusion diffusion ou exclusion stérique

2.3 Suivant le procédé utilisé

- Selon la présentation de la PS :

- Colonne : CPG, HPLC,
- Planaire : φ_s de faible épaisseur, gde surface → papier ou couche mince (CCM)

- Selon les modalités de migration de la φ_m :

- chromatographie d'élution :

→ on poursuit l'élution jusqu'à ce que les solutés soient entraînés en dehors de la φ_s

- développement :

→ l'élution des substances est telle que les substances demeurent sur φ_s et sont localisées sur φ_s

3 Théorie de base de la chromatographie

Fig 5

3.1 Théorie des plateaux

- On assimile la colonne chromato à une colonne à distiller de longueur L
- Cette colonne est constituée de qlq plateaux fictifs appelés **plateaux théoriques**
- Une colonne est constituée de N plateaux théoriques (de même hauteur)
- La taille des plateaux, H, est appelée Hauteur équivalente à 1 plateau théorique (**HEPT**)

$$\text{HEPT} = L/N \quad (1)$$

- Chaque plateau contient 1/N^{ème} de la PM et de la PS
- Ds chaque plateau, il y aurait un **eq parfait Kd** vs [soluté] ds φ_s et φ_m

$$K_d = C_s/C_m$$

64 mg ds colonne	plateau 2	plateau 3	plateau 4
T1 → 32 ds φ_s	32 ds φ_m		
T2 →	16 ds φ_s	16 ds φ_m	
T3 →		8 ds φ_s	8 ds φ_m ...

→ pic de forme gaussienne

chaque plateau est un disque fictif ds lequel on considère qu'il y a eq entre φ_m et φ_s
au départ, le soluté se partage ds le 1^{er} plateau entre φ_s et φ_m en fct^o de Kd
au 2^{ème} eq, puisque la φ_m circule en continu, l'eq est rompu
 φ_m qui contenait le soluté descend vers 2^{ème} plateau, se fixe sur φ_s en respectant le partage de Kd

2 substances qui ont des Kd identiques, se répartissent différemment → **séparation**

à chaque étape correspond un nouvel eq
+ \exists d'eq } meilleure sera la séparation
+ \exists de plateau }

résultat → pic de forme gaussienne

cette théorie est insuffisante car :

elle ne tient pas compte de la vitesse φ_m/φ_s

3.2 Théorie cinétique

dispersion des pics ds la colonne

→ phéno de diffusion

dispersion fct^o de la vitesse de la φ_m

les pics s'établissent à mesure qu'ils descendent ds la colonne

Eq de **Van Deemter pour CPG**,

Étendue par **Knox** à la **CLHP**

$$\text{HEPT} = A + B/u + C*u \quad (\text{CPG}) \quad (2)$$

$$H_{EPT} = A \cdot v^{1/3} + B/v + C \cdot v \quad (\text{HPLC})$$

H : hauteur équivalente à 1 plateau théorique

$$H = L/N = \text{longueur de la colonne} / \text{nbre de plateau}$$

+ la colonne est effi, + \exists de plateau (N gd) + la hauteur H est faible

cette équation montre que l'étalement des pics est liée à l'écoulement de la ϕ_m

u : vitesse d'écoulement de $\phi_m = L/T_0$

A : terme de remplissage (diffusion turbulente)

Effet de chemin multiple (diffusion d'Eddy)

+ effet de diffusion latérale (dispersion de flux)

les ϕ_s étant constituées de grains irrégulier, le remplissage sera irrégulier

et les m^* peuvent emprunter des chemins \neq ts.

minimiser si particules de formes régulières et ayant ttes la même taille (rare)

diffusion latérale : les solutés vont d'un chemin de flux à l'autre

B : terme de diffusion longitudinale

$$= 2\gamma D_m$$

D_m : coefficient de diffusion de la m^* de soluté ds ϕ_m

Étalement des m^* de soluté ds la ϕ_m même si \exists pas d'influence externe

D_m est + importante en CPG qu'en CPL

γ : facteur de tortuosité lié à la granulométrie et à la régularité du remplissage

C : terme de transfert de masse

Inégalité de passage d'une m^* de soluté d'une phase ds l'autre

Grain de ϕ_s constitué de pores cntnt ϕ_m stagnante

Diffusion selon pénétration des m^* vitesse \neq tes

→ Ces termes A B et C expliquent que les pics soient + larges

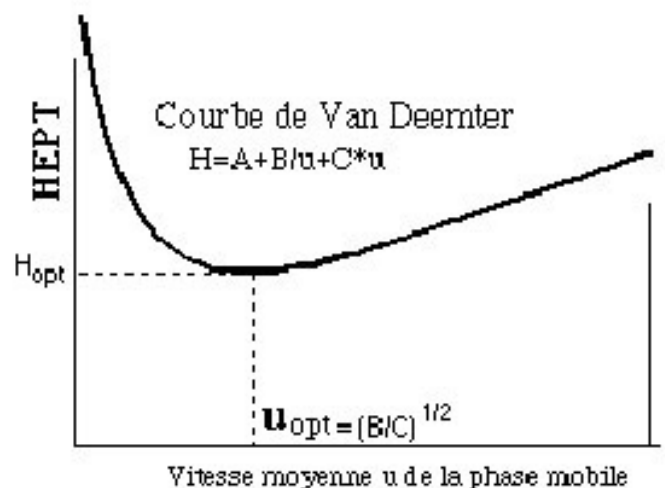
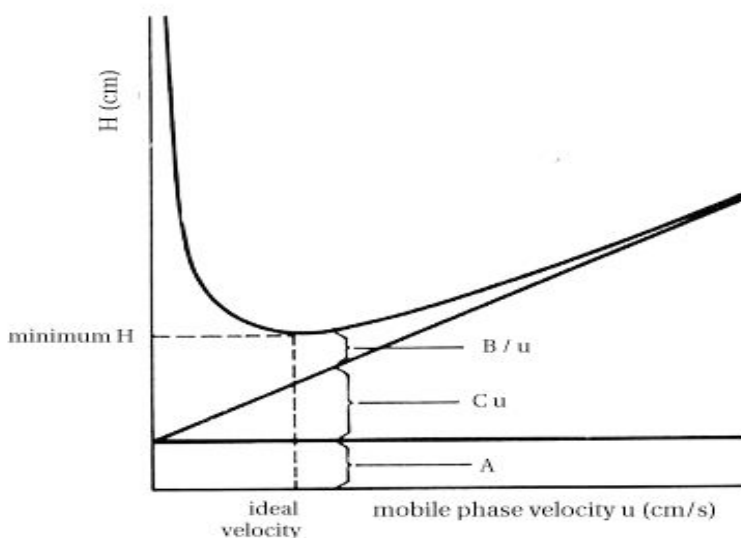
L'élargissement dpd de la vitesse de la ϕ_m

→ $H=f(u)$ représentation graphique → hyperbole

(dispersion)

si H élevé pic large – Au **minimum H**, l'efficacité de la colonne est maximale.

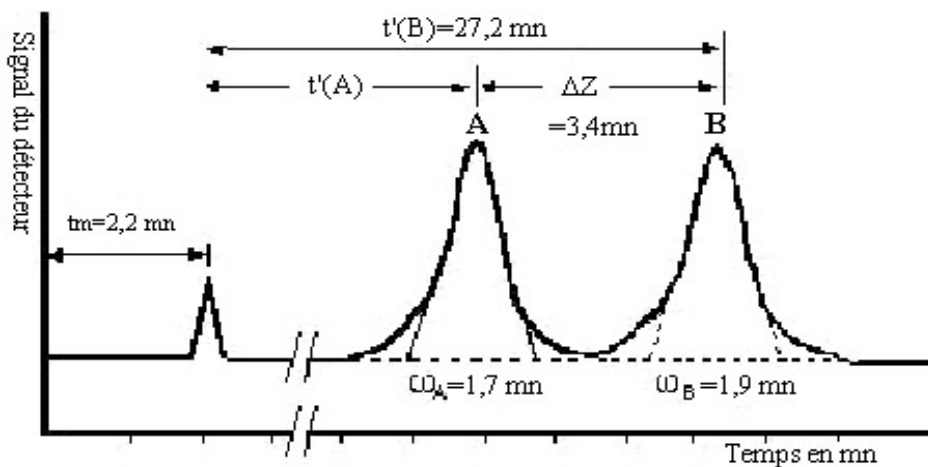
U_0 : débit pour lequel les pics sont les + étroits possible



4 Chromatogramme – grandeurs caractéristiques

Fig 3 & 4

- Si détecteur à la sortie de la colonne, on peut enregistrer le signal en fct^o du tps :
 - signaux =pics
 - l'ensemble=chromatogramme
- Les pics ont une forme, dans le cas idéal, **gaussienne** (4)
- La substance éluée est localisée ds une tranche faible de la colonne avec une valeur Y_0
 - 2 pts d'inflexion E et F
 situés à 60.7% de la hauteur du pic
 caractérisés par 2σ = distance entre E et F (écart type)
 largeur : $\delta = 2.35\sigma$
 largeur à la base: $\omega = 4\sigma$
- On caractérise un chromatogramme par certains paramètres impt :
 - T_0 = temps mort
 - T_r = temps de rétention
 - h = Hauteur du pic
 - ω = Largeur du pic (intersection des tangentes des pt d'inflexion et des abscisses)
 - δ = largeur du pic à mi-hauteur



4.1 Grandeurs caractéristiques

- Tr** tps de rétention
- Vr** volume de rétention
- K'** facteur de capacité, de rétention

T_r brut : tps écoulé depuis l'injection du composé ds la colonne et le max du pic chromatographique (min. ; sec. ; $10^{\text{ème}}$ de sec ; $100^{\text{ème}}$ de sec.)

- To** Tps mort = tps que mettrait un composé non retenu pour arriver au détecteur
- Tr'** tps de rétention corrigé ou réduit

Vr brut : volume de φ_m qu'il faut faire passer ds la colonne pour amener le pic à sa conc max ds le détecteur

K' : facteur de capacité, de rétention
 $K' = (Tr_1 - T_0) / T_0 = \text{tps de rétention réduit} / t_0$
 \leftrightarrow rapport molaire entre qité de soluté ds la φ_s et ds la φ_m
 \leftrightarrow tps passé par le soluté ds φ_s / tps ds φ_m

K' :

En CLHP doit être compris entre **1 et 10**
Dpd du couple φ_s/φ_m , de la T° (action sur la viscosité φ_m)
En CPG doit être compris entre **1 et 20**
dpd de la nature de la φ_s

K' ne dpd pas : de la **longueur de la colonne**
Du **débit de la φ_m**

4.2 Facteur de séparations ou de sélectivité α

mesure le **potentiel à séparer 2 composés**
(cela ne suffit pas pour savoir si séparation finale possible)

sélectivité de 1 à 2 :

$$\alpha_{1,2} = (Tr_2 - T_0) / (Tr_1 - T_0) = K'_2 / K'_1$$

lié à la séparation au sommet des 2 pics
+ les pics sont séparés, + α est gd

2 colonnes qui présentent la même sélectivité peuvent séparer différemment les mêmes produits (largeurs des pics \neq tes)

Sélectivité = paramètre très important qu'il faut ajuster au début de l'optimisation d'une méthode

Elle dépend :

En CLHP du **couple φ_s/φ_m**
En CPG de φ_s et de **T° du four**, φ_m a un rôle passif

Elle ne dpd pas de la **granulométrie ni du débit de la φ_m**

4.3 Nombre de plateaux théoriques N \rightarrow Efficacité (largeurs des pics)

mesure de la **dispersion du pic**
colonne efficace si pics étroits

nbre de plateaux théoriques : $N = 16(T_r/\omega)^2 = 5.54(T_r/\delta)$

N varie en fct $^\circ$ de la méthode

ω = largeur du pic à la base, obtenue par extrapolation des tangentes aux points d'inflexion

δ = largeur du pic à mi-hauteur

\rightarrow + un pic est étroit, + ω et δ sont faibles, + le nbre de plateau théorique N est important

- N dépend :
 - de la longueur de la colonne
 - de la granulométrie → plus les grains sont petits, + la perte de charge est impt
 - de l'épaisseur du film de ϕ_s
 - film sur paroi ou sur support
 - si film épais, le partage est + lent, les échanges sont + lents, les pics sont + larges
 - de la T° (CPG) et de la viscosité du solvant (CLHP)
 - du débit de gaz vecteur (voir de la courbe de Van Deemter)
 - du type de composé

4.4 Résolution

$$R_s = \frac{2(\text{Tr}_2 - \text{Tr}_1)}{(\omega_1 + \omega_2)} = 1.18 (\text{Tr}_2 - \text{Tr}_1) / (\delta_1 + \delta_2) = \frac{1}{4} \left[\frac{\alpha - 1/\alpha}{1 + K'^2} \right] \times \sqrt{N_2}$$

Mesure de la **qualité de la séparation**
 Rs doit être > 1,5 pour que 2 cp soit séparés.

$$R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right) \sqrt{N_B}$$

4.5 Facteur d'asymétrie

$A_s = Y/X$ ou facteur de traînée

On mesure à 10% du pic le rapport des distances Y/X

À 0.05% on mesure $A_s = \omega/2f$

Qd mesure parfaite $\omega = 2f \rightarrow A_s = 1$

5 Facteurs affectant la rétention

En CPG : un composé est retenu qd interaction à φ_s
 En CLHP : interaction soluté / φ_s ; soluté / φ_m ; φ_s/φ_m
 La rétention dpd : polarité, T° , débit

5.1 Polarité

=capacité de donner \neq tes actions =résultante de \neq tes interactions

➤ Interactions :

- Forces coulombiennes :
interactions électrostatiques qui interviennent pour force ionisées
- Interaction entre dipôle permanent et dipôle induit
atomes ou ion chargé qd approche autre m^* → induit formation d'un dipôle
- Force de dispersion ou de London
présentes ds ttes les m^*
attraction entre 2 dipôles instantanée

ds ttes les m^* \exists mvmts des e- autour du noyau → responsable des interactions hydrophobes (apolaires)

énergies des liaisons	Kj/mol
dispersion	5 à 20
dipôle permanent /dipôle induit	8 à 25
dipôle permanent/dipôle permanent(LH)	25 à 40
liaisons ioniques	250 à 1050

ces forces sont très solides

une m^* polaire attire tjrs 1 m^* polaire ,
 une m^* apolaire attire une m^* polaire ou moyennement polaire

important : une polarité idq peut faire intervenir des forces d'interaction \neq tes → possibilité de séparation

5.2 Température

affecte les équilibres

K_d est fct° de T°

Rôle + important en CPG qu'en CLHP

Si $T^\circ \uparrow$, $Tr \downarrow$

5.3 Débit (P°)

$Tr \downarrow$ qd débit \uparrow

6 Optimisation en chromatographie

Optimiser = avoir la résolution que l'on souhaite avec un tps min d'analyse

$$R_s = \frac{1}{4} \left[\alpha - \frac{1}{\alpha} \right] \left[\frac{K'^2}{1+K'^2} \right] \times \sqrt{N_2}$$

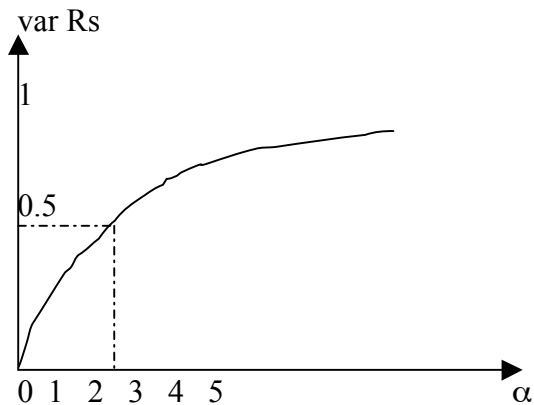
La résolution est fct° de

- α (sélectivité)
- 2 : le plateau le + retenu
- il faut une sélectivité min pour qu'il y ait résolution
- N_2 (largeur des pics)

6.1 Influence de α sur R_s (K' et N cte)

$\alpha = K'^2 / K'^1$ variation de R_s avec $\alpha - 1/\alpha$

1	0	
1.1	0.09	
1.2	0.16	
1.5	0.33) (x3.5)
2.0	0.50	
2.4	0.58	
3.0	0.66) variation bcp - gde
4.0	0.75	
5.0	0.80	
6.0	0.83	



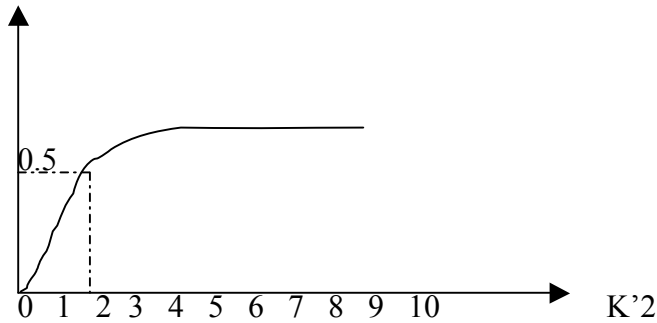
α est un paramètre très important qu'il faut ajuster au début de l'optimisation d'une méthode

6.2 Influence de K' sur R_s (avec α et N cte)

K'^2	variation de R_s avec $K'^2 / (1+K'^2)$
0	0
0.1	0.09
0.2	0.16

0.3	0.23
0.5	0.33
1.0	0.50
2.0	0.67
3.0	0.75
4.0	0.83
10.0	0.90

var Rs



Qd K'² dble au début Rs ↑ moins rapidement qu'avec α

6.3 Influence de N sur Rs (avec α et K' cte)

Rs varie avec \sqrt{N}

Si la longueur de la colonne est x2 → N=x2, Rs= x1.4 ($\sqrt{2}$), tandis que Tr=x2

7 Analyse quantitative (+exo)

Comparaison aires (ou hauteurs) des pics de l'ech inconnu / gamme étalon de l'analyte

7.1 Etalonnage externe

Gamme d'étalonnage (5 conc min)

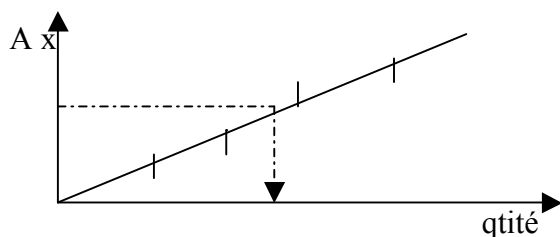


5 injections successives

mesure cuve de l'analyte

trace dte d'étalonnage

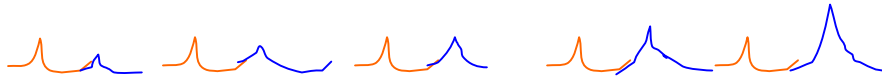
cuve=f(qtité) ou f(c)



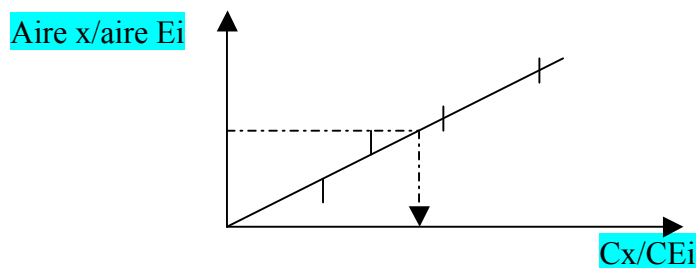
$$qtité = (c) \times v$$

mesure de l'aire analyte ds l'ech
satisfaisant si volume injecté très répétable ,sinon étalonnage interne

7.2 Etalonnage interne



mesure des aires analytes et E_i ds étalon ;
calcul du rapport des aires analyte/ E_i
tracé de la dte



Mesure des aires analytes et E_i ds l'ech : rapport des aires

→ permet de s'affranchir des **variations de volumes injectés**
surtout ut en CPG car vol injectés (à la seringue) faibles (de 1 à 5 μL)
vs CLHP 20 μl

en électrophorèse capillaire ,les volumes injectés sont de 2 à 20 μL

ut en CLHP qd travaille avec matrice complexe

→ permet aussi de tenir compte des **pertes à l'extraction** ds les ech complexes à analyser

ds un ech bio , le labo de \$ organique va prendre un prod de la **même famille chimique**
que l'analyte.

7.3 Méthodes des ajouts dosés

(voir spectro UV)

NB : analyse qualitative via le tr pour les échantillons simples (sinon via détecteur UV,
SM...)

8 Domaines d'applications

➤ CPG :

- applicable aux substances volatiles ou volatilissables par élévation de T°
- non applicable aux substances ioniques ou de MM>300 car non volatiles
- non applicable aux substances thermolabiles
- mais existence d'un détecteur universel de fble coût (ionisation de flamme)

➤ CLHP :

- ts types de substances (ioniques ou non ,thermolabiles ou non PM)
- cdt° minimum : composé soluble ds PM
- manque détecteur universel de fble coût (∃ spectromètre de masse mais coûteux)