



*Université Akli Mohand Oulhadj – Bouira*



Faculté des Sciences de la nature et de vie et des sciences de la terre

Département: Agronomie

Niveau : 3<sup>ème</sup> année Licence Technologie Alimentaire et Contrôle de la Qualité

# Module: Techniques d'analyses

## Partie II: Méthodes chromatographiques

Présenté par : Mme BOURFIS N.

# 1. Introduction

La chromatographie est un procédé de **séparation** des constituants d'un mélange.

C'est la méthode la plus importante pour l'analyse **qualitative** et **quantitative** des mélanges **homogènes liquide** ou **gazeux**.

## 2. Principe de la chromatographie

Le principe de la chromatographie repose sur l'équilibre de concentrations des composés (soluté S) présents entre deux phases non miscibles dont l'une est dite stationnaire (fixée sur un support) et l'autre dite mobile (gaz ou liquide) qui se déplace.

La séparation est basée sur **l'entraînement à des vitesses différentes** des constituants du mélange par la phase mobile conduit à la séparation de ce mélange.

### **3. Classification des méthodes chromatographiques**

On peut classer les méthodes chromatographiques de trois manières:

- selon la nature des phases
- selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation
- selon la technologie mise en oeuvre.

#### **3.1. Classification selon la nature des phases**

**Selon la nature de la phase mobile on distingue:**

- la chromatographie en phase liquide CPL
- la chromatographie en phase gazeuse CPG

**Selon la nature de la phase stationnaire on distingue:**

- la chromatographie gaz / solide CGS
- la chromatographie gaz / liquide CGL
- la chromatographie liquide / solide CLS
- la chromatographie liquide / liquide CLL

### 3.2. Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu

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

#### a. La chromatographie d'adsorption

La séparation entre les molécules est fondée sur le **processus d'adsorption** et **désorption** par la phase stationnaire. Dans les premières études les phases stationnaires « modèles d'études » étaient la silice et la cellulose (solide). Il s'agit d'une **chromatographie liquide-solide**.

#### b. La chromatographie de partage

La séparation est fondée sur les **différences de solubilité** des molécules à séparer entre phase mobile et phase stationnaire **liquide** (phase qui imprègne ou qui est greffée sur un solide). Il s'agit alors de **chromatographie liquide-liquide** (CLL).

#### c. La chromatographie d'échange d'ions

La phase stationnaire est **un solide** à la surface du **quel se trouvent** des groupements **ionisés**. La rétention des solutés ce fait grâce **à des interactions de type ioniques**.

#### d. La chromatographie d'exclusion

La phase stationnaire est **un solide** poreux les molécules sont séparé selon **leur forme** et leur **masse moléculaire**.

#### e. La chromatographie d'affinité

Elle consiste à fixer par exemple une enzyme sur la **phase stationnaire**

### 3.3. Classification selon la technique mise en jeu

Selon le support de la chromatographie on distingue:

#### ➤ La chromatographie sur colonne

En chromatographie sur colonne, la phase stationnaire est **maintenue** dans un tube et la phase mobile progresse par **gravité** ou sous l'action d'une **différence de pression**.

#### ➤ La chromatographie planaire (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

La phase stationnaire est présentée à la surface d'un support.

## 4. Grandeurs fondamentales et définitions

### 4.1. Notion de temps

#### 4.1.1. Temps de rétention $t_r$

Le temps de rétention  $t_r$  qui représente le temps écoulé entre **l'instant de l'injection** et celui qui correspond sur **le chromatogramme au maximum du pic** qui lui est lié.

Le temps de rétention est indépendant de la quantité injectée.

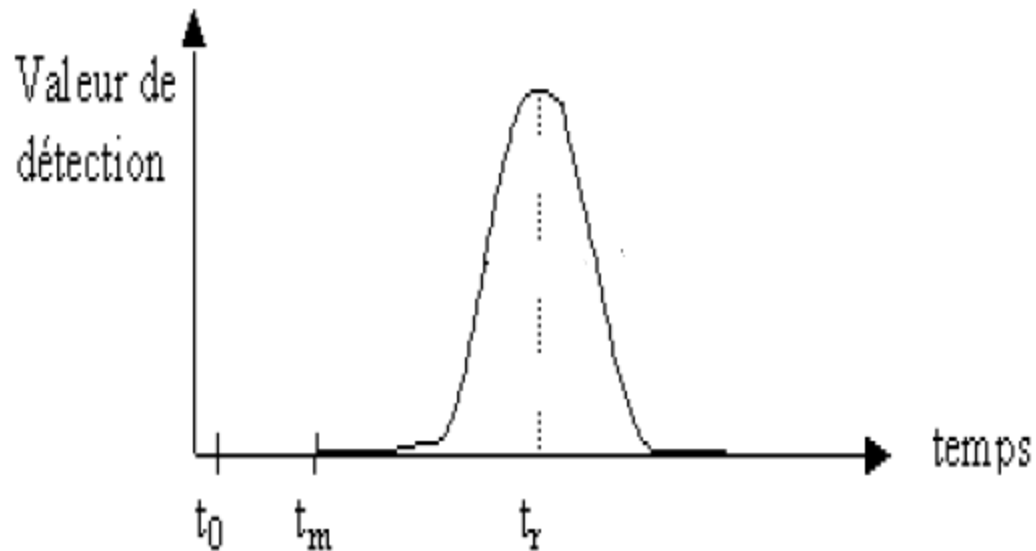
#### 4.1.2. Temps mort $t_m$

Le temps mort  $t_m$  est le temps mis par un soluté non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).

### 4.1.3. Temps de rétention réduit $tr'$

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du soluté  $tr'$ . En d'autres termes c'est le **temps passé** par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$tr' = tr - tm$$



**Caractéristique d'un pic d'éluion en chromatographie**

## 4.2. Notion de volume

### 4.2.1. Volume de rétention $V_r$ ou volume d'élution

Le volume de rétention  $V_r$  de chaque soluté représente le **volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne.**

Il correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic.

$$V_r = t_r \cdot D \quad (\text{D: débit de la phase de la phase mobile})$$

### 4.2.2. Volume d'un pic, $V_{pic}$ .

Il correspond au volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne.

$$V_{pic} = \omega \cdot D$$

( $\omega$  : correspond à la largeur du pic à la base).

### **4.2.3. Volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort $V_m$ )**

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort)  $V_m$  correspond au volume interstitiel accessible. Il peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire.

On peut l'exprimer en fonction de  $t_m$  et du débit  $D$  :  **$V_m = t_m \cdot D$**

### **4.2.4. Volume de la phase stationnaire**

Ce volume désigné par  $V_s$  n'apparaît pas sur le chromatogramme. Dans les cas simples on le calcule en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.



### 4.3. Notion de concentration

➤ En chromatographie chaque soluté injecté dans la colonne est soumis à deux effets antagonistes : un effet d'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble et un effet de rétention avec la phase stationnaire avec laquelle il interagit. On caractérise la distribution de chaque soluté entre les deux phases par le coefficient de partage ou coefficient de distribution.

#### ➤ 4.3.1. Coefficient de partage

➤ A un instant donné, le soluté est à la concentration  $C_m$  dans la phase mobile et  $C_s$  dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage  $K$ .

$$K = C_s / C_m$$

➤ Lorsque le soluté n'a aucune affinité avec la phase stationnaire,  $C_s$  est nulle, donc  $K=0$ . Le soluté n'est pas retenu dans la colonne si la phase mobile est très différente du solvant d'injection, il y'a un risque de faire précipiter le soluté en tête de colonne, donc de la boucher. Dans ce cas le soluté peut ne jamais sortir du système chromatographique. Ce qui veut dire que la  $C_m$  ne peut pas être nulle. Le coefficient de partage est fonction de trois types d'affinités :

- celle entre le soluté et la phase mobile
- celle entre le soluté et la phase stationnaire
- mais aussi celle entre les phases stationnaire et mobile.

### 4.3.2. Facteur de capacité $K'$

Le facteur de capacité  $K'$  est le rapport de la quantité d'un même soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = C_s / C_m \times V_s / V_m = K (V_s / V_m)$$

$V_s$  : volume de la phase stationnaire  $V_m$  : volume de la phase mobile ou volume mort  
 *$K'$  est un paramètre très important en chromatographie. Il est défini en régime isocratique. Ce n'est pas une constante, bien qu'il ne varie pas avec le débit ou la longueur de la colonne, car il dépend des conditions opératoires. Ce paramètre rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque composé (capacité). Dans la mise au point des séparations on fait en sorte que  $K'$  ne dépasse pas 10, afin de ne pas trop allonger le temps de passage des composés.  $K'$  est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.  $K'$  peut être déterminé expérimentalement par l'équation suivante :*

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

Le temps de rétention est ainsi lié au facteur de capacité par la relation :

$$t_r = t_m (1 + K')$$

le volume de rétention  $V_r$  d'un soluté pourra s'écrire :  
st fin

$$V_r = V_m (1 + k)$$

$$V_r = V_m + K V_s$$

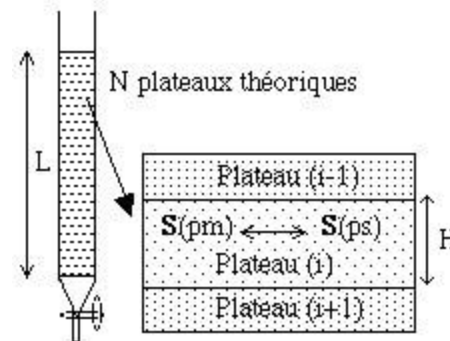
## 4.4. Notion d'efficacité

### 4.4.1. Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

La **largeur d'un pic** est caractéristique de l'**efficacité de la séparation** : plus le **pic est fin** plus la **chromatographie est efficace**. L'efficacité est mesurée par le nombre de **plateaux théorique**  $N_{th}$ .

### 4.4.2. Model des plateaux théoriques

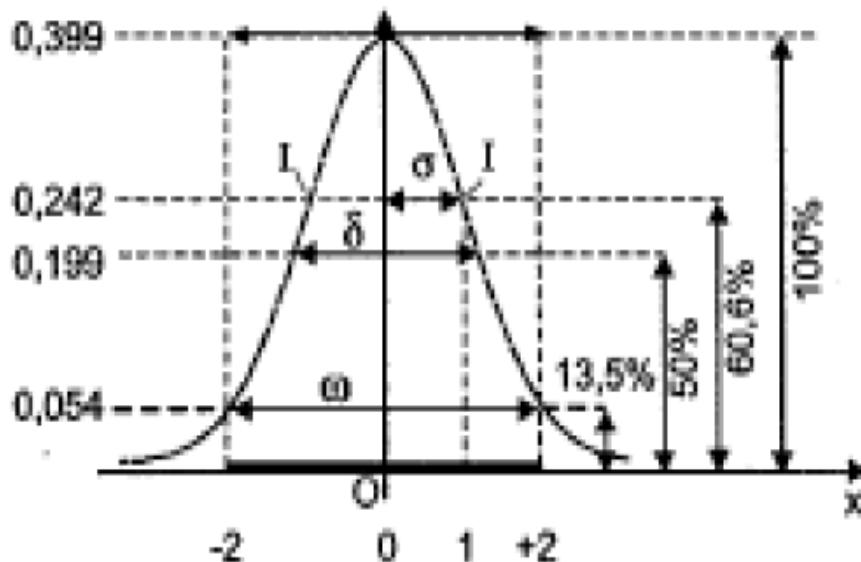
Une colonne de  $N$  plateaux théoriques est une colonne divisée en  $N$  petits disques cylindriques successifs. On admet que la phase mobile progresse non pas de façon continue, mais par sauts successifs d'un plateau théorique à l'autre. Dans chaque plateau théorique, on observe une rétention du soluté  $S$ , 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



**Figure 2. Model des plateaux théoriques**

Il existe une relation entre le nombre de plateaux théoriques  $N$  et au temps de rétention:  $Ns^2=(tr)^2$

$N$  augmente donc avec le temps de rétention et diminue si la largeur des pics ( $s$ ) augmente. 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. Sur le chromatogramme,  $s$  représente la demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur et  $tr$  le temps de rétention du composé.  $tr$  et  $s$  doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant). Si on exprime  $s$  en unités de volume (en faisant intervenir le débit)



$$\begin{aligned} \delta &= 2,35 \sigma \\ \omega &= 4 \sigma \\ \omega &= 1,7 \delta \end{aligned}$$

l'aire comprise entre -2 et +2  
vaut 95,4% de l'aire totale  
comprise entre la courbe et  
l'axe des x

**4s** correspond au « **volume du pic** » soit 95 % du composé injecté. Par suite des propriétés de la courbe de Gauss ( $\omega = 4s$ ), il en résulte l'équation

$$N = 16 \text{ tr } 2 / \omega^2$$

Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée : on utilise de préférence la formule.

$$N = 5,54 \text{ tr } 2 / \delta^2$$

#### 4.4.3. Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

N est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait d'utiliser  $N_{eff}$  (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{eff} = 16 \frac{tr'^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{tr'^2}{\delta^2}$$

#### 4.4.4. Hauteur équivalent à un plateau théorique H

Connaissant la longueur L de la colonne et le nombre de plateaux théoriques N on définit une Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT ou H).

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

**Remarque:** La HEPT permet de comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs. Elle est fonction de différents paramètres qui eux-mêmes sont susceptibles de varier avec la vitesse de la phase mobile.

## 5. Qualité de la séparation

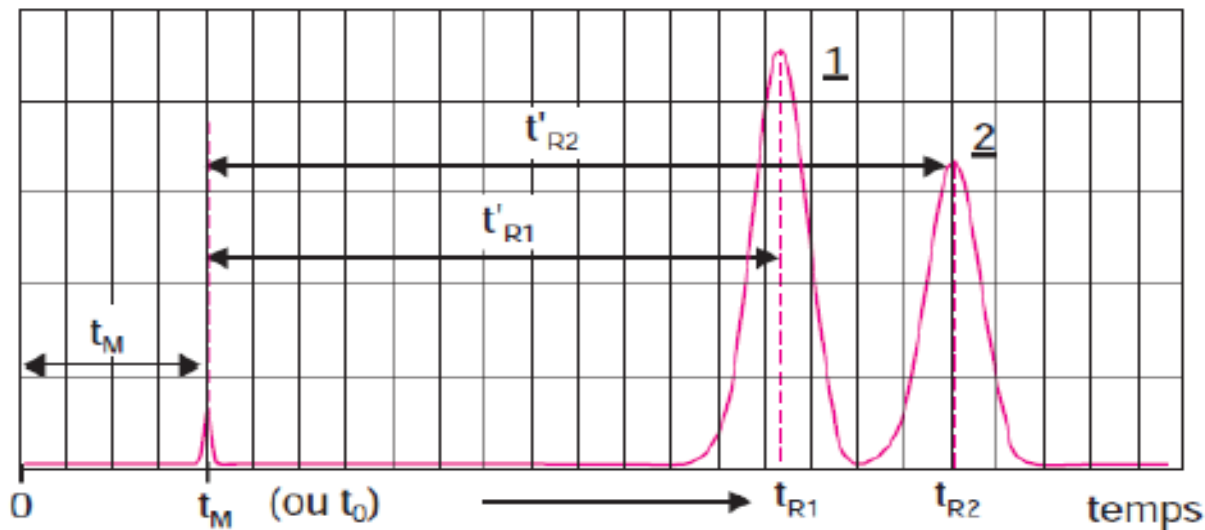
### 5.1. Sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité :

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{K'_2}{K'_1}$$

Le facteur de sélectivité mesure la différence de distribution thermodynamique des deux composés. On démontre que si  $\Delta(\Delta G^\circ) = \Delta G^\circ_2 - \Delta G^\circ_1$  (différence des énergies libres de distribution des deux composés) on a :

$$\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \ln \alpha$$



ici, on a :

$$k_1 = \frac{t'_{R1}}{t_M} \quad k_1 = 3,08$$

$$k_2 = \frac{t'_{R2}}{t_M} \quad k_2 = 4$$

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad \alpha = 1,3$$

**Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents.**

## • 5.2. Résolution

- Si dans certaines conditions, deux constituants sortent à des temps proches, leurs pics risquent de se chevaucher. En optimisant les conditions analytiques, il est possible d'améliorer l'allure du chromatogramme. Le paramètre de résolution R quantifie la qualité de cette séparation. Bien qu'on la mesure, en général, sur deux pics contigus, elle peut être calculée sur n'importe quel couple de pics.

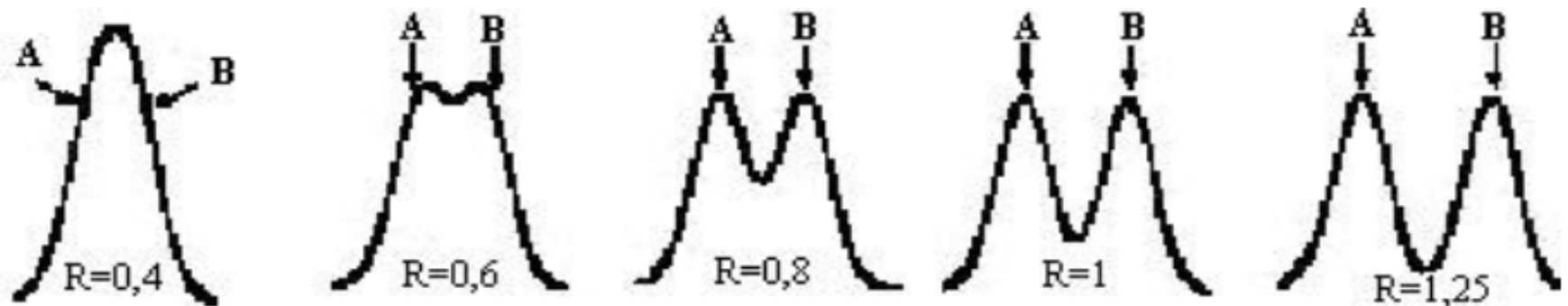
$$R = 2 \frac{tr_2 - tr_1}{\omega_1 + \omega_2}$$

$R < 1$  : mauvaise résolution

$1 < R < 1,4$  : résolution acceptable

$1,4 < R < 1,6$  : résolution optimale

$R > 1,6$  : résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé



**Influence du terme R sur la séparation de deux pics d'intensité égale**



## 6. Notion de pression

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement. Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée. En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression plus la granulométrie de la phase stationnaire est faible. En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars. La perte de charge qui est la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne est donnée par *la loi de Darcy* :

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L u}{D^2}$$

$\Phi$  (sans dimension) facteur de résistance à l'écoulement ;

$D$  (m) diamètre moyen des particules ;

$\eta$  (Pa . s) viscosité ;  $L$  (m) longueur de la colonne ;

$u$  (m . s<sup>-1</sup>) vitesse de la phase mobile.

#### 4.4.5. Modèle cinétique de la chromatographie

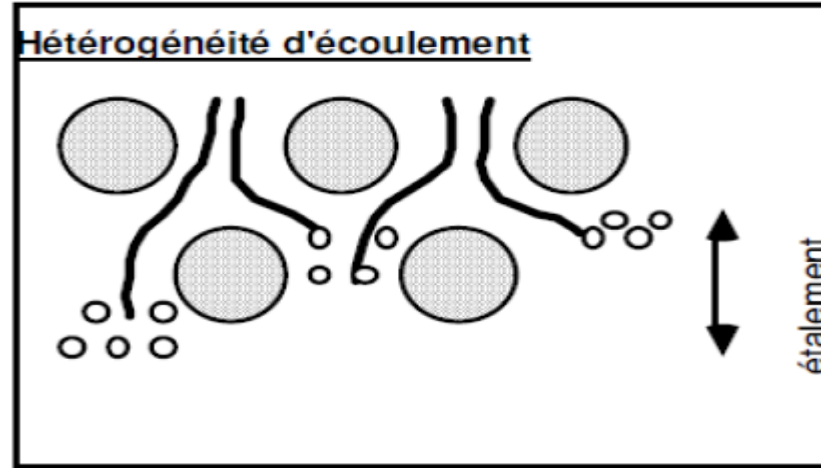
Ce modèle issu de la mécanique des fluides a été mis au point par Van Deemter. En 1956, ce physicien a mis au point l'équation qui relie H (HEPT) aux caractéristiques physiques de la colonne et de la phase mobile.

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

Trois facteurs, représentés par les 3 termes, contribuent à l'élargissement des pics.

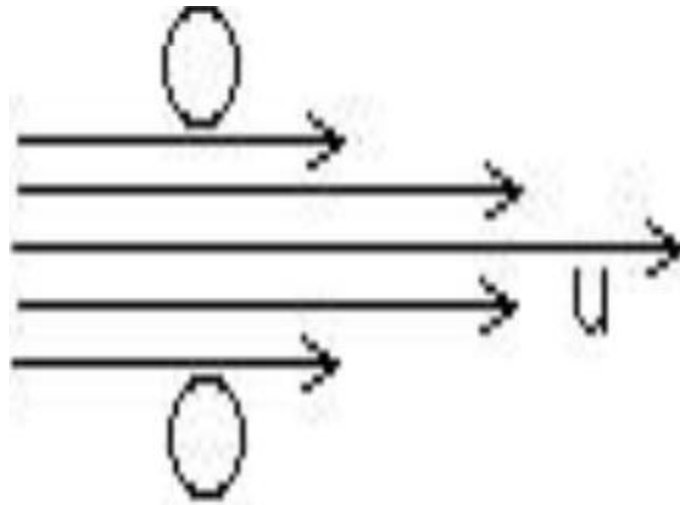
## Diffusion turbulente (Terme A)

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  $A = 2 I_{dp}$ .  $I$  est une constante voisine de 1.  $d_p$  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.



## Diffusion longitudinale (Terme B)

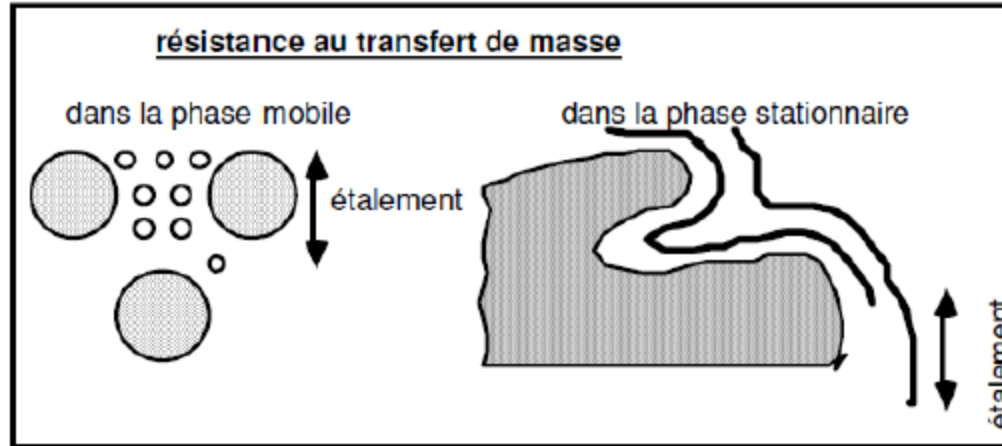
Le terme  $B/u$  traduit la dispersion du soluté à cause de la diffusion du soluté dans la colonne. Par exemple, dans un flux liquide, les molécules au centre du flux progressent plus vite que celles qui sont sur les bords au contact des particules; on a  $B = 2 g D_m$  où  $g$  est une constante ( $g < 1$ ). 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.

## . 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.



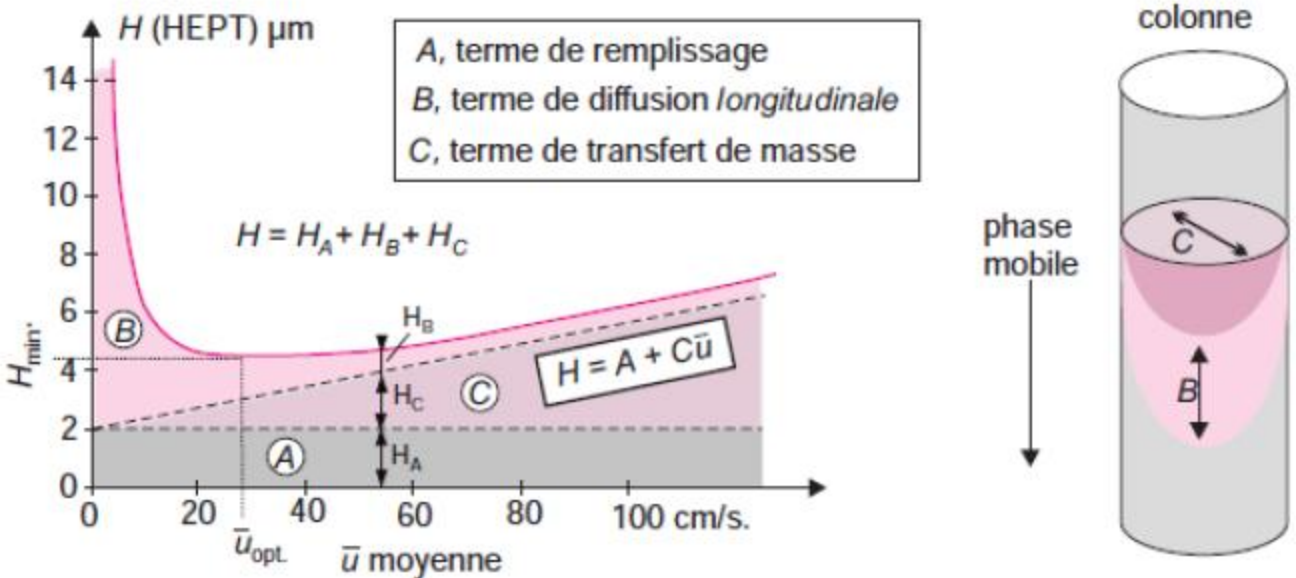
Plus la vitesse ( $u$ ) de la phase mobile diminue, plus les molécules de soluté peuvent pénétrer dans la phase stationnaire, plus l'équilibre entre les 2 phases est favorisé et plus la colonne est performante.

Le terme  $C$  est proportionnel à  $(d_p^2/D_m)$ , 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.

• **4.4.6. Courbe de Van Deemter**

La représentation graphique de l'équation précédente est appelée courbe de Van Deemter. L'analyse de cette courbe montre l'existence d'un débit optimal de phase mobile pour lequel l'efficacité de la colonne est maximum (HEPT minimum). Réduire le débit de la phase mobile en deçà de ce débit optimal peut diminuer fortement le pouvoir séparatif d'une colonne, surtout en CPG où la contribution du terme  $B/u$  est importante. Contrairement à la CPG, en HPLC au-dessus du débit optimal, l'efficacité de la colonne est pratiquement indépendante du débit de la phase mobile. Ceci permet de raccourcir les temps d'analyse, sans perdre trop de pouvoir de séparation.

Ils existent d'autres formulations de l'équation de Van Deemter plus adaptées à la HPLC



Les trois coefficients numériques expérimentaux A, B et C sont reliés à divers paramètres physico-chimiques, à la colonne et aux conditions opératoires. Si on choisit d'exprimer H en cm, A sera en cm, B en  $\text{cm}^2/\text{s}$  et C en s (la vitesse étant en  $\text{cm}/\text{s}$ ).

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire.