

Module de Chimie

Élément de

Chimie Instrumentale

Filière : Génie Biologique

Prof. Ilham Kirm

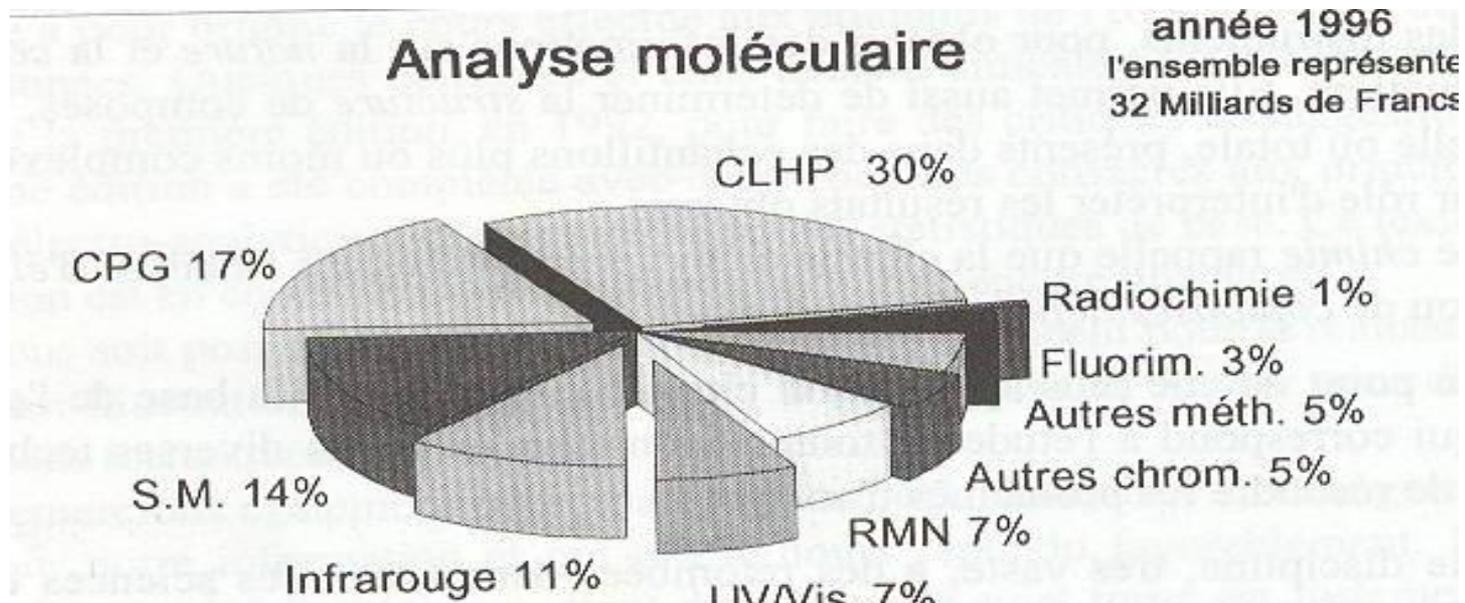
CHROMATOGRAPHIE

-Aspects généraux-

I - INTRODUCTION

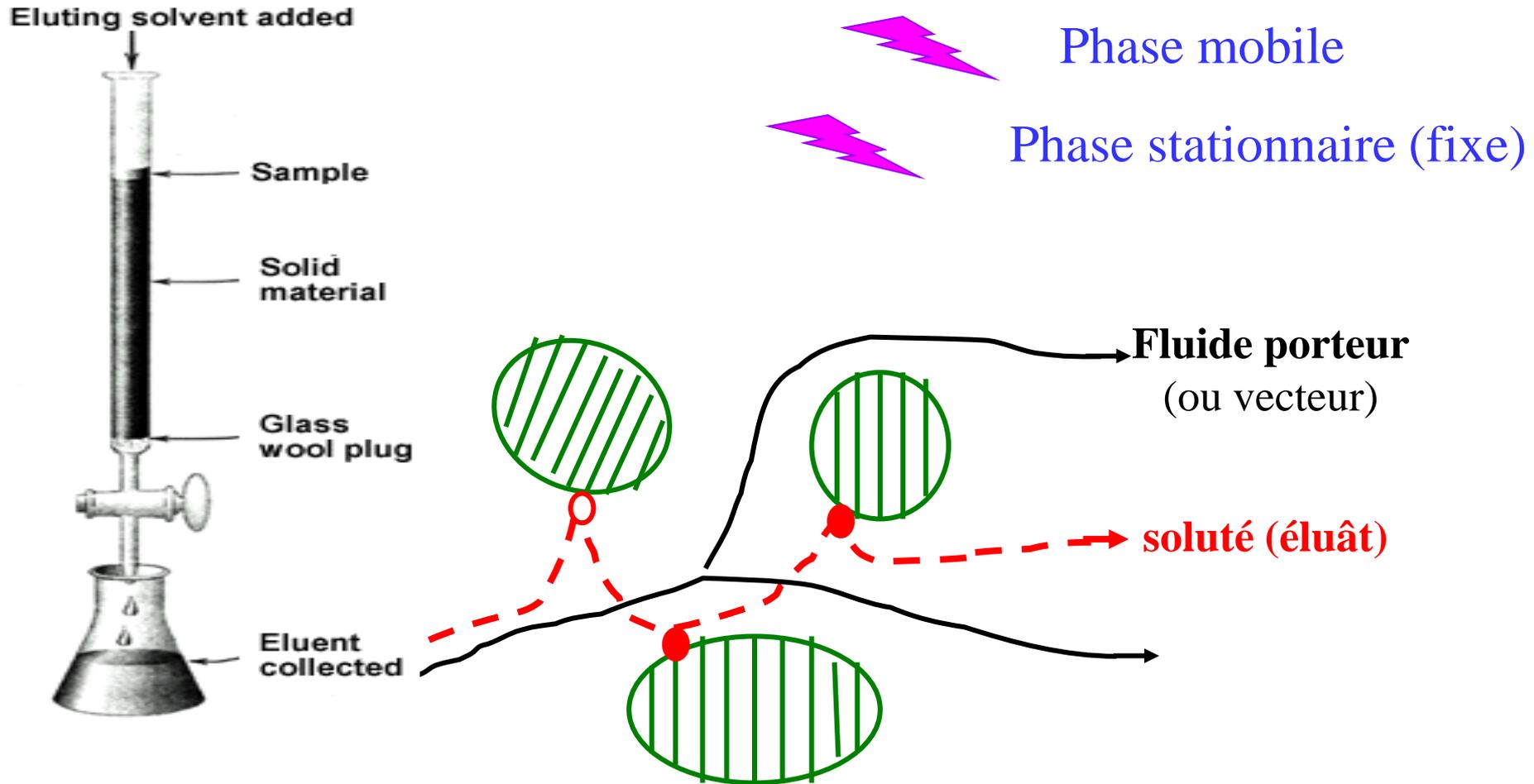
La chromatographie sous toutes ses formes, est une **méthode de séparation** des constituants d'un mélange gazeux, liquide ou solide. C'est une méthode de séparation, donc d'analyse, basée sur les différences d'affinités que peuvent présenter deux ou plusieurs composés pour deux phases, l'une fixe ou stationnaire et l'autre mobile.

La chromatographie est essentiellement une technique de **séparation physique** dont le champ d'application en **analyse quantitative** est restreint aux situations où la **composition** du mélange à séparer est connue. Pour identifier des composés séparés par chromatographie, lorsqu'on ignore tout de leur structure chimique, il est fréquent de coupler à la séparation comme telle, une technique d'analyse complémentaire comme par exemple la spectrométrie de masse ou la spectroscopie infrarouge..



La statistique ci-dessus fait apparaître que la chromatographie, à elle seule, représente plus de la moitié du chiffre d'affaires de l'instrumentation d'analyse moléculaire

I - 1 - Principe général de tous les types de chromatographie



I - 2 - Classement selon la nature des phases et processus mis en jeu

PHASE MOBILE

PHASE
STATIONNAIRE

METHODE
CHROMATOGRAPHIQUE

Gaz	Solide	C.G.S
Gaz	Liquide	C.G.L
Liquide	Solide	C.L.S
Liquide	Solide	C.L.L

MECANISMES

METHODES
CHROMATOGRAPHIQUES

Adsorption	L.G.S et C.L.S
Partition	C.G.L et C.L.L
Echanges d'ions	C.L.S
Perméations	C.L.S

Chromatographie

Nature de la phase mobile

Chromatographie liquide

Chromatographie gazeuse

Forme physique du support

Nature de la phase stationnaire

Papier

Couche mince

Colonne

Gaz-liquide

Gaz-solide

Mécanisme de séparation

Adsorption

Partage

Échange ionique

Exclusion moléculaire

Affinité

Appariement et suppression ionique

Interaction hydrophobe

I - 2 - 1- Classement selon les techniques opératoires

- Chromatographie sur couche mince ou sur papier;
- Chromatographie liquide sur colonne;
- Chromatographie sur colonne;
- Chromatographie par perméation de gel ou d'exclusion (polymères);

I - 2 - 2 - Classement selon la méthode d'injection de l'éluât

- Chromatographie pulsée ou d'élution;
- Chromatographie frontale.

I - 3 - Historique

Il existe peu d'exemple de développement d'un procédé ou d'une méthode aussi extraordinaire que celui de la chromatographie.

Quelques dates importantes :

1906 : Découverte de phénomène chromatographique par M. TSWETT

1952 : Première chromatographie gazeuse (MARTIN et JAMES)

1967 : Début de la chromatographie liquide haute performance (HUBER et HUZSMAN)

I - 4 - Buts de la chromatographie

Chromatographie analytique : analyses qualitatives et quantitative (recherche, laboratoire, fabrication)
chromatographie préparative (recherche, synthèse).

I - 5 - Comparaison CG/CL

Les deux techniques de base de la chromatographie ne sont pas compétitives mais tout à fait complémentaires.

Quelques avantages de la CL :

- Possibilité de chromatographier : Produits thermolabiles
Produits de haute masse molaire.
- Dérivation des produits peut être automatisée
- Mode préparatif facile à mettre en œuvre

Quelques avantages de la C.G :

- Détecteurs spécifiques et sensibles
- Couplage avec spectrométrie
- Possibilité d'analyser les produits de très faibles masses molaires.

GC : l'échantillon doit être volatil

**GL par partition -
Adsorption - échange d'ions**

Chromatographie par perméation de gel (composés solubles dans des Solvants aqueux et organiques)

50

500

10000

2 millions et plus

Domaines d'utilisation rapportés aux poids moléculaires

II-THÉORIE DE LA CHROMATOGRAPHIE

La théorie générale de la chromatographie peut être longue et complexe à exposer. En outre, chaque méthode chromatographique possède sa théorie et ses mécanismes propres. Nous présentons seulement dans ce chapitre les grandeurs fondamentales de la chromatographie (sous toutes ses formes) qui sont des éléments théoriques indispensables au praticien.

II-1 - COMMENT AMÉLIORER UNE SÉPARATION EN CHROMATOGRAPHIE ?

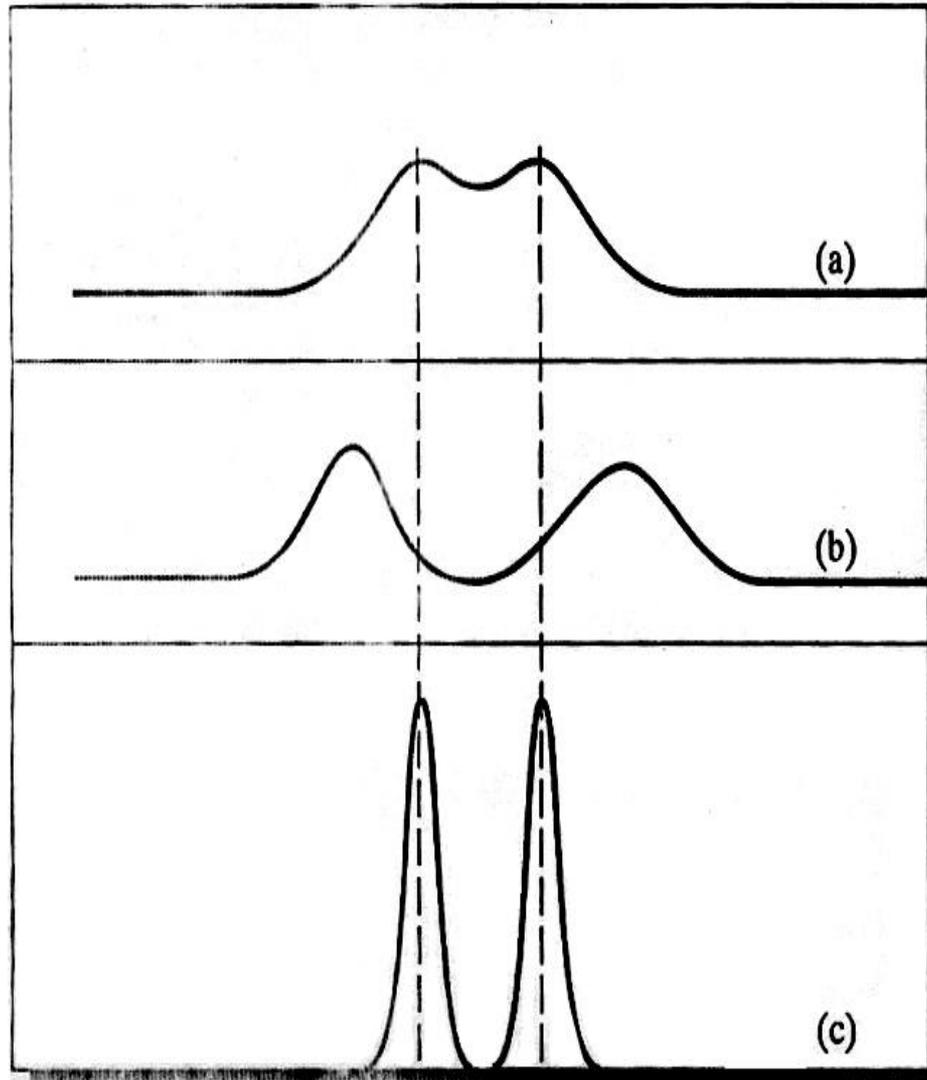


Figure 1: Séparations entre 2 pics en chromatographie

Il y a deux possibilités pour améliorer la séparation entre les 2 pics du chromatogramme (a) :

1- A largeur de pic constante, on peut augmenter la différence de temps de rétention entre les 2 pics, ceci est illustré dans chromatogramme (b)

2- A temps de rétention constant, on peut diminuer la largeur des pics, le chromatogramme (c) illustre ce phénomène.

En pratique, on peut jouer à la fois sur ces 2 paramètres pour améliorer une séparation.

En conclusion, deux paramètres s'avèrent donc primordiaux en chromatographie, la rétention et la forme du pic.

II-2: PARAMÈTRES CARACTÉRISANT LA RÉTENTION.

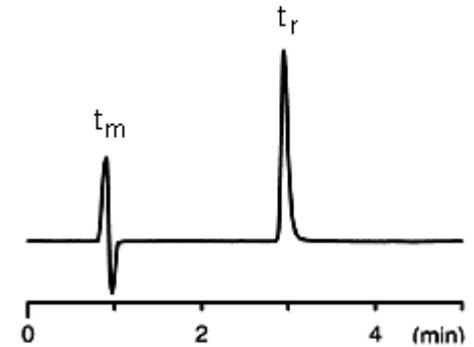
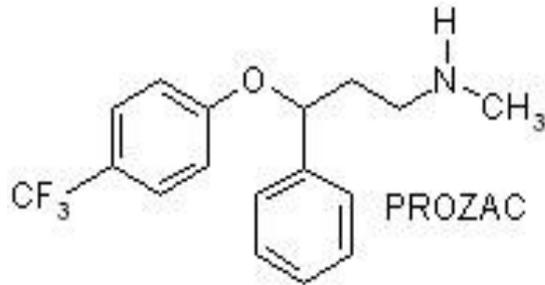


Figure 2: Chromatogramme du Prozac

Le chromatogramme du Prozac (antidépresseur) a été enregistré dans les conditions suivantes :

HPLC. Colonne C18: 15cm x 4.6mm

Phase mobile: acetonitrile / 25mM KH₂PO₄ pH 7.0 (40:60)

Débit: 2mL/min. Température: 30°C

Détecteur UV : 254 nm . Injection: 1 μ L

II-2-1- Le temps de rétention.

Le temps de rétention t_r d'un produit **S** est le temps écoulé entre le début de l'injection et la sortie du produit. (pour le chromatogramme 2, $t_r = 3\text{mn}$)

t_r dépend du produit **S** et des conditions expérimentales (colonne, température, débit de phase mobile... etc.)

II-2-2- Le volume de rétention

Le volume de rétention V_r correspond au volume de phase mobile nécessaire pour éluer le produit **S**. Si D est le débit de la phase mobile (D supposé constant) :

$$V_r = t_r \cdot D \quad (\text{pour le chromatogramme 2, } V_r = 3 \cdot 2 = 6 \text{ ml})$$

II-2-3- Le temps mort.

Le temps mort t_m est le temps que met la phase mobile pour traverser la colonne. (dans la figure 2, $t_m = 1\text{mn}$)

La phase mobile est caractérisée par sa vitesse linéaire u de déplacement dans la colonne de longueur L , on a :

$$u = L / t_m \quad (\text{pour le chromatogramme 2, } u = 15 \text{ cm/mn})$$

En CPG, le temps mort correspond au temps de rétention de substances non retenue par la phase stationnaire comme l'air ou le méthane.

II-2-4- Le volume mort.

On appelle volume mort V_m le volume de phase mobile qui passe à travers la colonne pour aller d'une extrémité à l'autre de la colonne (pendant le temps t_m). Autrement dit, V_m est le volume occupé par la phase mobile dans une colonne.

$$V_m = t_m * D. \quad (\text{pour le chromatogramme 2, } V_m = 1 * 2 = 2 \text{ ml})$$

V_m ne dépend que de la géométrie et du remplissage de la colonne.

II-2-5- Volume et temps de rétention réduits

On appelle volume de rétention réduit V'_r , la différence entre les termes V_r et V_m .

$$V'_r = V_r - V_m \quad (\text{eq.1-1}) \quad (\text{pour le chromatogramme 2, } V'_r = 4 \text{ ml})$$

Le volume de rétention réduit correspondant au produit S est le volume de phase mobile qui doit passer à travers la colonne pour éluer le composé S .

De la même façon, on définit un temps de rétention réduit t'_r .

$$t'_r = t_r - t_m \quad (\text{eq.1-2}) \quad (\text{pour le chromatogramme 2, } t'_r = 2 \text{ mn})$$

Les volumes et temps de rétention réduits sont indépendantes des volumes et temps morts, elles dépendent donc moins de l'instrumentation (de la colonne).

II-2-6- Le facteur de rétention (ou de capacité).

Si on représente la colonne de chromatographie comme un milieu hétérogène constitué de deux phases non miscibles, l'une fixe et l'autre mobile et si on introduit dans ce milieu un composé présentant des affinités envers les deux phases, il s'établira, en chaque point de la colonne, un équilibre entre la concentration de ce composé dans la phase mobile et sa concentration dans la phase stationnaire. Le rapport de ces concentrations à l'équilibre est le coefficient de partage K .

Le facteur de rétention k' pour un produit donné est défini comme suit

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{V_r}{V_m} \quad \text{ou également} \quad k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t_r}{t_m} \quad (\text{eq.1-3})$$

Ce qui donne : $V_r = V_m(1 + k')$ et $t_r = t_m(1 + k')$ (eq.1-4)

Les facteurs de rétention sont des grandeurs sans dimension donc plus générales d'un produit donné que les temps ou les volumes de rétention réduits.

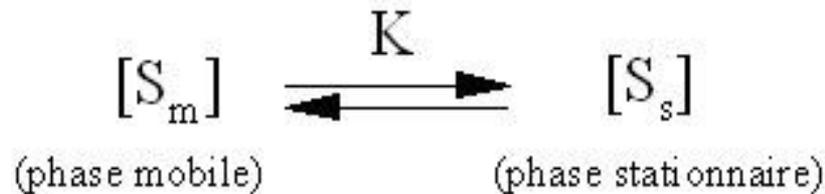
(pour le chromatogramme 2, $k' = 2$)

D'où une définition du facteur de rétention d'après (eq.1-3) : c'est le rapport du temps passé par le soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile

II-3 INTERPRÉTATION THERMODYNAMIQUE DES PARAMÈTRES DE RÉTENTION

II-3-1- La constante d'équilibre (ou constante de partition) K

Le problème est le suivant: trouver les relations entre les paramètres de rétention (V_r , k' , t_r' et t_r) et la constante d'équilibre K caractérisant l'équilibre suivant:



L'élution d'un soluté S en chromatographie est donc caractérisé par la constante d'équilibre K , appelée aussi constante de partition.

$$K = [S_s]/[S_m] \quad (\text{eq.1-5}) \quad \text{où} \quad [S_s] = m_s/V_s \quad \text{et} \quad [S_m] = m_m/V_m$$

avec m_m = masse du soluté **S** dissous dans la phase mobile
 m_s = masse du soluté **S** dissous dans la phase stationnaire
 V_m = volume de la phase mobile (équivalent au volume mort)
 V_s = volume de la phase stationnaire

V_m et V_s sont constants pour une colonne donnée avec une phase stationnaire donnée ($b = V_m/V_s$).

Le paramètre **b**, appelé rapport de phases est une constante qui caractérise une Colonne de chromatographie.

b sera calculé par la suite pour une colonne capillaire en chromatographie en phase gazeuse.

$$K = \frac{[S_s]}{[S_m]} = \frac{m_s}{m_m} \cdot \frac{V_m}{V_s} = \frac{m_s}{m_m} \cdot \beta \quad (\text{eq.1-6})$$

La relation (eq.1-5) devient :

II-3-2- Le facteur de rétention k'

$$k' = \frac{V_r}{V_m} - 1 \quad \text{D'après (eq.1-3), on déduit que}$$

Si on suppose que V_r est proportionnel à la masse totale de soluté dissous dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

On a donc V_r proportionnel à $(m_s + m_m)$

De la même façon, si on suppose que V_m est proportionnel à la masse de soluté dissous dans la phase mobile.

On a donc V_m proportionnel à m_m

On en déduit que $k' = \frac{m_s + m_m}{m_m} - 1 = \frac{m_s}{m_m}$ et d'après eq.1-6 on a donc

$$k' = \frac{m_s}{m_m} = \frac{[S_s]V_s}{[S_m]V_m} = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{K}{\beta}$$

ce qui nous donne une relation fondamentale de la chromatographie

$$k' = \frac{K}{\beta} \quad (\text{eq.1-7})$$

II-3-3- Le temps de rétention t_r

D'après les équations 1-4 et 1-7, on déduit que

$$t'_r = t_m \frac{K}{\beta} \quad \text{et} \quad t_r = t_m \left(1 + \frac{K}{\beta}\right) \quad (\text{eq.1-8})$$

La dernière expression est cohérente, si un produit n'a aucune affinité avec la phase stationnaire : $[S_s] = 0$ donc $K = 0$ et $t_r = t_m$. Ceci est le cas de l'air ou en première approximation du CH_4 en CPG, ce qui permet la mesure du temps mort.

1-3-4- Influence de la température sur les temps de rétention réduits t'_r

K varie avec la température T suivant l'équation classique (eq.1-9), où $\Delta_r G^\circ$ est la différence d'énergie libre de dissolution du soluté S entre les 2 phases. K est $\gg 1$ donc $\Delta_r G^\circ$ est négative.

$$\ln K = \frac{-\Delta_r G^\circ}{RT} \quad (\text{eq.1-9})$$

En combinant cette expression avec l'équation 1-8, on trouve la relation entre le temps de rétention réduit et la température :

$$\ln t'_r = \frac{-\Delta_r G^\circ}{RT} - \ln \beta + \ln t_m \quad (\text{eq. 1-10})$$

Où G° est la différence d'énergie libre de dissolution du soluté entre les phases mobile et stationnaire.

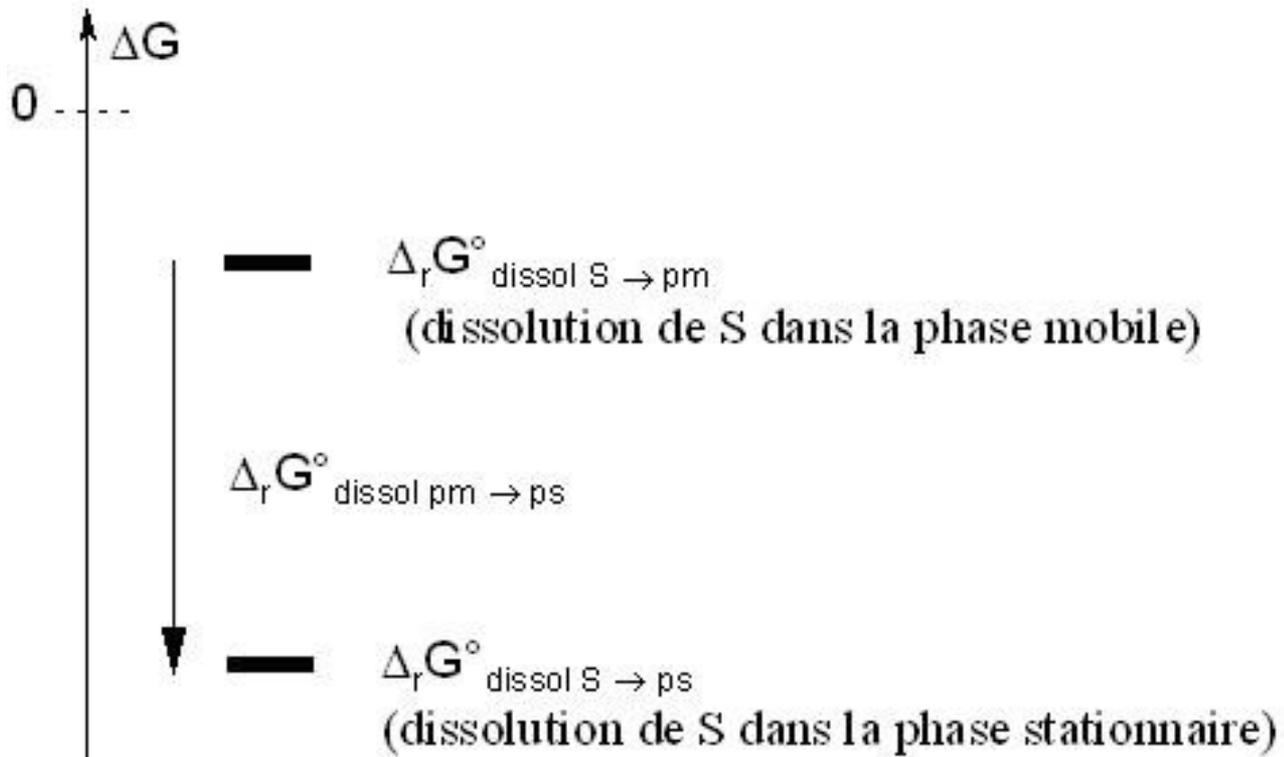


Figure 3 : Représentation graphique du terme $\Delta_r G^\circ$ (dissol pm \rightarrow ps)

Plus ΔG° (dissol pm \rightarrow ps) est petit (grand en valeur absolue), plus la constante d'équilibre K est grande, plus le produit est retenu sur la colonne, plus le t_r est grand

D'après la figure 3, il apparaît que pour avoir une séparation chromatographique, il faut que :

ΔG° (dissol pm \rightarrow ps) < 0 soit ΔG° (dissol ps) $< \Delta G^\circ$ (dissol pm) ou en valeur absolue ΔG° (dissol ps) $> \Delta G^\circ$ (dissol pm)

$\Delta_r G^\circ$ (dissol pm \rightarrow ps) est fonction de la température, en effet $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T^* \Delta S^\circ$

Si l'on suppose que ΔH° et ΔS° sont indépendants de la température, la formule (eq.1-10) devient

$$\ln t_r' = - \Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R - \ln b + \ln t_m$$

Soit

$$\ln(t_r') = \frac{A}{T} + B \quad (\text{eq.1-11})$$

où A et B sont des constantes pour un produit donné et une colonne donnée.

Considérons deux températures T_1 et T_2 où $T_2 > T_1$ avec les facteurs de rétention correspondants k'_1 et k'_2 , la formule (eq.2-12) devient

$$\ln\left(\frac{t'_{r1}}{t'_{r2}}\right) = -\frac{\Delta_r H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) = -\frac{\Delta H_r}{RT_1 T_2} (T_2 - T_1) \quad (\text{eq. 1-12})$$

comme $t'_{r1} > t'_{r2}$, on voit que ΔH° est toujours < 0 .

Le temps mort t_m peut être supposé indépendant de la température pour une colonne donnée et une pression donnée.

En réalité, lorsque la température augmente, le mouvement brownien augmente, la viscosité de la phase mobile diminue et sa vitesse augmente légèrement dans la direction de la colonne. On observe expérimentalement une faible augmentation du temps mort avec la température

EXERCICES D'APPLICATION

EXERCICE 1:

Les paramètres thermodynamiques des produits suivants ont été mesurés sur une colonne capillaire ayant pour phase stationnaire un polysiloxane. Les termes ΔH° et ΔS° correspondent aux variations d'enthalpie et d'entropie de dissolution des produits entre la phase gazeuse et la phase stationnaire.

Quelle sera l'ordre d'élution de ces produits à 120°C ? Justifier votre réponse par un calcul simple.

	Décane	Butyl acétate	1-Heptanol	1-Bromobutane	Hexyl acétate
ΔH° Kj/mol	-47,2	-34	-36.9	-31	-42
ΔS° u.e	-75.4	-58	-58	-51	-66

SOLUTION 1:

	Décane	Butyl acétate	1-Heptanol	1-Bromobutane	Hexyl acétate
ΔG° Kj/mol	-17,5	-11,2	-14.1	-10.96	-16,06
Ordre d'élution	5	3	2	1	4

EXERCICE 2:

Le chromatogramme de la nicotine a été obtenu dans les conditions suivantes :

CPG. Colonne remplie

Phase stationnaire: 10% Carbowax 20M/2%

KOH sur 80/100 Chromosorb W AW

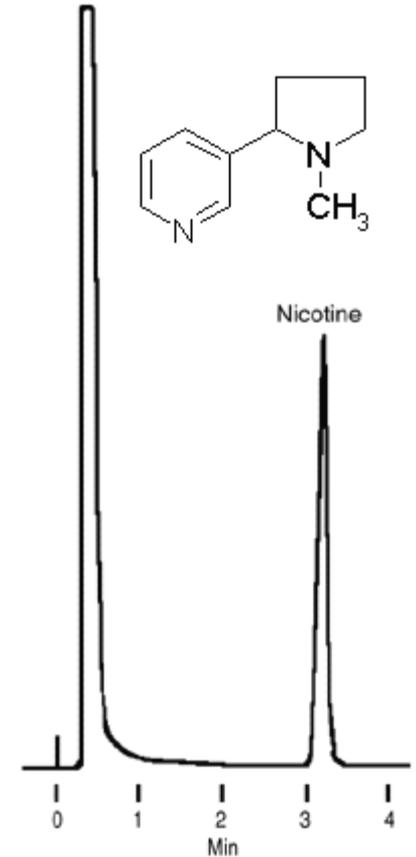
Dimensions de la colonne: Longueur 6'
(183cm) x 2mm (diamètre intérieur)

Débit de la phase mobile: 20mL/min.

Quantité injectée: 1 μ L

Four: 200°C. Temps de rétention de la nicotine = 3,20 mn

Four: 180°C. Temps de rétention de la nicotine = 6,60 mn



Questions :

- 1- Calculer la vitesse linéaire (en cm/sec) de la phase mobile dans la colonne.
- 2- En déduire le temps mort de cette analyse.
- 3- Calculer le temps de rétention de la nicotine à 160°C.
- 4- Peut-on éluer la nicotine en 1 mn, sachant que la température limite d'utilisation de la colonne est de 250°C ?

SOLUTION 2

1- le débit $D = V/t = \pi r^2 L/t$ or la vitesse $u = L/t$ d'où $u = D/\pi r^2$

Application numérique : $u = 20/\pi(0,1)^2$ soit 636 cm/min ou 10,6 cm/sec

2- $t_m = L/u$ soit $t_m = 183/10,6 = 17,26 \text{ sec} = 0,29 \text{ mn}$.

3- Pour la nicotine $t'_r = 2,91 \text{ mn}$ à 200°C et $t'_r = 6,31 \text{ mn}$ à 180°C

l'expression (eq.1-11) conduit à 2 équations avec 2 inconnues.

$\ln(2,91) = A/473 + B$ et $\ln(6,31) = A/453 + B$

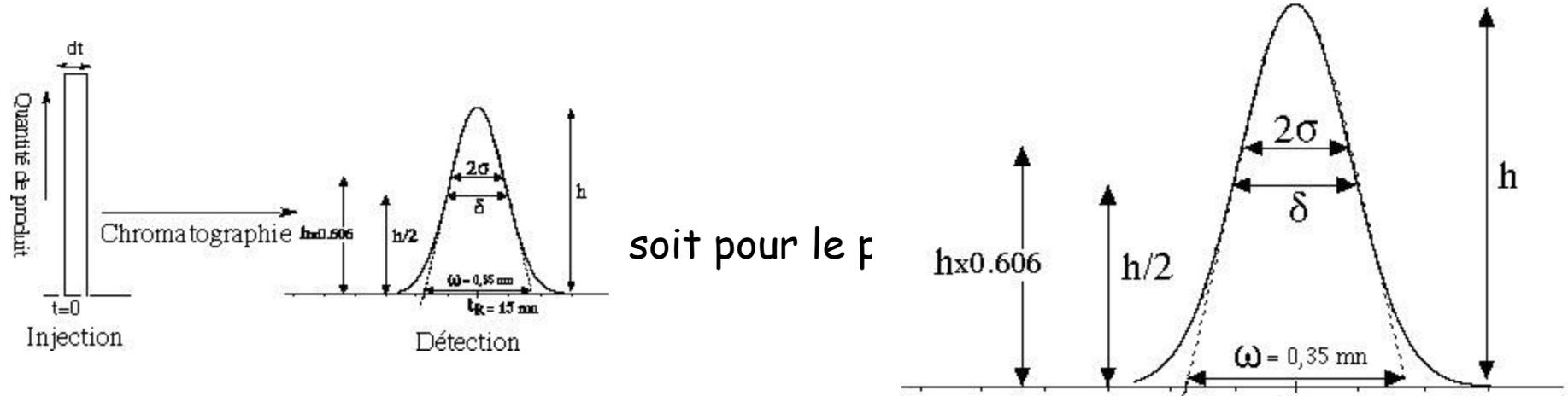
La résolution donne $A=8408$ et $B= -16,7$, d'où $t_r = 15,44 \text{ mn}$ à $T = 433^\circ\text{K}$ soit 160°C

4- A 250°C soit $T = 523^\circ\text{K}$ on obtient $t'_r = 0,53 \text{ mn}$ soit $t_r = 0,82 \text{ mn}$.

On peut donc éluer la nicotine en 1 mn en étant à une température inférieure à la température limite d'utilisation de la colonne (250°C)

III-:LA FORME DES PICS EN CHROMATOGRAPHIE

Au moment de l'injection, de durée (dt), le "futur" pic de chromatographie a un profil rectangulaire ; à la sortie de la colonne, il se retrouve déformé suivant une loi statistique, approximativement « normale », c'est une courbe de Gauss.



soit pour le σ

Figure 1 : Profil des pics chromatographiques

L'équation mathématique $y=f(t)$ de la courbe de Gauss est

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{t^2}{2}}$$

**Une courbe de Gauss est caractérisée par les paramètres suivants:
(Cffigure2-1)**

1-Écart-type = s. L'écart type s correspond à la moitié de la largeur du pic mesuré à 60,6% de sa hauteur.

2- Variance = s^2

3- Largeur à mi-hauteur = d mesurée à h/2. On a la relation:

$$d = 2,35s. \quad (\text{eq.2-1})$$

4- la "base" du pic = w. Cette base est extrapolée par des tangentes aux deux branches et passant par les points d'inflexion de la courbe de Gauss.

On a la relation: $w = 4s$. (eq.2-2)

Une conséquence de la loi statistique « normale » est que 95,4% des valeurs de tr du pic se trouve dans l'intervalle **[tr-2s ; tr+2s]**

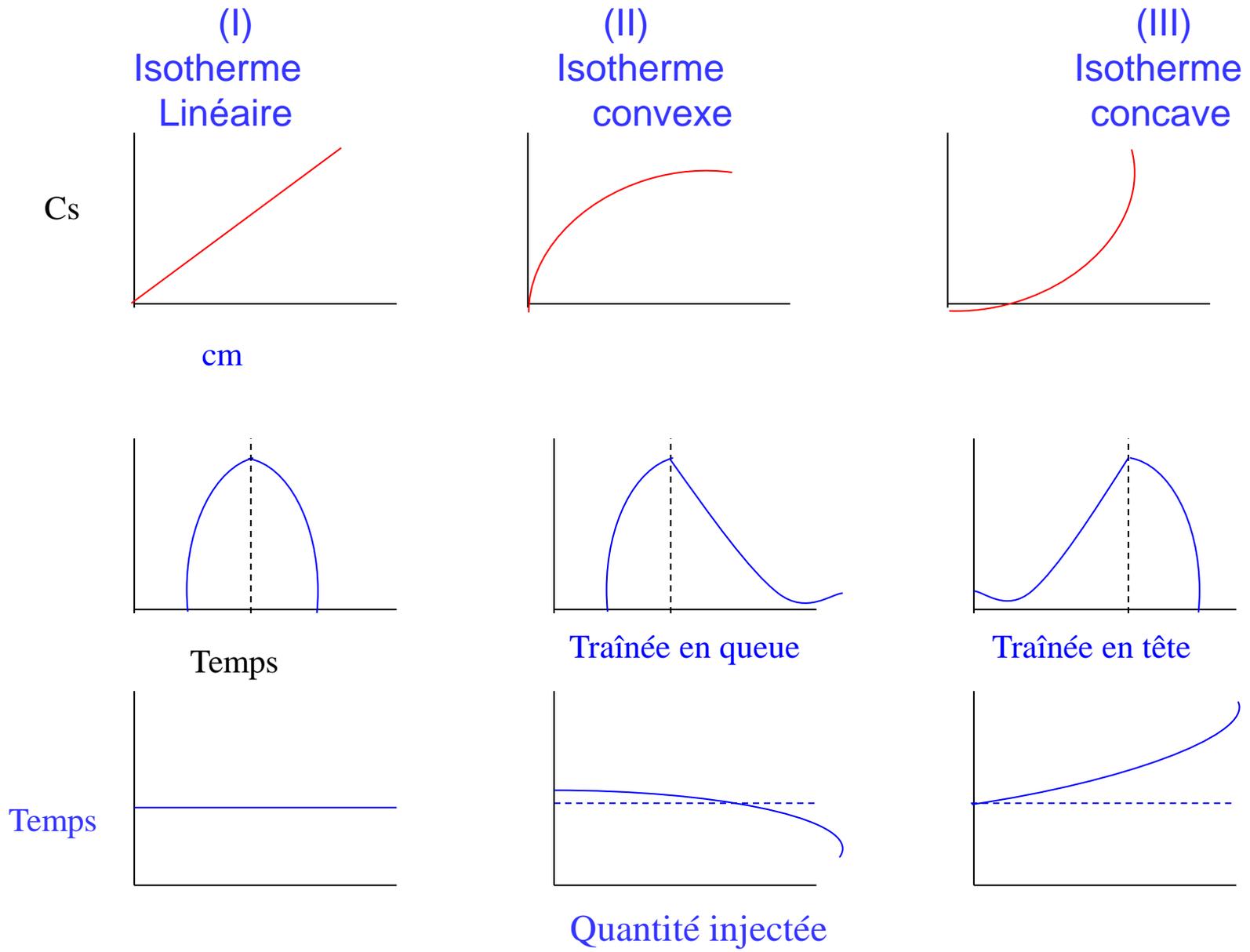
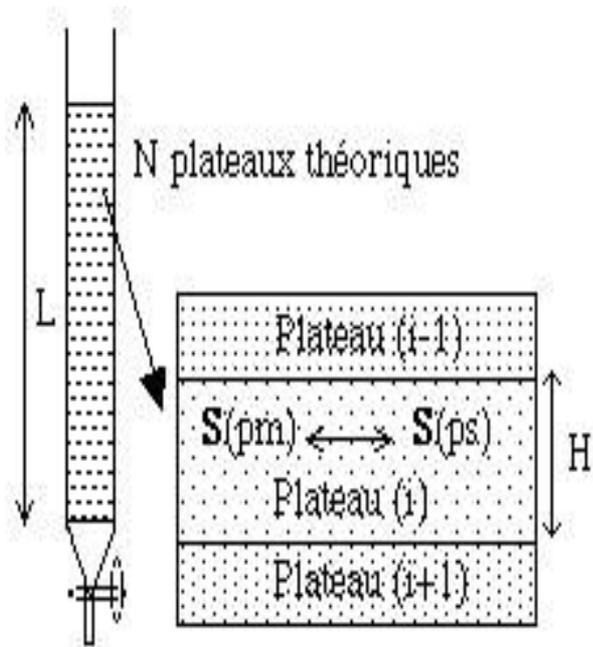


Figure 2 : Les traits isothermes de distribution de base : effets sur la forme du pic et sur le temps de rétention.

III-1: MODÈLE DES PLATEAUX THÉORIQUES

Vers 1950, **MARTIN** et **SYNGE** ont tenté de justifier la forme des pics de chromatographie, en assimilant une colonne de chromatographie à une colonne à distiller. Ce qui s'est avéré inexact par la suite (les 2 phénomènes sont physiquement différents).

III-1.1: Notion de plateaux théoriques



Une colonne de N plateaux théoriques est une colonne divisée en N petits disques cylindriques successifs. On admet que la phase mobile progresse non pas de façon continue, mais par sauts successifs d'un plateau théorique à l'autre. Dans chaque plateau théorique, on observe une rétention du soluté S , du fait de l'équilibre de ce produit entre la phase mobile (S_{pm}) et la phase stationnaire (S_{ps}). Une colonne réelle aura donc " N plateaux théoriques" si elle se comporte comme une "colonne à distiller théorique" de N plateaux. Dans cette théorie, les pics de chromatographie ont une forme gaussienne et la variance s^2 est reliée au nombre de plateaux théoriques N et au temps de rétention t_r par la relation:

$$Ns^2=(tr)^2 \quad (\text{eq.2-3})$$

N augmente donc avec le temps de rétention et diminue si la largeur des pics (**s**) augmente. D'après la relation 2-3, une « bonne » colonne de chromatographie qui conduit à des pics fins (**s** petit) pour des temps de rétention (**tr**) élevés, est donc caractérisée par un nombre de plateaux théoriques **N** élevé..

Formule (eq.2-4) utilisant la base extrapolée w du pic

$$N=16\left(\frac{tr}{w}\right)^2$$

Formule (eq.2-5) utilisant la largeur à mi hauteur d du pic

$$N=5,54\left(\frac{tr}{d}\right)^2$$

Formule (eq.2-6) utilisant la hauteur h_p et l'aire A du pic

$$N=16\left(\frac{h_p tr}{A}\right)^2$$

(w , d , h_p , A et tr doivent être exprimés dans la même unité).

L'intérêt de la notion de plateaux théorique est de nous donner une idée de l'efficacité d'une colonne, mais seul l'ordre de grandeur de N est à prendre en compte.

Bien que cette notion de plateaux théoriques soit issue d'une théorie qui s'est avérée inexacte, elle est toujours utilisée car c'est une notion simple et qui bien ancrée dans les habitudes des chromatographistes. Les fabricants de colonnes donnent toujours dans les spécifications le nombre de plateaux théoriques N pour caractériser l'efficacité de leur colonne.

En CPG, N est donné pour un produit donné, souvent le tridécane ($C_{13}H_{28}$)

III-1.2: Notion de hauteur équivalente à un plateau théorique

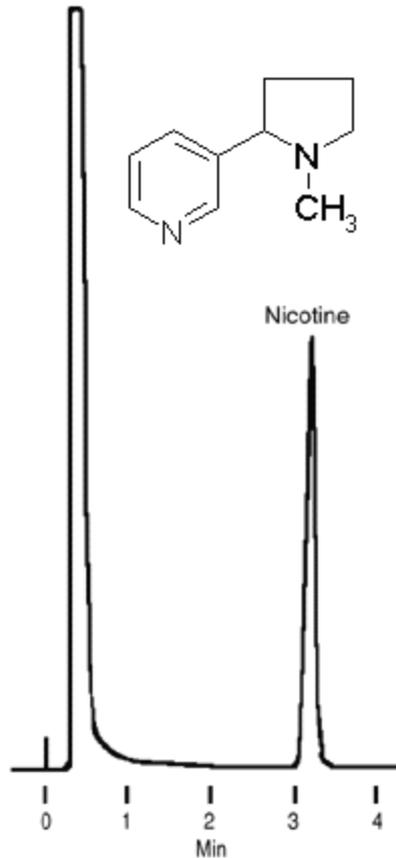
Pour exprimer l'efficacité d'une colonne de longueur L et de N plateaux théoriques, on définit la hauteur H équivalent à un plateau théorique:

$$H = L/N \quad (\text{eq.2-7})$$

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. Le tableau suivant montre le pouvoir de séparation des chromatographies les plus utilisées

Type de chromatographies	Nombre de plateaux théoriques N	N /par mètre de colonne	H (HETP) en mm
CPG (colonne remplie de 2m)	2000	1000	1
CPG (colonne capillaire de 25m)	100000	4000	0,25
CPL classique de 50 cm	100	200	5
HPLC de 10cm	5000	50000	0,02

Exercice d'application



Le chromatogramme de la nicotine a été obtenu dans les conditions suivante :

Conditions

CPG. Colonne remplie

10% Carbowax 20M/2% KOH sur 80/100 Chromosorb W AW

6' (183cm) x 2mm ID . Débit de la phase mobile: 20mL/min. Inj.:1 μ L

Four: 200°C. Temps de rétention de la nicotine = 3,20 mn. Four: 180°C. Temps de rétention de la nicotine = 6,60 mn

Questions :

- 1- Calculer la vitesse linéaire (en cm/sec) de la phase mobile dans la colonne.*
- 2- En déduire le temps mort de cette analyse.*
- 3- Calculer le temps de rétention de la nicotine à 160°C.*
- 4- Peut-on éluer la nicotine en 1 mn, sachant que la température limite d'utilisation de la colonne est de 250°C ?*
- 5- Le pic de la nicotine a une largeur à mi-hauteur de 10 sec. Calculez N et H .*

Solution

1- le débit $D = V/t = pr^2L/t$ or la vitesse $u = L/t$ d'où $u = D/ pr^2$ Application

numérique : $u = 20 // p(0,1)^2$ soit 636 cm/min ou 10,6 cm/sec

2- $t_m = L/u$ soit $t_m = 183/10,6 = 17,26 \text{ sec} = 0,29 \text{ mn}$.

3- Pour la nicotine $t'_r = 2,91 \text{ mn}$ à 200°C et $t'_r = 6,31 \text{ mn}$ à 180°C , l'expression (eq.2-12) conduit à 2 équations avec 2 inconnues.

$\ln(2,91) = A/473 + B$ et $\ln(6,31) = A/453 + B$. La résolution donne $A=8408$ et $B= -16,7$, d'où $t_r = 15,44 \text{ mn}$ à $T = 433^\circ\text{K}$ soit 160°C

4- à 250°C soit $T = 523^\circ\text{K}$ on obtient $t'_r = 0,53 \text{ mn}$ soit $t_{r=0,82 \text{ mn}}$.

5- $N = 5,54(3,2*60/10)^2 = 2042$ plateaux théoriques et $H = 1830/2521 = 0,90 \text{ mm}$

IV: THÉORIE DYNAMIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE

VI-1: Equation de Van Deemter (1956)

On peut considérer dans le cas de développement d'une évolution d'une petite quantité de composé que l'étalement du pic (de la sonde) au fur et à mesure de sa progression dans la colonne de chromatographie est dû à trois origines indépendantes :

- la résistance au transfert de matière dans chacune des phases ;
- la dispersion des molécules par diffusion
- l'existence de chemins multiples dus au remplissage.

L'équation de **VAN DEEMTER** relie les différentes causes d'élargissement des pics à la vitesse de la phase mobile et à la hauteur équivalente à un plateau théorique (efficacité).

Cette équation est de la forme :

$$H = A + \frac{B}{U} + C \cdot U$$

(eq.2-8)

où u est la vitesse de la phase mobile.

Trois facteurs, représentés par les 3 termes de l'équation 2-8, contribuent à l'élargissement des pics

VI-2.1: Diffusion turbulente. (Terme A)

Suivant la taille et la forme des particules, ils existent pour la phase mobile, plusieurs trajets possibles, cette particularité contribue à l'élargissement des pics

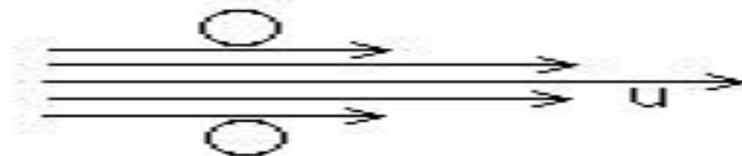


d'où $A = 2 l dp$. l est une constante voisine de 1. dp est le diamètre moyen des particules. Donc, plus les particules sont petites et plus le remplissage est homogène, plus l'efficacité de la colonne augmente.

La contribution de A est nulle pour une colonne capillaire de chromatographie en phase gazeuse.

- VI-2.2: Diffusion longitudinale. (Terme B)

Le terme B/u traduit la dispersion du soluté à cause de la diffusion du soluté dans la colonne.



Par exemple, dans un flux liquide, les molécules au centre du flux progressent plus vite que celles qui sont sur les bords au contact des particules; on a $B = 2 g D_m$ où g est une constante ($g < 1$).

et D_m est le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

Le terme B/u est évidemment inversement proportionnel à u . L'efficacité d'une colonne augmente avec la vitesse de la phase mobile. Ceci peut expliquer les bonnes séparations obtenues en HPLC; de plus, comme le terme D_m est environ 5 fois plus grand en CPG qu'en CPL, il en résulte que la contribution de la diffusion longitudinale est presque négligeable en HPLC.

- VI-2.2 - Résistance au transfert de masse. (Terme C)

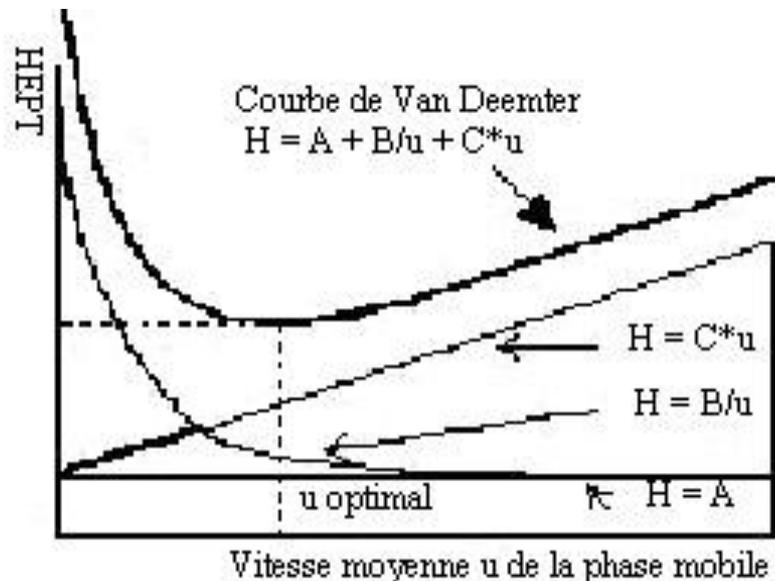
Ce terme C^*u représente la résistance au transfert du soluté entre les phases mobiles et stationnaires, cette résistance empêche l'établissement de l'équilibre entre $S(pm)$ et $S(ps)$. Ce phénomène est dû par exemple au fait que certaines molécules stagnent dans les pores de la phase stationnaire.

Plus la vitesse (u) de la phase mobile diminue, plus les molécules de soluté peuvent pénétrer dans la phase stationnaire, plus l'équilibre entre les 2 phases est favorisé et plus la colonne est performante.

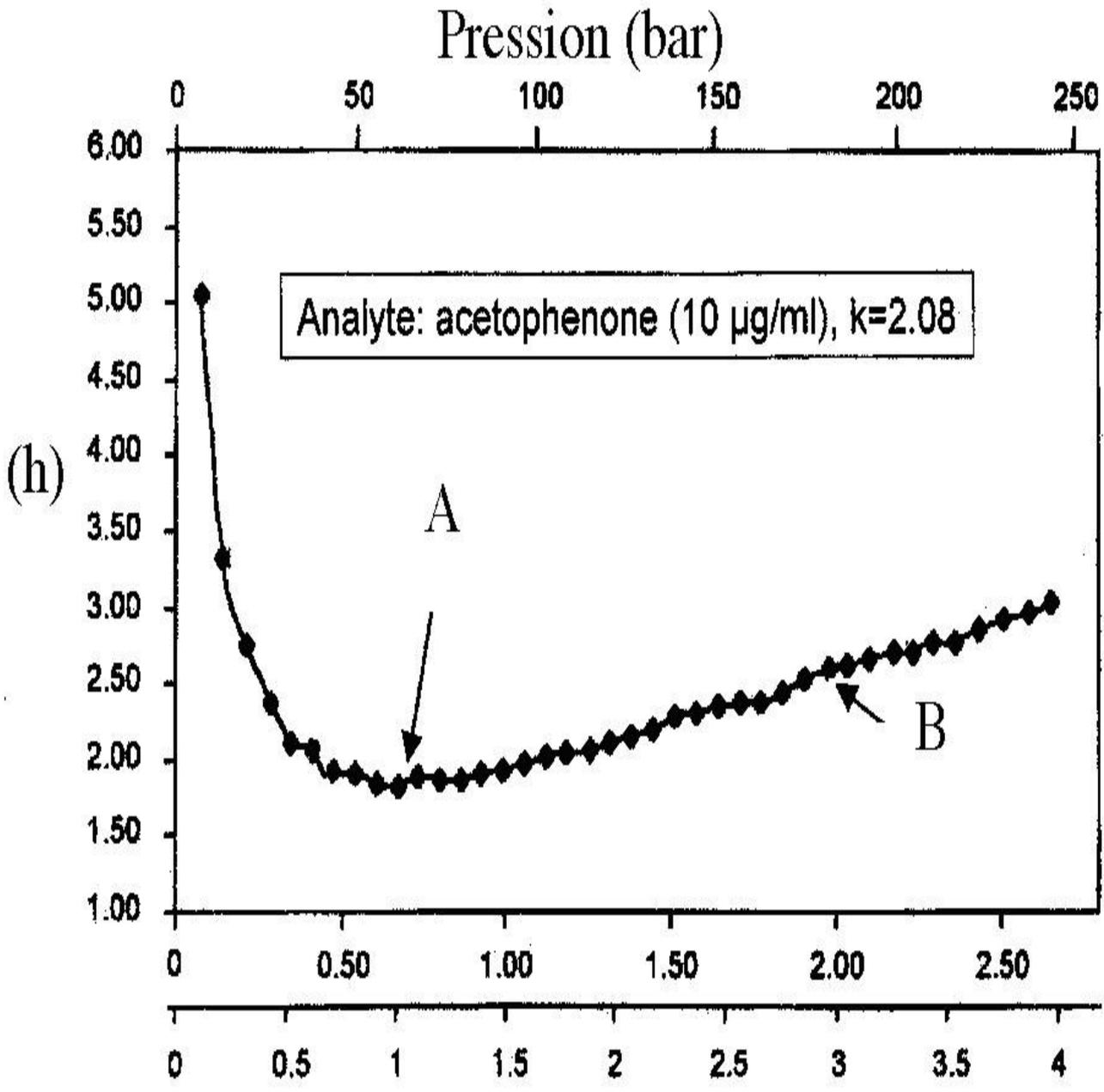
Le terme C est proportionnel à (dp^2/Dm) , les colonnes les plus efficaces seront celles régulièrement remplies et bien tassées où le diamètre des particules est le plus faible possible. Il faut également utiliser des solvants de faible viscosité pour minimiser ce terme

VI-2.3: Courbe de Van Deemter

La représentation graphique de l'équation (eq.2-8) est appelée courbe de Van Deemter



Exemple de courbe de Van Deemter expérimentale : *Exercice d'application 2-2*



OmniSpher 5 C18,
150 x 4.5 mm ID
ACN/H₂O = 50/50 (v/v)
Temp: 35 °C
Injection: 5 µl

Vitesse de la pm
(mm/s)
Débit de la pm
(ml/mn)

Soit une courbe de V.D. expérimentale, obtenue en HPLC, [Int .Lab **30**, 20 (2000)]; en ordonnée est reportée la hauteur de plateau réduite $h = H/d_p$ (où $d_p = 5 \mu\text{m}$ est le diamètre des particules. On considère deux points particuliers A et B sur cette courbe.

1- Au point A (débit = 1 ml/mn, $U = 0,65 \text{ mm/s}$ et $h = 2$), calculer le temps mort et le temps d'analyse.

2- Même question au point B (débit = 2,75 ml/mn, $U = 1,7 \text{ mm/s}$ et $h = 2,5$).

3- Calculer la perte d'efficacité de la colonne entre A et B ($N_{B/NA}$). Conclusion

Solution:

1- $t_m = L/u$ soit $230 \text{ s} = 3,83 \text{ mn}$; $t_A = t_m(1+k')$ = $708 \text{ s} = 11,80 \text{ mn}$

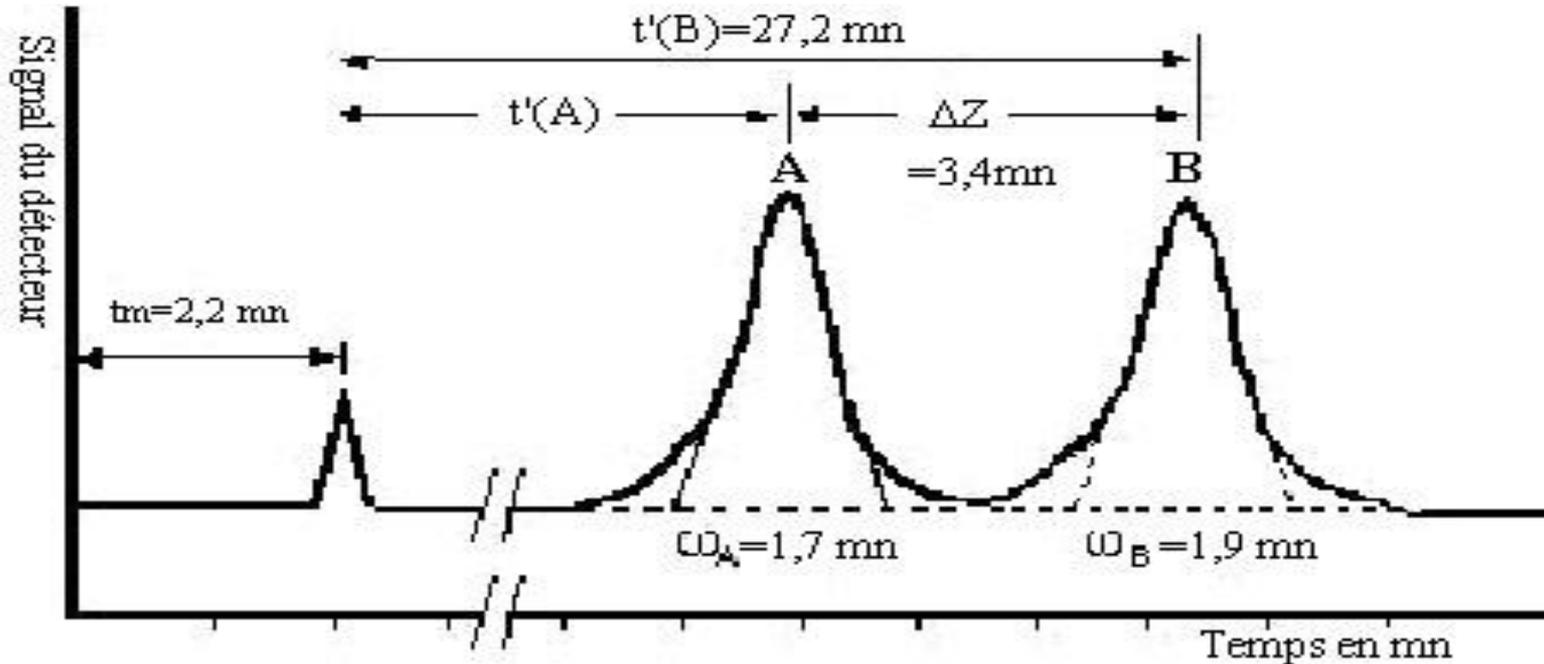
2- $t_m = 88,23 \text{ s} = 1,47 \text{ mn}$; $t_B = 271,76 \text{ s} = 4,5 \text{ mn}$

3- $N_B/N_A = h_A/h_B = 0,8$. En conclusion, N diminue un peu car il est multiplié par 0,8 mais le temps d'analyse diminue énormément car il est divisé par 2,6. Il peut donc s'avérer plus "rentable" de faire l'analyse au point B qu'au point A.

V- FACTEUR DE SÉPARATION DE DEUX PICS

V-1: Définition du facteur de séparation.

Le chromatogramme suivant montre la séparation de 2 solutés A et B.



FigureV-1. Chromatogramme d'un mélange de 2 produits A et B sur une colonne CPG remplie de 3 m

On appelle le facteur de séparation (ou sélectivité) le terme suivant :

$$\alpha = \frac{t'_{r(B)}}{t'_{r(A)}} \quad (\text{équ V-9})$$

dans lequel $t'_{r(B)} > t'_{r(A)}$, on a donc α toujours supérieur ou égal à 1.

Compte tenu de l'équation (eq.2-5), on a l'expression.3-2), où le facteur de séparation s'exprime en fonction des facteurs de rétention. Ce facteur rend donc compte de la "proximité" des pics sans tenir compte de leur forme.

$$\alpha = \frac{k'_{(B)}}{k'_{(A)}} \quad (\text{équ V-10})$$

V-1: Interprétation thermodynamique du facteur de séparation.

En utilisant (eq.V-9), on peut exprimer le facteur de séparation α en fonction des coefficients de partition (ou constantes d'équilibre K) des solutés A et B :

$$\alpha = \frac{k'_{(B)}}{k'_{(A)}} = \frac{K_{(B)}}{K_{(A)}} \quad (\text{équ V-11})$$

L'expression (eq.2-10) permet d'obtenir le facteur de séparation en fonction de la température: $RT \ln a = -(\Delta G^\circ(B) - \Delta G^\circ(A))$ (eq.V-12)

Le terme a traduit donc la différence d'énergie libre de dissolution des solutés A et B. Comme **a** est très voisin de 1, on peut souvent utiliser l'expression simplifiée

$$\ln(a) \approx (a - 1) = -\frac{\partial(\Delta G^\circ)}{RT} \quad ((\text{eq.V-13}):$$

V-2: Définition du facteur de résolution.

Par convention le facteur de résolution **R** des 2 pics **A** et **B** de la figure V-1, s'écrit :

$$R = 2 \left(\frac{t_{r(A)} - t_{r(B)}}{\omega_A + \omega_B} \right) = 2 \left(\frac{t_{r(A)} - t_{r(B)}}{\omega_A + \omega_B} \right) = 2 \left(\frac{\Delta Z}{\omega_A + \omega_B} \right) \quad (\text{eq.V-14}):$$

Si on fait apparaître la largeur à mi-hauteur **d**, on a :

$$R = 1,18 \left(\frac{t_{r(A)} - t_{r(B)}}{\delta_A + \delta_B} \right) \quad \text{éq. V-15}$$

Contrairement à α le terme R prend en compte la forme des pics et leur recouvrement éventuel.

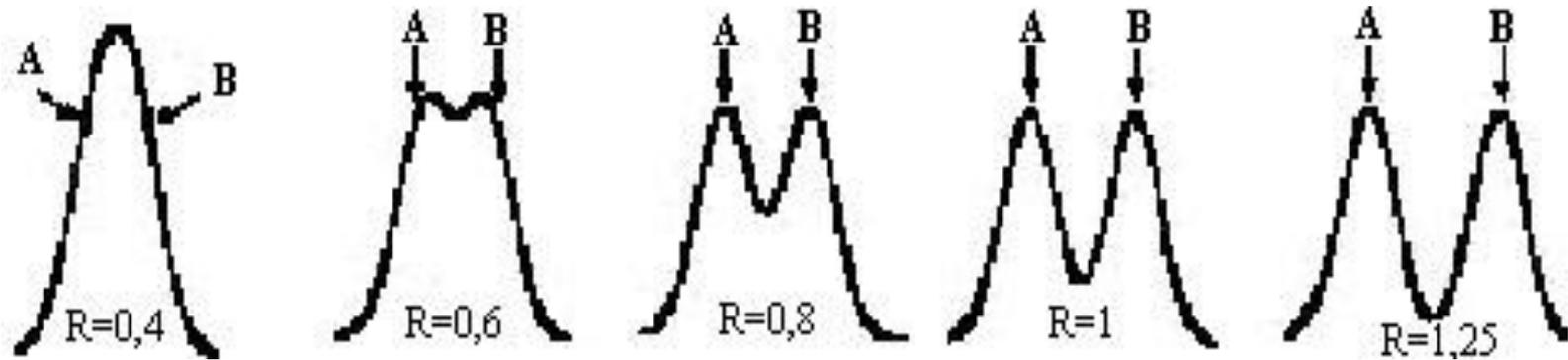


Figure V-2. Influence du terme R sur la séparation de deux pics d'intensité égale

La figure V-2 montre l'influence de la résolution R sur la séparation de 2 pics de même intensité. Pour une résolution inférieure à 0.6 les pics ne sont pas séparés. En pratique une bonne résolution suppose que $R \geq 1,5$

Dans le cas de 2 pics **A** et **B** très proches ($trA \approx trB$ et $wA \approx wB$), en combinant les expressions (eq.2-4), (eq.3-1) et (eq.3-6), on obtient la **relation de Purnell**, une expression de la résolution R en fonction des 3 termes suivants à peu près indépendants les uns des autres :

- 1-du nombre de plateaux théoriques N (donc de l'efficacité de la colonne),
- 2-du facteur de séparation α (donc de la "proximité" des pics) et
- 3-du facteur de rétention k' (donc des temps de rétention des pics),

$$R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right) \sqrt{N_B} \quad \text{eq v- 16}$$

Annexe: Démonstration de la formule de Purnell.

$$R = 2 \frac{t_{(B)} - t_{(A)}}{\omega_{(A)} + \omega_{(B)}} = \frac{t_{(B)} - t_{(A)}}{\omega} \quad \text{car } \omega_A \approx \omega_B = \omega \text{ et en posant } t_{(A)} = tr_{(A)} \\ \text{et } t_{(B)} = tr_{(B)}$$

$$N_B = \frac{16t_{(B)}^2}{\omega^2} \quad \text{d'où} \quad \frac{1}{\omega} = \frac{1}{4} \sqrt{N_B} \frac{1}{t_{(B)}} \quad \text{et} \quad R = \frac{1}{4} \sqrt{N_B} \frac{t_{(B)} - t_{(A)}}{t_{(B)}}$$

comme $t_{(B)} = tr_{(B)} = tm(1 + k'_B)$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_B} \frac{t_{(B)} - t_{(A)}}{t_m(1 + k'_B)} \quad \text{en multipliant par} \quad \frac{t_{(B)} - t_m}{t_{(B)} - t_m} \quad \text{on obtient}$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_B} \frac{t_{(B)} - t_{(A)}}{t_m (1 + k'_B)} \times \frac{t_{(B)} - t_m}{t_{(B)} - t_m} \quad \text{d'où}$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_B} \frac{t_{(B)} - t_{(A)}}{t_{(B)} - t_m} \times \frac{k'_B}{(1 + k'_B)} \quad \text{Or}$$

$$\frac{t_{(B)} - t_{(A)}}{t_{(B)} - t_m} = \frac{t_{(B)} - t_m}{t_{(B)} - t_m} - \frac{t_{(A)} - t_m}{t_{(B)} - t_m} = \left(1 - \frac{1}{\alpha}\right) = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)$$

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

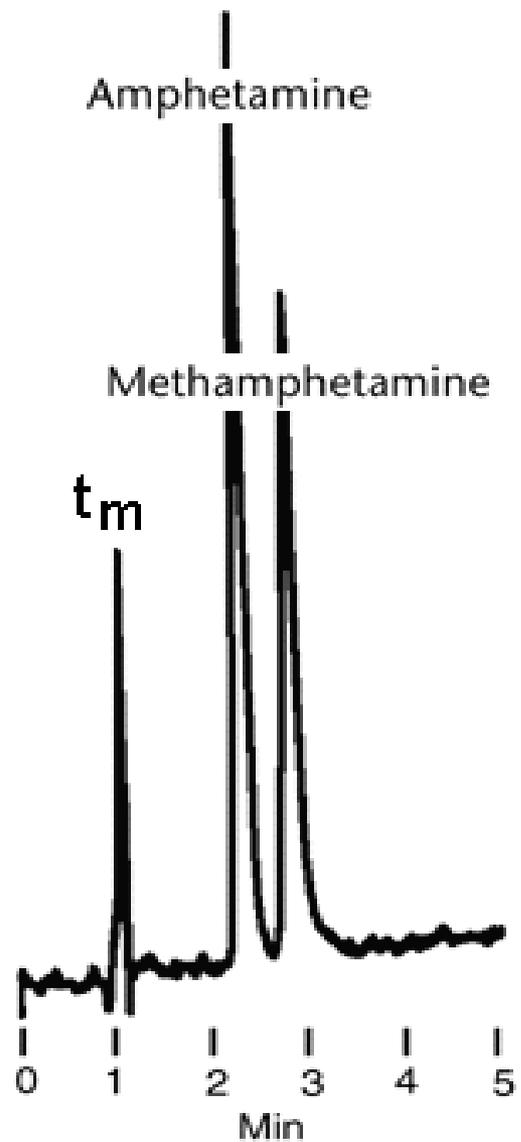
eq v- 16

EXERCICE D'APPLICATION

Sur une colonne HPLC (phase stationnaire : C18), 15cm x 4,6mm, remplie de particules de 5 μ m, avec l'acétonitrile (CH₃CN) comme phase mobile et à une température de 30°C, on mesure un temps mort t_m de 1,07 mn.

Dans ces conditions, on obtient la séparation ci-contre entre les 2 amphétamines :

- Amphétamine (A) : temps de rétention = 2,40 min, largeur du pic à mi-hauteur $\delta = 5$ sec.
- Méthamphétamine (M) : temps de rétention = 2,85 min, largeur du pic à mi-hauteur $\delta = 6$ sec.



- 1- Calculez le facteur de séparation α
- 2- Calculez le facteur de résolution R
- 3- Évaluez le nombre de plateau théorique de la colonne N

4- Calculez la différence d'énergie libre de dissolution d (G) entre ces 2 produits dans la phase stationnaire ($R = 8,31 J K^{-1} mol^{-1}$)

Solutions:

1- $k'(A) = 1,243$ et $k'(M) = 1,664$ d'où $a = 1,338$.

2- $R = 1,118$

3- $N = 5390$ plateaux théoriques d'après Purnell

4- $d \Delta (G) = -RT \ln(a) = -733 \text{ J /mol}$