

Chromatographie : aspects théoriques

Manon LECONTE - ENS de Lyon

Dernière mise à jour : 3 juillet 2020

Merci à Théodore Olla, Margaux Roux et Joachim Galiana pour leur précieuse aide.

Mots-clés : chromatographie, facteur de rétention, efficacité, équation de van Deemter, sélectivité, résolution, étalonnage interne, étalonnage externe.

Niveau : L3

Pré-requis :

- Chromatographie d'adsorption (CCM, chromatographie sur colonne) [L1]
- Dosage par étalonnage [L1]
- Diffusion [L2]
- Caractéristiques d'une gaussienne (écart-type, largeur à mi-hauteur, largeur de pic) [L1]

Bibliographie :

- Définition IUPAC de chromatographie (*chromatography*) [Niveau : ★]
- Skoog, *Chimie analytique* [Niveau : ★★]
- Rouessac, *Analyse chimique*, chap. 1 [Niveau : ★★]

Plan proposé

I - Allure du chromatogramme	1
A/ Grandeurs de rétention	1
B/ Efficacités théorique et réelle	2
C/ Influence de la vitesse : équation de van Deemter	3
II - Comparaison de l'élution de deux composés	4
A/ Séparation ou sélectivité	4
B/ Résolution	4
III - Analyse quantitative par chromatographie	5
A/ Etalonnage externe	5
B/ Etalonnage interne	5

Introduction pédagogique

Le cours s'inscrit dans une séquence de chimie analytique ayant pour but de préparer les élèves à des techniques de routine qu'ils pourraient utiliser en stage de fin de licence mais qu'ils n'auraient pas pu utiliser en travaux pratiques pendant leur formation. On aura ainsi pu aborder notamment la spectrométrie de masse ou des techniques de RMN plus sophistiquées (RMN du carbone, RMN 2D). Ce cours sera suivi d'un cours plus pratique sur la chromatographie de partage, où les techniques de CPV et de HPLC seront présentées.

On se focalise ici sur la chromatographie sur colonne.

Le choix est fait de ne pas présenter en détail le modèle des plateaux, afin de ne pas embrouiller les élèves en leur expliquant par la suite qu'il est obsolète. On définit directement les grandeurs utiles, que les élèves doivent comprendre et retenir.

Difficultés :

- il s'agit d'un cours assez théorique, portant pourtant sur une méthode d'analyse chimique. Ce décalage pourrait perturber les élèves ;
- discerner efficacité, séparation (ou sélectivité) et résolution.

Exemples de TD : déterminer une résolution, une efficacité, ... à partir d'un chromatogramme et de données sur la colonne.

Introduction

Définition – Chromatographie : méthode de séparation physique d'un mélange dont les composés sont répartis entre une phase stationnaire et une phase mobile.

On doit la première chromatographie à Mikhail Tswett au début du XX^{me} siècle. Il parvient à séparer la chlorophylle et d'autres pigments végétaux sur une colonne de carbonate de calcium, en ajoutant en tête de colonne des solvants plus ou moins polaires.

Aujourd'hui, on utilise cette technique de séparation et d'analyse en routine au laboratoire. On cherche alors à séparer au mieux les différents constituants d'un mélange dans une **colonne de chromatographie**, sans pour autant que la durée de la chromatographie ne soit trop longue. Pour pouvoir évaluer de la qualité de la séparation, il est nécessaire d'introduire un certain nombre de notions.

Objectifs – Evaluer la qualité d'un chromatogramme.

Déterminer les proportions d'un mélange par une méthode d'étalonnage.

I - Allure du chromatogramme

A/ Grandeurs de rétention

Considérons le chromatogramme de la figure 1.

Une méthode de détection propre à la colonne attribue au passage d'un composé un pic. Le but de la technique de séparation est de jouer sur le **temps de rétention** de chaque composé dans la colonne (temps que le composé prend pour parcourir la colonne). Pour différencier les rétentions de chaque composé sur la colonne, on considère plutôt

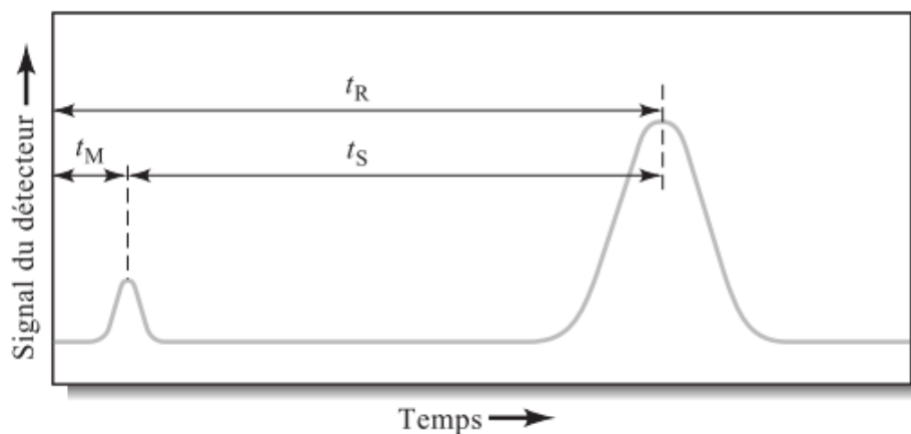


Figure 1 – Schéma d'un chromatogramme (Source : Skoog (p. 924)).

le **temps de rétention réduit**, différence du temps de rétention et du **temps mort** (temps de parcours de la colonne pour des composés qui ne sont pas du tout retenus par la phase stationnaire).

On définit ensuite le **facteur de rétention** (ou facteur de capacité) comme la faculté de la colonne à retenir un composé. Il quantifie la répartition du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile :

$$k = \frac{n_S}{n_M} = \frac{c_S V_S}{c_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M} = \frac{K}{\beta} \quad (1)$$

K est la constante de distribution de Nernst du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile. On définit β le **rapport de phase** comme le rapport des volumes de phases mobile et stationnaire. Il dépend ainsi de la conception de la colonne et est toujours indiqué par le constructeur.

On peut réécrire le facteur de répartition à partir du temps de rétention et du temps mort :

$$k = \frac{t_S}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2)$$

| Application numérique – Exercice 2 du Rouessac.

Généralement, on cherche à ce que k soit proche de 5 pour obtenir un bon compromis entre séparation efficace et durée de l'analyse raisonnable.

Remarque – On peut faire le lien avec la CCM et le rapport frontal. On peut considérer que $R_f = \frac{1}{k}$. Ainsi, un bon rapport frontal pour le composé d'intérêt est proche de 0,2.

B/ Efficacités théorique et réelle

Au cours de l'élution, la zone sur laquelle le composé d'intérêt est réparti s'élargit.

On définit donc l'**efficacité théorique** d'une colonne :

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2} = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2} \quad (3)$$

où σ est l'écart-type du pic du composé et $\delta = 2,35\sigma$ la largeur à mi-hauteur du pic.

Pour faciliter la comparaison entre deux colonnes de constitutions différentes, on préférera comparer leurs **efficacités réelles** :

$$N_{eff} = \frac{t_S^2}{\sigma^2} = 5,54 \frac{t_S^2}{\delta^2} \quad (4)$$

Dans la littérature, on pourra ainsi retrouver des valeurs d'efficacités réelles tabulées ou des hauteurs de plateau effectif, indépendantes de la longueur de la colonne :

$$H_{eff} = \frac{L}{N_{eff}} \quad (5)$$

Remarque – La notion de hauteur de plateau théorique ou effectif repose sur le modèle des plateaux de Craig. Ce modèle a tenté de faire un parallèle entre la chromatographie et la distillation, ce qui valut à Martin et Syngé un Prix Nobel de chimie en 1952. Cependant, ce modèle s'est rapidement avéré obsolète. On continue à utiliser les termes qui en découlent par habitude, bien que leurs noms ne correspondent pas à la réalité physico-chimique.

C/ Influence de la vitesse : équation de van Deemter

Intuitivement, on peut deviner que l'élargissement des pics du chromatogramme sera d'autant plus important que la vitesse de la phase mobile est faible. Van Deemter a ainsi modélisé l'influence de la vitesse de la phase mobile, si elle est gazeuse, sur l'efficacité, pour une colonne remplie.

Définition – **Equation de van Deemter** : relation entre la hauteur équivalente à un plateau théorique H et la vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile \bar{u} :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (6)$$

Chaque terme de cette équation désigne des causes de l'élargissement des pics (voir les schémas du Rouessac (p. 19)) :

- A : **terme de remplissage**. Les particules dans la colonne sont réparties plus ou moins régulièrement. Il y a donc une infinité de chemins permettant de parcourir la colonne qui possèdent des longueurs différentes. Le temps de rétention d'un même composé peut ainsi varier en fonction du chemin pris ;
- $\frac{B}{\bar{u}}$: **terme de diffusion longitudinale**. Au cours de l'élution, les composés peuvent diffuser, bien que ce phénomène soit lent. La diffusion sera d'autant plus visible qu'on lui laisse le temps d'avoir lieu. Ainsi, plus la vitesse de la phase mobile est faible, plus on observe de diffusion et plus le terme de diffusion est important : l'efficacité de la séparation est ainsi réduite ;

- $C\bar{u}$: **terme de transfert de masse**. Plus la vitesse linéaire moyenne d'écoulement est rapide, plus le profil de vitesse de la colonne est important. Ainsi, les composés au centre de la colonne migreront plus vite que ceux situés sur les bords. On perd ainsi en efficacité de séparation.

On comprend alors qu'il existe une vitesse linéaire moyenne optimale permettant de minimiser la hauteur de plateau théorique et donc de maximiser l'efficacité de la colonne (tracé de la courbe de van Deemter dans le Rouessac (p. 19)).

Remarque – L'équation de Golay modélise de manière similaire les colonnes capillaires de CPV :

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (7)$$

L'équation de Knox permet de modéliser les colonnes de chromatographie liquide :

$$H = A\bar{u}^{1/3} + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (8)$$

II - Comparaison de l'élution de deux composés

A/ Séparation ou sélectivité

La séparation ou la sélectivité d'une chromatographie permet de décrire à quel point deux composés sont différemment élués sur une même colonne et s'ils peuvent donc être séparés.

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{S,2}}{t_{S,1}} \quad (9)$$

On en déduit que la séparation est indépendante de la géométrie et du remplissage de la colonne. Elle peut facilement être calculée à partir d'un chromatogramme.

Application numérique – Exercice 6b du Rouessac.

B/ Résolution

La résolution permet d'évaluer la qualité de la séparation entre deux composés.

$$R = 2 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{\omega_1 + \omega_2} \quad (10)$$

où $\omega = 1,7\delta$ est la largeur à la base du pic.

Application numérique – Exercice 6b du Rouessac.

Une résolution est considérée comme satisfaisante si elle est supérieure ou égale à 1,5 (voir Rouessac (p. 17)).

On peut augmenter la résolution d'un chromatogramme en augmentant la longueur de la colonne (voir Rouessac (p. 18)). Néanmoins, cela allonge grandement la durée de l'analyse. En choisissant une résolution pas trop grande, on peut trouver un bon compromis pour l'analyse.

III - Analyse quantitative par chromatographie

I Source – Rouessac

On ne peut directement accéder aux proportions relatives d'un mélange à partir d'un chromatogramme. En effet, l'intensité et l'aire d'un pic sont proportionnelles à la masse injectée de l'espèce en question. On ne peut donc comparer deux pics que si les molécules ont la même masse molaire (par exemple deux régioisomères, cf. nitration du toluène).

Dans la plupart des cas, on a recours à une méthode d'étalonnage.

A/ Etalonnage externe

On réalise deux chromatogrammes sans modifier les conditions de réglage. Le premier est celui du mélange à analyser, le second est celui du composé d'intérêt de référence (solution commerciale) de concentration connue.

On peut alors comparer les aires des pics du composé d'intérêt sur les deux chromatogrammes puisqu'ils auront le même débit massique. Il suffit ainsi de faire un produit en croix pour déterminer la concentration du composé d'intérêt dans le mélange.

Pour améliorer la précision de cette méthode, on peut tracer une droite d'étalonnage en réalisant des chromatogrammes pour plusieurs concentrations en le produit de référence.

Néanmoins, la méthode perd en précision si les volumes injectés pour chaque chromatogramme ne sont pas rigoureusement égaux, ce qui est difficilement contrôlable.

B/ Etalonnage interne

On réalise cette fois un mélange artificiel des composés à doser à partir des produits commerciaux. Si on considère par exemple un mélange à doser de A et B, on crée un mélange artificiel de A et B dans des concentrations connues mais arbitraires. On ajoute aux deux mélanges des concentrations connues en un étalon E.

A l'aide du chromatogramme du mélange artificiel, on mesure les rapports des intensités des pics de A sur E et de B sur E. Ils sont proportionnels d'un facteur $\beta_{A/E}$ et $\beta_{B/E}$ respectivement aux rapports des concentrations en A et en E, et en B et en E :

$$\frac{I_A}{I_E} = \beta_{A/E} \frac{c_A}{c_E} ; \quad \frac{I_B}{I_E} = \beta_{B/E} \frac{c_B}{c_E} \quad (11)$$

Les facteurs $\beta_{A,E}$ et $\beta_{B/E}$ sont valables pour les deux chromatogrammes. On peut donc utiliser les expressions des nouveaux rapports des intensités et les expressions 11 pour déterminer les concentrations en A et en B dans le mélange à doser.

| **Application numérique** – Exercices 7 et 8 du Rouessac

Conclusion

Une chromatographie peut être caractérisée par son efficacité, par sa sélectivité et par sa résolution. Si on ne peut jouer sur la sélectivité avec un type de colonne donné, on peut augmenter l'efficacité en choisissant une vitesse optimale de phase mobile, et la résolution en augmentant la longueur de la colonne (voir la figure 30-8 du Skoog (p. 923)).

On peut ensuite doser un mélange par chromatographie par étalonnage. Soit on compare le chromatogramme du mélange au chromatogramme d'un étalon externe, soit on crée artificiellement un mélange avec un étalon interne.