

Grandeurs chromatographiques

2.1 Rapport de distribution K du soluté

(rappel: soluté= corps minoritaire dans un solvant; corps simple = entité moléculaire formée d'atomes identiques: ex. O_2 ; corps composé = entité moléculaire formée d'atomes différents: H_2O ; corps pur = corps formé d'entités moléculaires identiques).

Les séparations chromatographique. sont basées sur la répartition des solutés dans deux phases: soluté A (phase mobile) \leftrightarrow soluté A (phase stationnaire) . La constante d' équilibre de cette réaction est appelée: rapport de distribution K . K est égal au

rapport des concentrations du soluté A dans les deux phases: $K_A = [A]_{stat} / [A]_{mob}$

$[A]_{stat}$ = concentration en mol.L⁻¹ du soluté dans la phase stationnaire = $[A]_S$ ou $[A]_{org}$
conc. dans la phase organique greffée sur un support. $[A]_{mob}$ = ... phase mobile = $[A]_M$

2.2 Thermodynamique de la chromatographie

Les relations de la thermodynamique s'appliquent aux équilibres de distribution.

soluté A (phase mobile) \leftrightarrow soluté A (phase stationnaire)

$$K_A = [A]_{\text{stat}} / [A]_{\text{mob}}$$

$$\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln K$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

de la valeur de K on déduit ΔG° , ΔH° et $T\Delta S^\circ$

Les trois fonctions sont < 0 . La réaction est spontanée.

$\Delta S^\circ < 0$: l'entropie diminue quand le constituant quitte la phase mobile pour se fixer sur la phase stationnaire.

$$\text{Equation de van't Hoff: } d\ln K / dT = \Delta H^\circ / RT^2$$

permet de calculer l'effet de la température sur le temps de rétention.

2.3 Temps de rétention du soluté

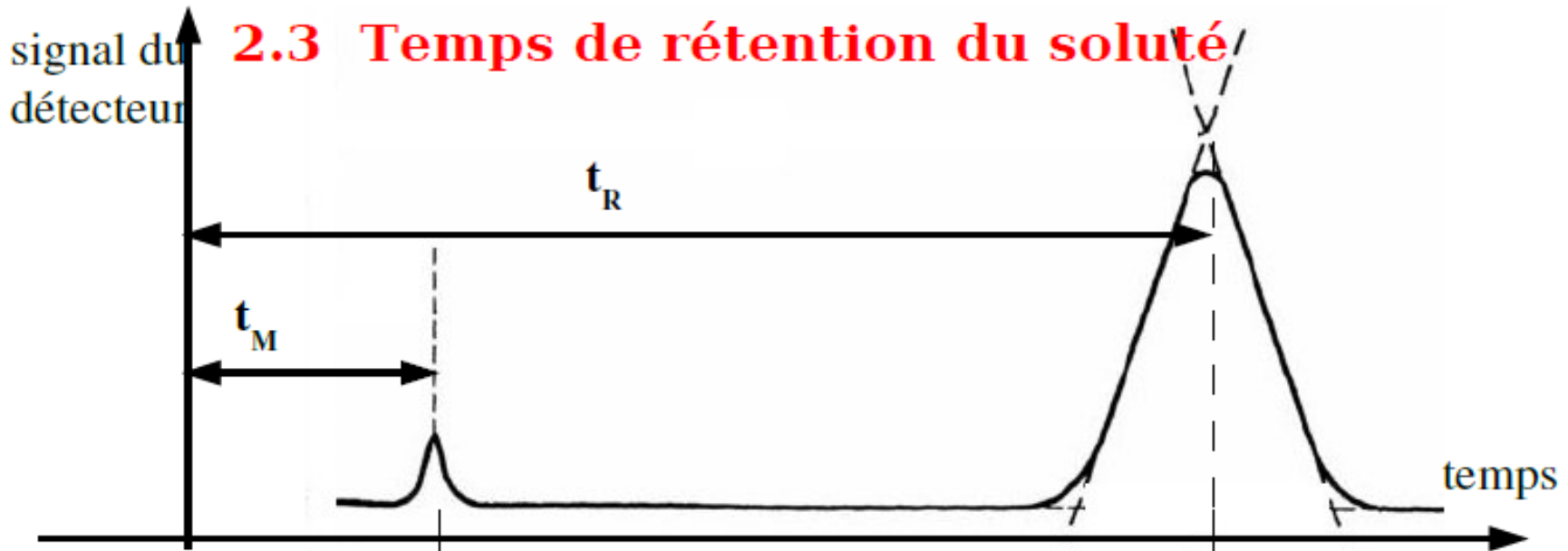


Fig. Courbe d'élution ou Chromatogramme d'un mélange à 2 constituants

Le pic de gauche correspond au soluté qui n'est pas retenu par la phase stationnaire et qui atteint le détecteur à la même vitesse que celle de l'éluant. Son temps de rétention t_M est le temps nécessaire pour qu'une molécule de la phase mobile traverse la colonne. $t_M = \text{temps mort} = t_0 = \text{temps nécessaire pour que le pic d'un constituant non retenu par la PS apparaisse (retention time of an unrestrained peak or solvent front)}$.

$t_R = \text{temps de rétention d'un constituant retenu par la PS (retained peak)}$

$= \text{temps écoulé entre l'injection et le moment où le constituant sort de la colonne}$

- $t'_R = t_R - t_M =$ **temps de rétention réduit ou corrigé** (adjusted retention time)
 $v = L / t_R =$ vitesse moyenne de déplacement du soluté (L=longueur de la colonne)
 $u = L / t_M =$ vitesse moyenne des molécules de la phase mobile (cm.s^{-1}).
 $v = u.f$ (fraction de temps passé par le soluté dans la phase mobile)
- $V_M = V_0 =$ **volume de la PM** dans la col. = vol. interstitiel accessible (=vol. mort).

Il est mesuré par introduction d'un soluté non retenu par la PS.

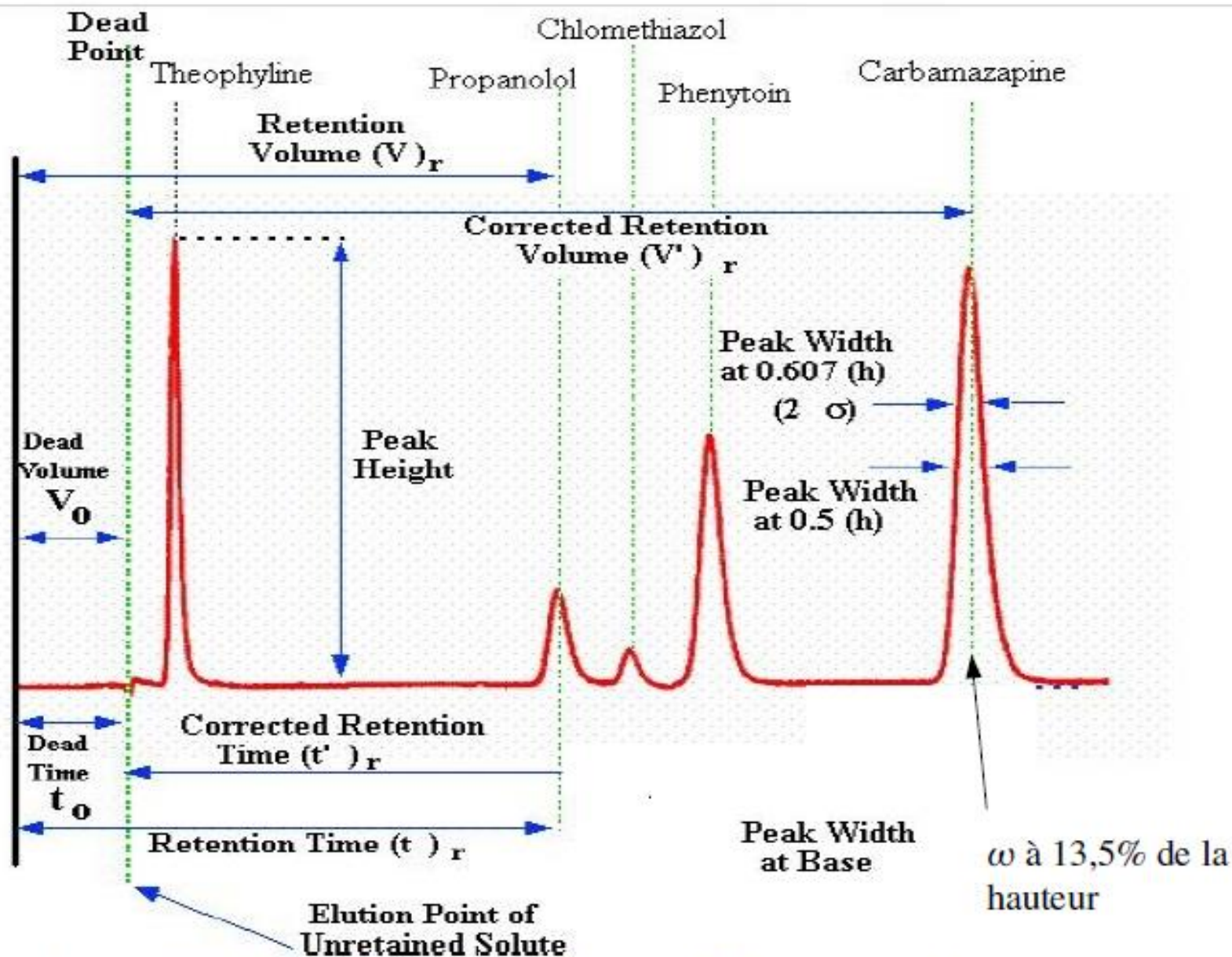
$$V_M = t_M \cdot D \quad D \text{ est le débit de la phase mobile (flow rate)}$$

c'est un volume par unité de temps: $\text{cm}^3.\text{s}^{-1}$ ou mL.s^{-1}

$$u = D / S \quad (S = \text{section de la colonne}) \quad (\text{cm}^3.\text{s}^{-1}/\text{cm}^2).$$

- $V_S =$ **volume de la PS** = **V (colonne vide)** - V_M
- $V_R =$ **volume d'élution ou de rétention du soluté** = volume de la PM nécessaire pour entraîner le soluté jusqu'à la sortie de la colonne = V (P.M.) qui s'est écoulé entre le moment de l'injection et celui correspondant au sommet du pic. $V_R = t_R \cdot D$
- $V'_R = V_R - V_0 =$ **volume de rétention réduit du soluté** (adjusted retention volume)

Rem. définition du **débit**: quantité d'une grandeur, ici le volume, par unité de temps.
 débit d'information = quantité d'information transmise par unité de temps: baud=bit.s⁻¹



D'après PRW Scott, Principle and Practice of Chromatography on-line textbook
<http://www.chromatography-online.org/Principles/Nomenclature/rs11.html>

2.4 Facteur de rétention

Un composé de masse m_T se répartit en m_M dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire. Si les conditions opératoires ne changent pas, m_M et m_S restent constantes au cours de la migration dans la colonne. Leur rapport est indépendant de m_T . Il est appelé facteur de rétention (recommandé par UICPA) plutôt que facteur de capacité. Ce n'est pas une constante.

$$k'_A = m_S / m_M = C_S \cdot V_S / C_M \cdot V_M = K_A \cdot V_S / V_M$$

$$\text{avec le rapport de phase } \beta = V_M / V_S : \quad K_A = \beta \cdot k'_A$$

Si $K = 0$, le soluté migre aussi vite que le solvant; si $K = \infty$ le soluté reste sur la colonne.

On démontre: $k'_A = (t_R - t_M) / t_M = t'_R / t_M$ (donc $K_A = \beta \cdot t'_R / t_M$)

rem. $(2t_M - t_M) / t_M = 1$ donc si $t_R < 2t_M$ alors $k'_A < 1$; élution très rapide, difficile à étudier.
si $k'_A > 20$ ou 30 ; durée d'élution très longue.

En HPLC, la séparation est optimale pour $2 < k' < 10$ afin que le temps de passage des constituants ne soit pas trop long; $k'=5$ =valeur "idéale".

Le facteur de rétention exprime mathématiquement la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque constituant.

2.5 Facteur de sélectivité ou de séparation

$$\alpha = K_B / K_A$$

α = rapport de distribution du constituant B le plus retenu sur le rapport de distribution du constituant A le moins retenu (1er pic).

$$K_B = [B]_S / [B]_M \quad \text{et}$$

α est toujours > 1

$$k'_A = K_A \cdot V_S / V_M \quad k'_B = K_B \cdot V_S / V_M \quad \text{donc: } K_B / K_A = k'_B / k'_A \quad \text{et}$$

$$\alpha = k'_B / k'_A$$

$$\alpha = [(t_R(B) - t_M) / t_M] \cdot [t_M / (t_R(A) - t_M)]$$

$$\alpha = t'_R(B) / t'_R(A)$$

Le facteur de sélectivité exprime la position relative de 2 pics sur le chromatogramme.

$$\text{pour le soluté A: } K_A = [A]_S / [A]_M \quad \text{et} \quad \Delta G_A^\circ = -RT \cdot \ln K_A$$

enthalpie libre de dissolution du soluté A dans la phase stationnaire

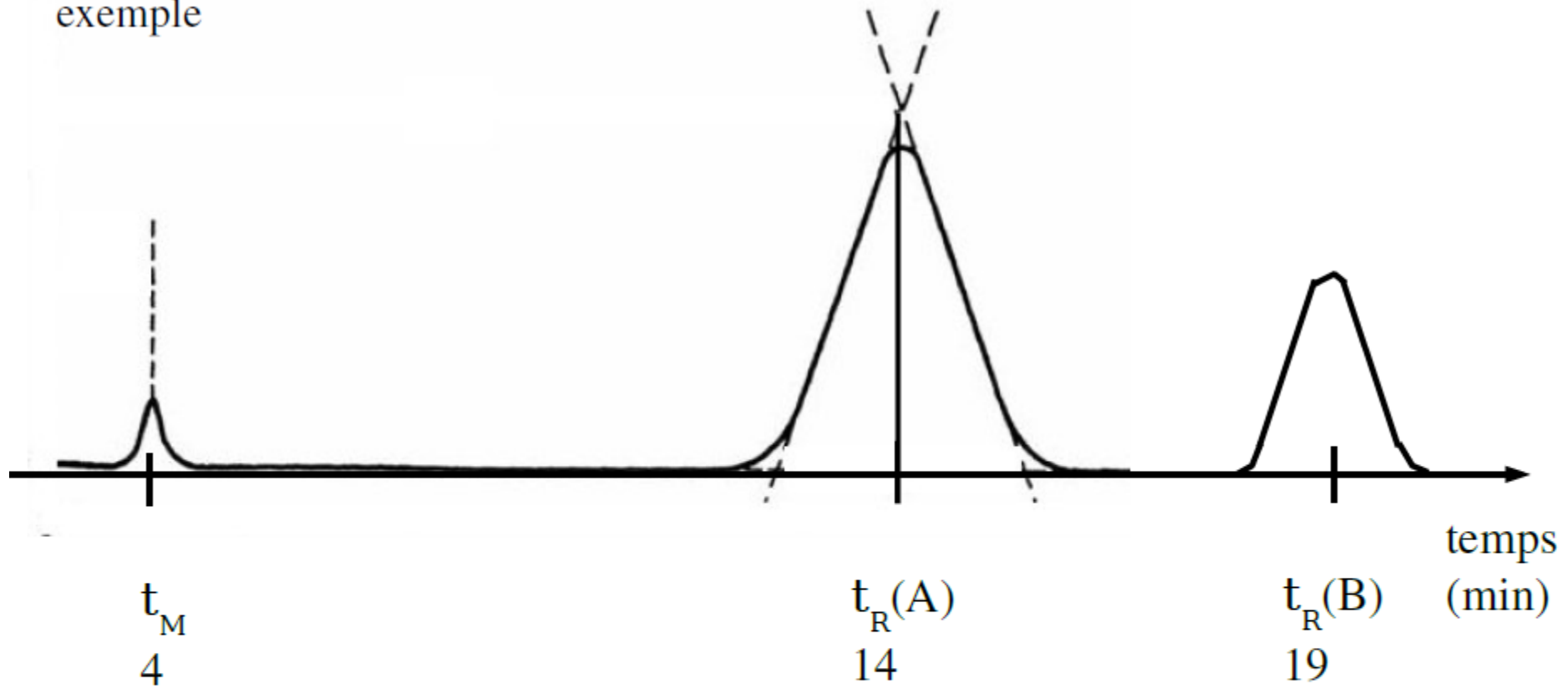
$$\text{pour le soluté B: } K_B = [B]_S / [B]_M \quad \text{et} \quad \Delta G_B^\circ = -RT \cdot \ln K_B$$

$$\Delta G_B^\circ - \Delta G_A^\circ = -RT \cdot (\ln K_B - \ln K_A) = -RT \cdot (\ln K_B / K_A) = -RT \cdot \ln \alpha$$

$$\Delta G_B^\circ - \Delta G_A^\circ = -RT \cdot \ln \alpha$$

$$\alpha = K_B / K_A \quad \alpha = \exp (\Delta G_A^\circ - \Delta G_B^\circ) / RT$$

exemple



facteur de rétention: $k'_A = (t_R - t_M) / t_M = t'_R / t_M = 10/4 = 2,5$
 $k'_B = 15/4 = 3,75$

facteur de sélectivité ou de séparation: $\alpha = t'_R(B) / t'_R(A) = 3,75 / 2,5 = 1,5$

2.6 Courbe de Gauss

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 :

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

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

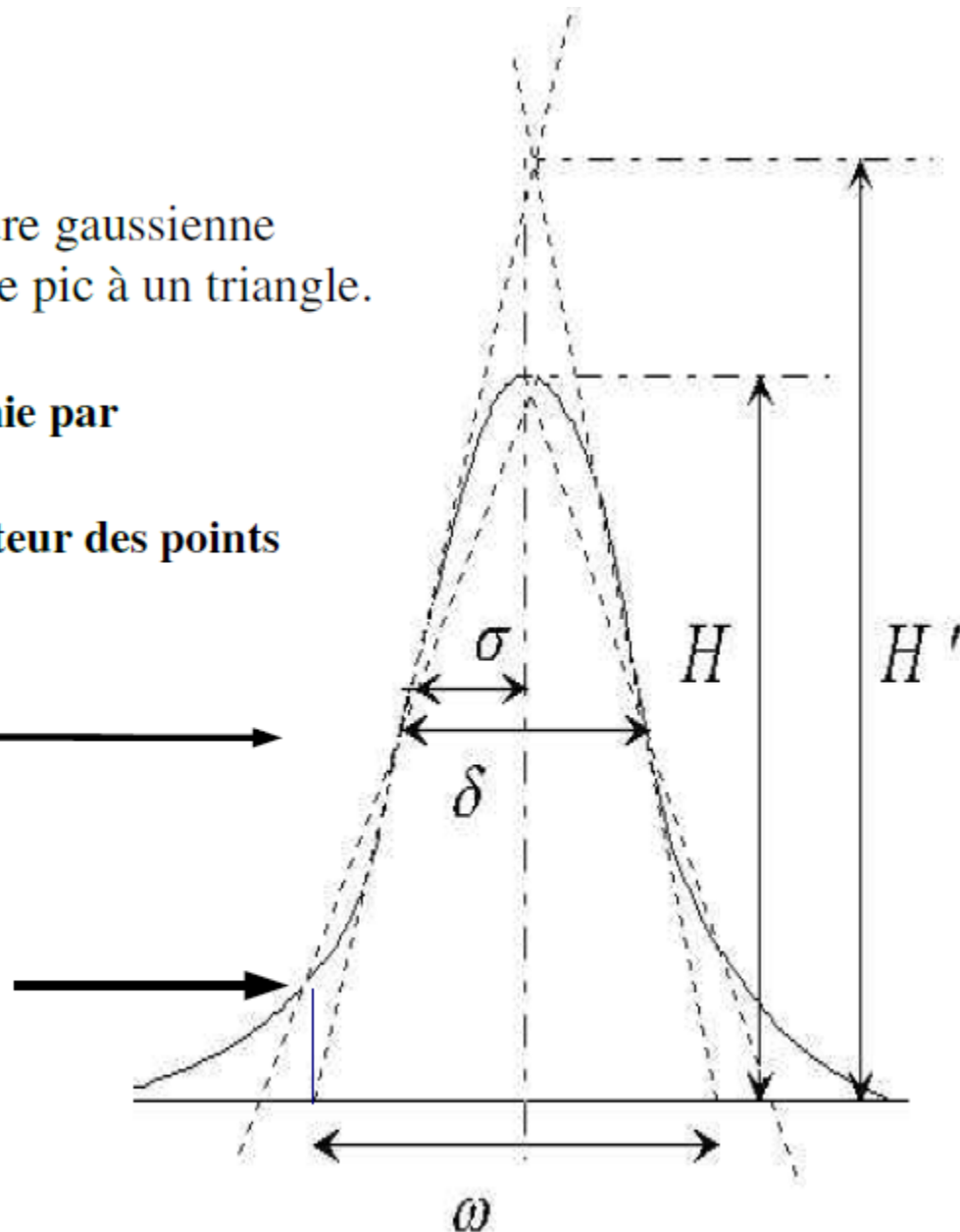


Fig. Courbe de Gauss

du site: http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/CHIM/Jumber/Chromato/Chromato_gen.htm

2.7 Résolution des pics

La résolution est la grandeur qui caractérise l'aptitude d'un système chromatographique (colonne, solutés, solvants) à séparer 2 solutés. Le but de la chromatographie est d'obtenir la meilleure résolution dans le temps le plus court.

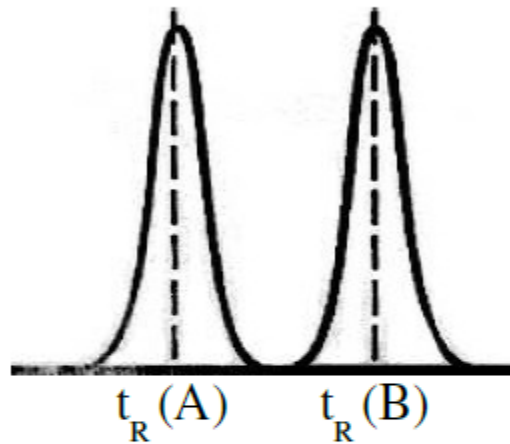


Fig. Séparation de 2 pics adjacents
Les pics sont résolus pour $R = 1,5$

Facteur de résolution: $R = 2 [t_R(B) - t_R(A)] / [\omega(B) + \omega(A)]$

Effet des facteurs de sélectivité et de rétention sur la résolution:

$$R = \underbrace{[(N^{1/2} / 4)]}_{\text{efficacité}} \cdot \underbrace{[(\alpha - 1) / \alpha]}_{\text{sélectivité}} \cdot \underbrace{[k'_B / (1 + k'_B)]}_{\text{rétention}} \quad (1)$$

Effet de R sur le temps de rétention: $t_R(B) = (16R^2H/u) \cdot [\alpha / (\alpha - 1)]^2 \cdot [(1 + k'_B)^3 / k'_B{}^2]$ (2)

on déduit: $R_1 / R_2 = (N_1 / N_2)^{1/2}$ et $t_{R1}(B) / t_{R2}(B) = R_1^2 / R_2^2$

Une bonne séparation est un compromis entre une résolution suffisante des pics et un temps de séparation raisonnable.

III. Efficacité d'une colonne

III.1. Modèle des plateaux (cf distillation fractionné)

Approche ancienne mais toujours utilisée : le phénomène de migration qui est en réalité dynamique et continu est considéré comme une suite d'étapes distinctes (équilibres successifs). On considère alors qu'une colonne de longueur utile L est composée de N petits disques fictifs superposés (plateaux théoriques) de même hauteur H.

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

L : longueur utile de la colonne

N : nombre de plateaux théoriques : 100 - 106

H : hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) : 1 cm - 10 μm

$$H = \frac{L\omega^2}{16t_R^2}$$

Une colonne sera d'autant plus efficace que N est grand (L grand) et H est petit.

On peut montrer que :

$$H = \frac{\sigma^2}{1}$$

$$\sigma = \frac{L\omega}{4t_R}$$

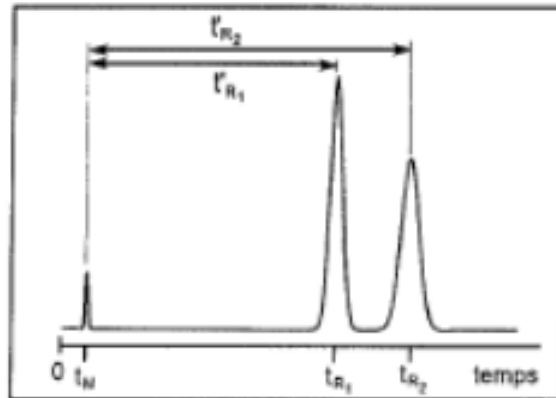
Donc

$$H = \frac{L\omega^2}{16t_R^2}$$

et $N = 16(t_R/\omega)^2$ ou

$$N = 5,545 (t_R/\delta)^2$$

III.2. Facteur de séparation entre deux solutés (facteur de sélectivité)

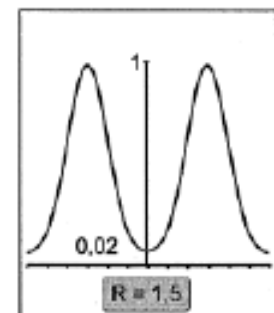
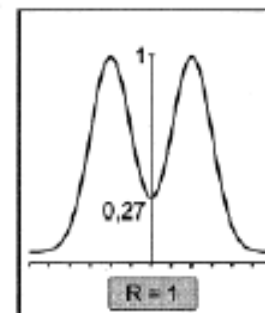
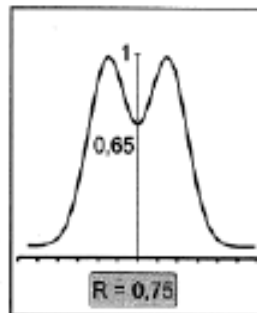


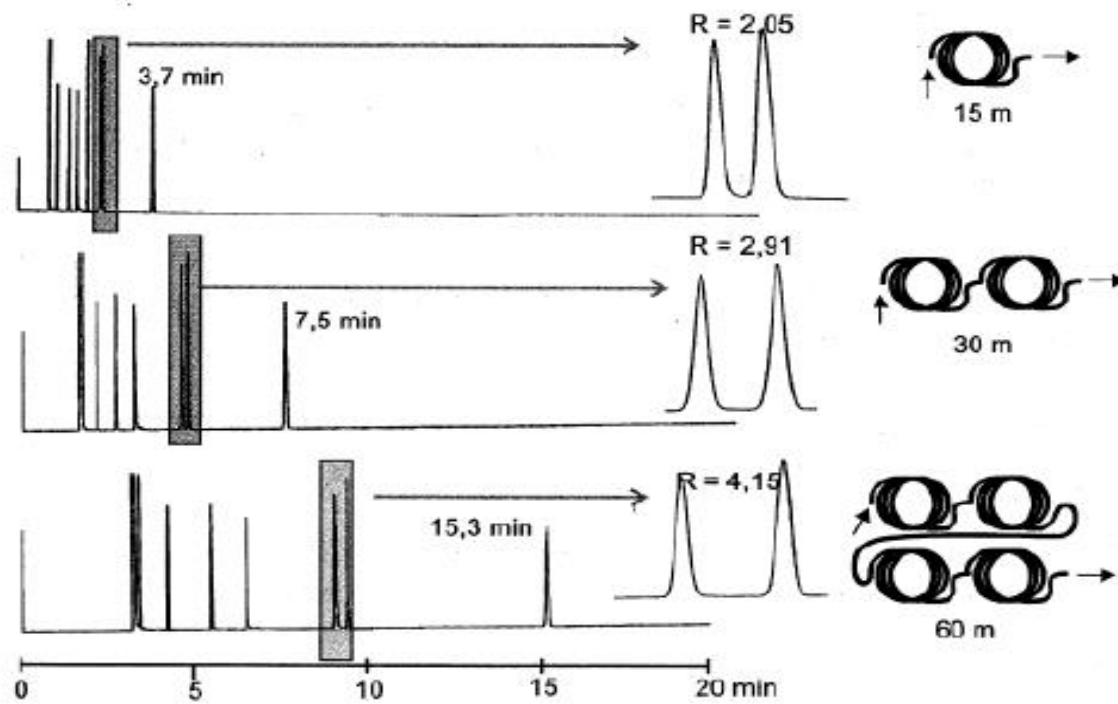
$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

III.3. Facteur de résolution

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

On peut montrer que R est $\propto \sqrt{N}$, dépend aussi de k et α





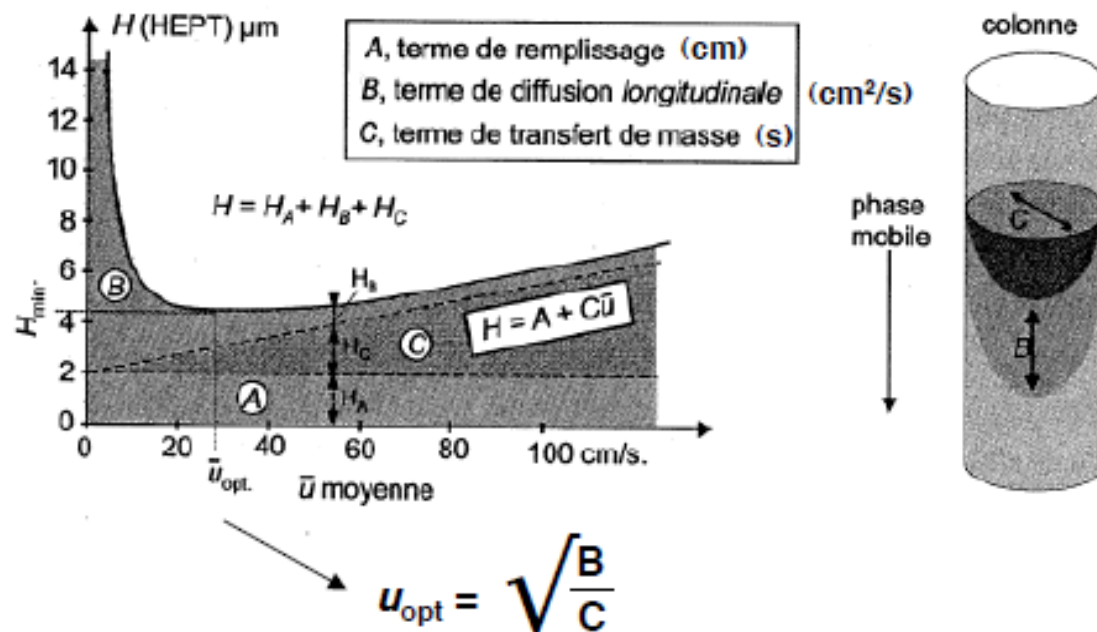
III.4. Effet de la vitesse d'élution sur l'efficacité de la colonne

Mis en évidence par **Van Deemter** → équation simplifiée :

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

u : vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile (cm/s)

Allure de la courbe de Van Deemter en CPG :



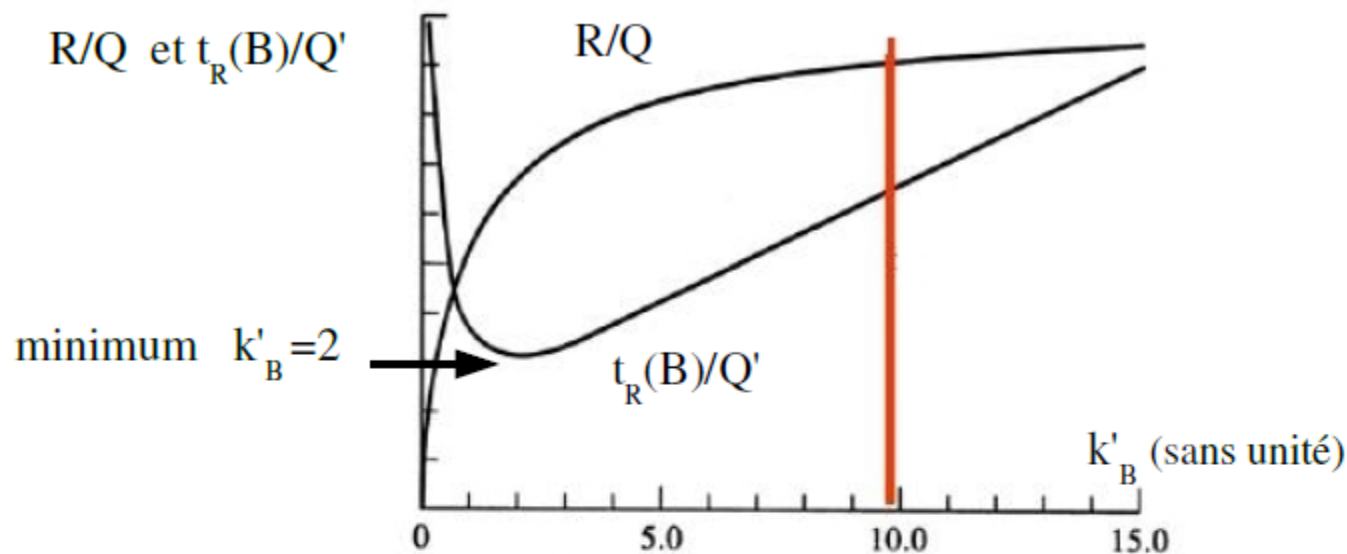


Fig. Effet du facteur de rétention k'_B sur le facteur de résolution R et sur le temps de rétention $t_R(B)$

Les équations 1 et 2 précédentes peuvent être réarrangées:

$$R = Q \cdot k'_B / (1 + k'_B) \quad \text{et} \quad t_R(B) = Q' (1 + k'_B)^3 / k'_B^2$$

Les courbes ont été tracées avec Q et Q' cts. C'est l'influence de k' qui est évaluée indépendamment des autres termes. Il faut remarquer toutefois que Q' varie avec R .

Rem. Les valeurs de $k'_B > 10$ correspondent à une faible augmentation de la résolution pour un temps de séparation plus long. Il vaut mieux les éviter. Les séparations sont optimales en général pour $2 < k'_B < 10$. En CPL, k' peut varier avec une modification de la composition du mélange de solvants (en CPG avec la température).

Hauteur équivalente à un plateau théorique, définie par: $H \text{ (cm)} = \frac{\sigma_L^2}{L} = \text{HEPT}$
Nombre de plateaux théoriques = L / H donc $N = L^2 / \sigma_L^2$

t_R et σ sont dans le même rapport que L et σ_L :

$$N = t_R^2 / \sigma^2 = t_R^2 / (\omega/4)^2 = 16 t_R^2 / \omega^2 = 5,54. t_R^2 / \delta^2$$

Nombre de plateaux théoriques effectifs, ou efficacité réelle: $N_{\text{eff}} = t_R'^2 / \sigma^2$

Ce nombre correspond au nombre d'équilibres successifs qu'a rencontré un soluté.

+ N grand, + la **colonne est efficace** et + le pic est fin.

N est une grandeur caractéristique d'un système chromatographique. Il peut être \uparrow en réduisant le débit de la PM, mais t_R est aussi \uparrow .

Hauteur de plateau effectif: $H_{\text{eff}} = L / N_{\text{eff}}$

Hauteur de plateau réduite: $h = H/d_p = L/(N.d_p)$

d_p = diamètre moyen des particules sphériques des colonnes;

des colonnes ayant même L/d_p ont des efficacités ou performances semblables.

Le nombre de plateaux théoriques exprime l'efficacité de la colonne.

tableau: HEPT pour chromato CPG et CPL (master chimie-Paris Sud)

The effect of mobile phase solvent strength in reversed phase HPLC

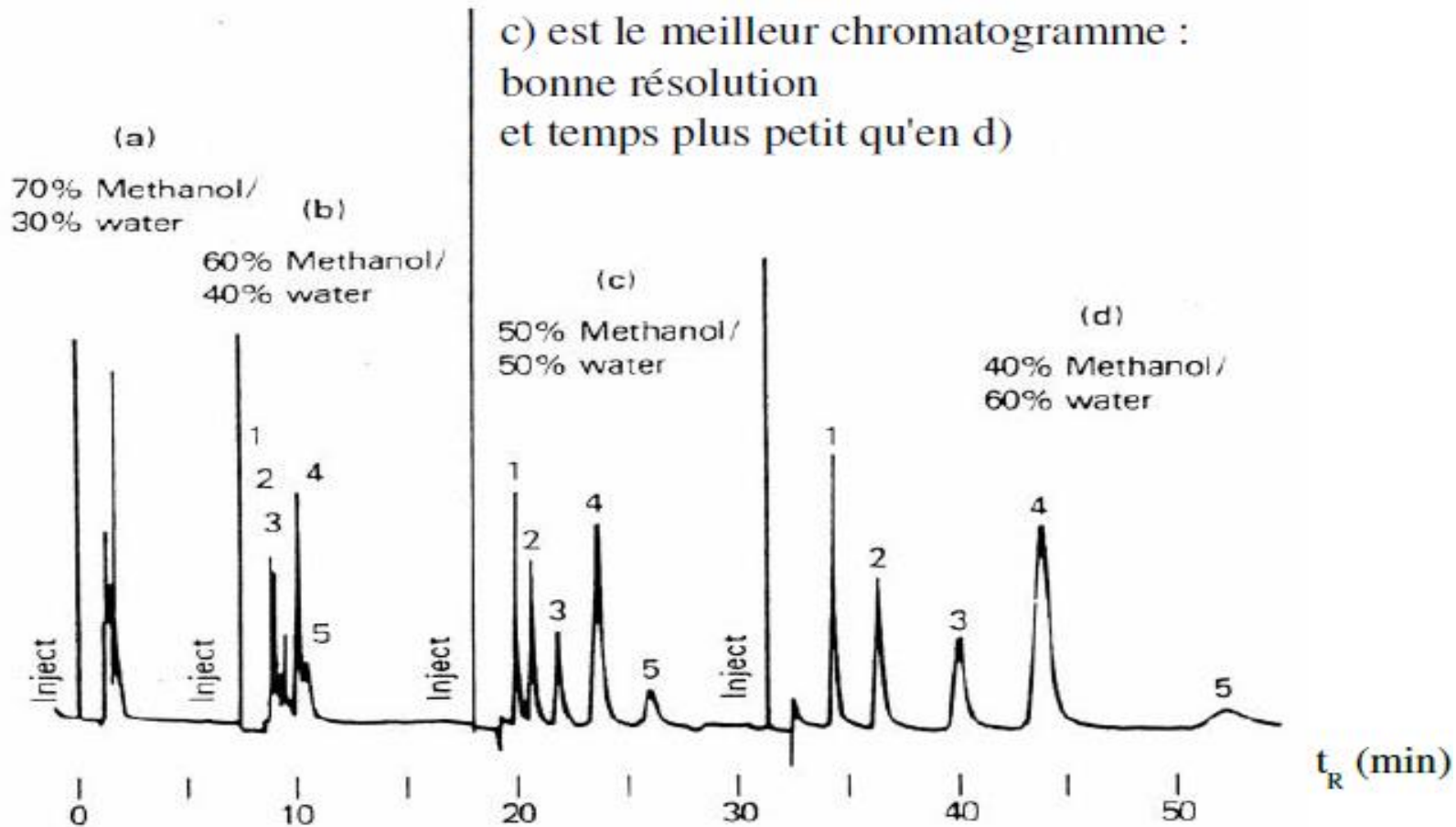


Fig. Effet de la modification de la composition du solvant sur la séparation des solutés

D'après D.A.Skoog et <http://web.uconn.edu/rusling/StuartLC3.pdf>

Calcul du rapport de phase β des colonnes capillaires

$$\beta = \frac{V_{pm}}{V_{ps}}$$

Ce rapport de phase correspond au rapport du volume de la phase mobile sur la phase stationnaire. Il apparaît dans la formule

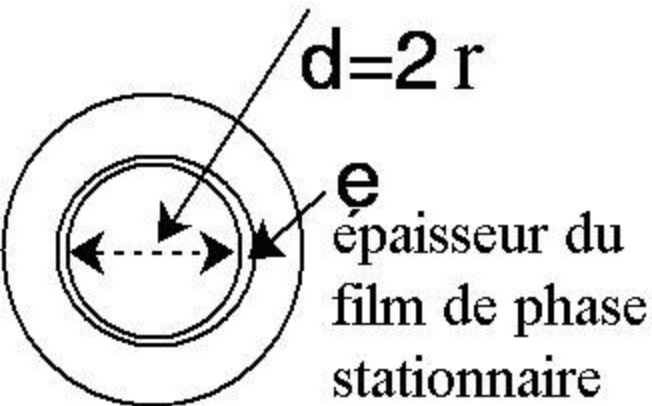
$$k' = \frac{K}{\beta}$$

Le volume de la phase mobile est égal à $V_{pm} = 2\pi r^2 L$ (où L est la longueur de la colonne)

Le volume de la phase stationnaire est égal au volume de la couronne d'épaisseur e soit $V_{ps} = 2\pi r e L$. On obtient donc pour le rapport de phase :

$$\beta = \frac{\pi \cdot r^2 L}{2\pi \cdot r e L} = \frac{r}{2e} = \frac{d}{4e} \quad (\text{eq. 1})$$

et par conséquent :



$$k' = \frac{(t_r - t_m)}{t_m} = \frac{K}{\beta} = \frac{4Ke}{d} \quad (\text{eq. 2})$$

$$t_r = t_m \left(1 + \frac{K}{\beta}\right) = t_m \left(1 + \frac{4Ke}{d}\right)$$

(eq. 3)

2.10 Exemple d'application

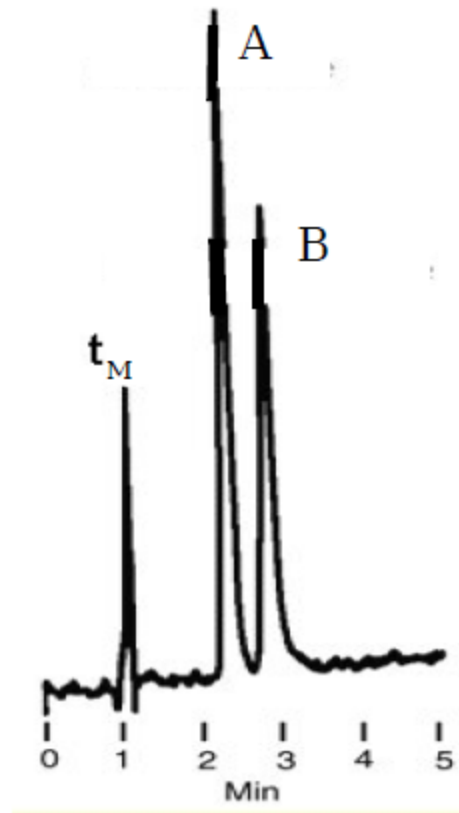
Technique : HPLC
 Colonne : Phase Stationnaire: C_{18} ,
 15 cm x 4,6 mm, $d_p = 5 \mu m$
 Phase Mobile : acétonitrile, CH_3CN
 Température : 30 °C

$t_M = 1,07$ min

$t_R(A) = 2,40$ min; $\delta_A = 5$ s (largeur du pic à mi-hauteur)

$t_R(B) = 2,85$ min; $\delta_B = 6$ s

Rem: C_{18} : chaîne alkyle en C_{18} : $-(CH_2)_{17}-CH_3$ qui a été greffée sur du gel de silice: $Si-O-Si(CH_3)_2-(CH_2)_{17}-CH_3$
 acétonitrile = cyanure de méthyle



1. Calcul du facteur de sélectivité α

$$\alpha = K_B / K_A = \alpha = k'_B / k'_A = \alpha = t'_R(B) / t'_R(A)$$

$\alpha = K(\text{soluté le + retenu: pic éloigné}) / K(\text{soluté le - retenu: 1er pic})$

$$\alpha = (2,85 - 1,07) / (2,40 - 1,07) = 1,34$$

2. calcul du facteur de résolution

$$R = 2 [t_R(B) - t_R(A)] / [\omega(B) + \omega(A)]$$
$$\omega = 1,7\delta \quad R = 2 \cdot (2,85 - 2,40) \cdot 60 / 1,7 \cdot (6 + 5) = 2,89$$

3. Calcul du nombre de plateaux théoriques de la colonne

régime isocratique: 1 seul solvant de composition constante

$$R = [(N^{1/2} / 4)] \cdot [(\alpha - 1) / \alpha] \cdot [k' / (1 + k')] \quad k' = (k'_A + k'_B) / 2$$

$$k'_A = t'_R / t'_M = (2,40 - 1,07) / 1,07 = 1,24$$

$$k'_B = t'_R / t'_M = (2,85 - 1,07) / 1,07 = 1,66 \quad (\alpha = k'_B / k'_A = 1,66 / 1,24 = 1,34)$$

$$N = [4 \cdot 2,89 \cdot 1,34 \cdot (1 + 1,45)]^2 / [(1,34 - 1) \cdot 1,45]^2 = 4646 \text{ plateaux théoriques}$$

4. Calcul de la différence d'enthalpie libre de dissolution des 2 solutés dans la phase stationnaire

soluté A (PM) \rightarrow soluté A (PS)

$$\Delta G_B^\circ - \Delta G_A^\circ = -RT \cdot \ln \alpha \quad (\text{cf. par. facteur de sélectivité})$$

$$\Delta G_B^\circ - \Delta G_A^\circ = -8,314 \cdot 303 \cdot \ln 1,34 = -737 \text{ J.mol}^{-1}$$

2. Analyse quantitative.

Une fois identifiés le ou les solutés intéressants, celui-ci permet l'analyse quantitative grâce à la relation: $m_i = K_i A_i$, qui relie la masse m du soluté i injecté à l'aire du pic A_i représentant ce soluté. Il est donc nécessaire de mesurer les aires des pics et de déterminer, pour chaque soluté, le coefficient de proportionnalité K_i .

2.1. mesure de l'aire des pics.

On utilise essentiellement la triangulation manuelle et l'intégration automatique.

2.1.1. Triangulation

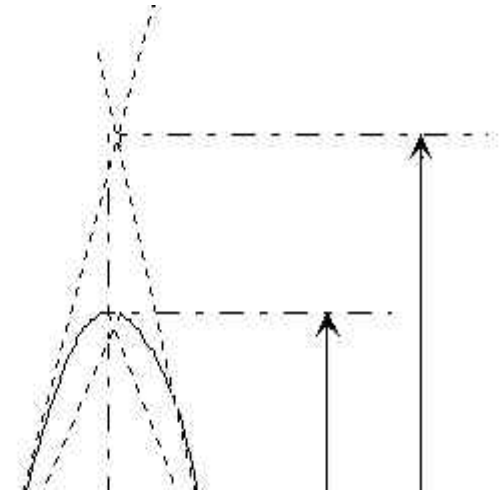
On assimile le pic à un triangle soit en traçant les tangentes aux points d'inflexion de la courbe en calculant l'aire:

$A_i = \frac{1}{2} H' \omega$, soit en mesurant la largeur à mi - hauteur et en calculant l'aire par: $A_i = H \delta$, ou encore en mesurant les largeurs au quart (β) et aux trois quarts (γ) de la hauteur, grâce à : $A_i = \frac{1}{2} H(\beta + \gamma)$

2.1.2. Intégration

Elle peut se faire par planimétrie, mais surtout par intégration mécanique, ou mieux électronique et informatisée.

Quand les pics sont très pointus et très étroits, on peut se contenter des mesures des hauteurs H , alors proportionnelles aux aires.



2.2. Détermination du coefficient de proportionnalité.

il est impossible avec les chromatographes courants de calculer le coefficient de proportionnalité par mesure directe de l'aire du pic enregistré quand on introduit une masse exacte, connue, d'un soluté d'un injecteur. Les seringues d'injection ne permettent pas de repérer le volume d'échantillon avec une précision suffisante. On aura donc recours à des méthodes d'étalonnage, qui, comme en analyse qualitative, feront de la chromatographie quantitative un procédé relatif vis-à-vis de substances connues. Voici les principales méthodes utilisées.

2.2.1. Normalisation interne.

On considère ici, en première approximation, que tous les K_i sont égaux (principalement dans les séries homologues telles que alcanes, alcools, etc.). On obtient alors les pourcentages en masse de chaque soluté de la manière suivante:

$$Y_i \% = \frac{A_i}{\sum_i A_i} \times 100$$

2.2.2. Méthode des ajouts dosés.

Le principe est le suivant: on prend d'abord le chromatogramme du mélange de solutés à étudier. Admettons que l'on cherche à déterminer le pourcentage en masse du composé n° 2. On va obtenir l'aire du pic correspondant A_2 , et l'on détermine également celle d'un pic voisin, par exemple A_3 . On pèse ensuite exactement une masse M de ce mélange voisine de 1g par exemple. Puis on y rajoute une masse m_0 du composé n°2, connue exactement, voisine de 300 mg environ. Le chromatogramme du nouveau mélange donne deux aires A_2' et A_3' .

Démontrons maintenant le résultat suivant

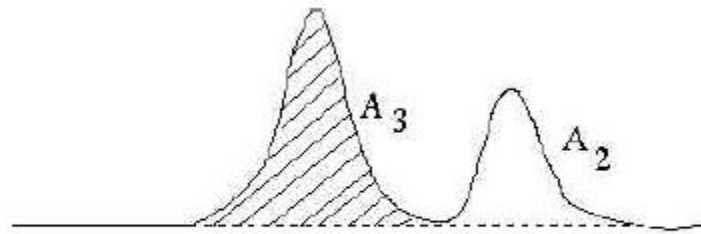
$$\% \text{ en masse} = \frac{m_0 \times 100}{M \left(\frac{A_2' \times A_3}{A_2 \times A_3'} - 1 \right)}$$

Soit M_0 la masse initiale de mélange, et m_{0i} les masses des divers constituants de ce mélange. On en pèse exactement une fraction M qui contient les masses m_i des constituants. Grâce à la seringue chromatographique, on injecte dans la colonne une masse μ contenant les masses μ_i des constituants. Nous allons nous intéresser aux constituants n°2 et n°3. Comme les rapports des masses des constituants d'un mélange se conservent dans toute fraction de ce mélange, il vient:

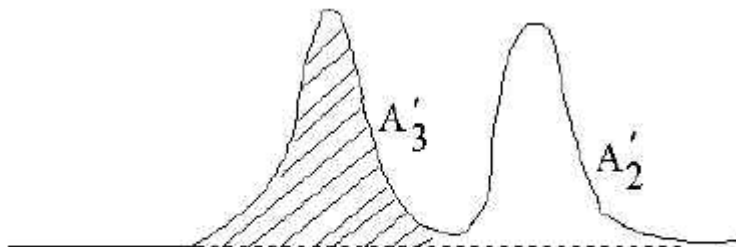
$$\frac{m_{02}}{M_0} = \frac{m_2}{M} = \frac{\mu_2}{\mu} \quad \text{et} \quad \frac{m_{03}}{M_0} = \frac{m_3}{M} = \frac{\mu_3}{\mu} \quad (1)$$

À la masse M prépesée, on rajoute alors une masse m_0 pesée précisément de composé n°2. En appelant μ' la masse injectée et μ'_i les masses des constituants de μ' , il vient:

$$\frac{m_3}{M+m_0} = \frac{\mu_3}{\mu'} \quad \text{et} \quad \frac{m_2+m_0}{M+m_0} = \frac{\mu_2}{\mu'} \quad (2)$$



première injection



deuxième injection

En admettant que tout ce qui a été injecté sort de la colonne, on a :

$$\mu_2 = K_2 \cdot A_2 \quad , \quad \mu'_2 = K_2 \cdot A'_2 \quad , \quad \mu_3 = K_3 \cdot A_3 \quad , \quad \mu'_3 = K_3 \cdot A'_3$$

D'où nous éliminons les constantes de proportionnalité:

$$\Rightarrow \frac{\mu_2}{\mu_2} = \frac{A_2}{A_2} \quad \text{et} \quad \frac{\mu_3}{\mu_3} = \frac{A_3}{A_3}$$

Le rapport de ces égalités donne:

(1) et (2) nous donnent d'autre part:

En combinant (3) et (4), nous obtenons une relation où seul m_2 est inconnu:

Le pourcentage en masse de 2 dans le mélange est donc:

La méthode demande une bonne linéarité de la réponse du détecteur chromatographique, ce qui n'est pas toujours le cas.

2.2.3. Étalonnage interne

Dans cette méthode, on compare individuellement chacun des pics à évaluer au pic d'une substance étalon E, convenablement choisie, introduite en proportion connue dans le mélange à analyser. il convient évidemment que le pic étalon ne soit confondu avec aucun des pics du chromatogramme.

On peut écrire

$$: m_e = K_e A_e \quad \text{soit:} \quad \frac{m_i}{m_e} = \frac{K_i}{K_e} \times \frac{A_i}{A_e}$$

On définit alors $K^{ne} = \frac{K^e}{K^i}$

On calculera donc la réponse de chaque soluté concerné par rapport à l'étalon. La méthode est générale. Elle est précise et reproductible.

Elle suppose néanmoins le choix d'un étalon qui, outre la nécessité de ne pas chevaucher avec les autres solutés, doit donner un pic de valeur de rétention proche de celle du pic à mesurer, d'aire approximativement égale à celle du pic du soluté, et dont la réponse doit se situer dans la zone de linéarité du détecteur utilisé