

CHAPITRE II CHROMATOGRAPHIE ET NOTIONS FONDAMENTALES

1. Historique

Le nom de chromatographie dérive du mot grec *chrôma* «couleur» et *graphein* « écrire ». La première chromatographie a été réalisée par le botaniste russe Tswett, en 1903, sépara en 1903 les pigments colorés d'une plante verte en filtrant un extrait de celle-ci sur une colonne de verre remplie de craie (CaCO₃) finement pulvérisée. Ce fut la première application de la chromatographie d'adsorption sur colonne.

Tandis que l'on perfectionnait la méthode primitive de chromatographie d'adsorption, d'autres chercheurs s'appliquaient à découvrir de nouveaux procédés chromatographiques basés sur des principes physiques différents. L'avènement des méthodes modernes de détection a également contribué à l'éclosion de plusieurs modes de chromatographie différents. Actuellement, certains types de chromatographe permettent la détection de quantités aussi infimes que des parties par billion de composés. La découverte des principaux modes de chromatographie apparaît dans la liste suivante par ordre chronologique :

- la chromatographie sur couche mince (CCM) (1938). (TLC : Thin Layer Chromatography)
- la chromatographie sur papier (1944).
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG) (1952). (GC : Gas Chromatography)
- la chromatographie sur gel (1959).
- la chromatographie liquide haute pression (CLHP) (1967). (HPLC: High Pressure Liquid Chromatography).

2. Définitions

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile). Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers.

3. Principe

Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire et la phase mobile (gaz ou liquide) qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, etc.) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...).

4. 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 œuvre.**

4.1. 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**
- la chromatographie en phase supercritique **CPS**

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**

-La chromatographie en phase supercritique est une chromatographie dans laquelle la phase mobile est un gaz comprimé (à sa température et à sa pression critique) ou une phase liquide / vapeur de même densité (au-delà de la température critique, le gaz ne peut être liquéfié quelle que soit sa pression). Avec cette phase mobile, le plus souvent l'anhydride carbonique, la durée de l'analyse est de 5 à 10 fois plus courte qu'avec les phases mobiles liquides. De viscosité très faible, cette phase mobile permet un couplage facile avec des détecteurs comme le spectromètre de masse ou le détecteur par mesure de la diffusion de la lumière.

4.2. 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 ainsi:

4.2.1. La chromatographie d'adsorption

Le phénomène d'adsorption est essentiellement un phénomène de surface par lequel les composés sont attirés sur les sites actifs de la phase stationnaire par des liaisons hydrogènes et électrostatiques. La phase stationnaire est un matériau solide en forme de petits granules de différentes grosseurs; les plus utilisées sont le gel de silice, l'alumine et la cellulose en poudre.

• Influence de la polarité des composés

En chromatographie d'adsorption, la capacité d'adsorption des composés sur la phase stationnaire est en relation directe avec leur polarité. Plus un composé est polaire, plus fortement il sera adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire et moins vite il se déplacera.

amides > amines > acides carboxyliques > alcools > cétones > esters > composés nitrés > éthers > hydrocarbures aromatiques > hydrocarbures non saturés > hydrocarbures saturés.

• Influence de la polarité de la phase mobile

La phase mobile, appelée également éluant, est un solvant ou un mélange de plusieurs solvants miscibles, dont le rôle est de déplacer les composés du mélange vers le haut de la plaque en chromatographie sur couche mince ou vers la sortie de la colonne en chromatographie sur colonne. Lorsqu'on exploite le phénomène d'adsorption en chromatographie, la polarité de l'éluant a une influence considérable sur la vitesse de déplacement des composés d'un mélange. Plus l'éluant est polaire, plus les composés se déplacent rapidement. En effet, l'éluant est également adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire et entre en compétition avec les composés du mélange.

• Adsorbants

Ce sont des solides très divisés (l'adsorption est un phénomène de surface), ainsi, 1 g d'alumine pour chromatographie peut représenter une surface de l'ordre de 100 m². On peut distinguer :

- Les adsorbants à faible capacité d'adsorption, comme le talc ou le carbonate de sodium.

- Les adsorbants forts, comme le gel de silice, l'alumine ou le charbon actif.

Certains adsorbants présentent une forte polarité électrique, comme le gel de silice ou l'alumine, alors que d'autres, comme le charbon actif ou les phases inverses ont une faible polarité.

4.2.2. Chromatographie de partage

Elle est fondée sur la différence de solubilité des substances à séparer dans deux fluides parfaitement miscibles. Elle est mise en pratique en chromatographie sur papier. Un des fluides est un liquide retenu sur un support inerte et constitue la phase stationnaire. L'autre, liquide ou gaz en déplacement, constitue la phase mobile. Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents. Les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que ceux qui le sont moins.

Un autre facteur qui intervient est la polarité de la phase: ainsi en HPLC on peut utiliser des phases stationnaires peu ou non polaires, la phase mobile étant polaire (eau ou mélange eau - méthanol): on parlera alors de chromatographie de partage à polarité de phase inversée.

4.2.3. Chromatographie ionique

La phase stationnaire solide comporte en surface des sites ioniques et la phase mobile est une solution-tampon aqueuse. La séparation met en jeu des échanges entre les ions de l'échantillon avec ceux de la phase stationnaire.

Selon la nature des ions élués, leur progression est plus ou moins rapide, ce qui permet une séparation des différentes espèces ioniques dans un mélange. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique.

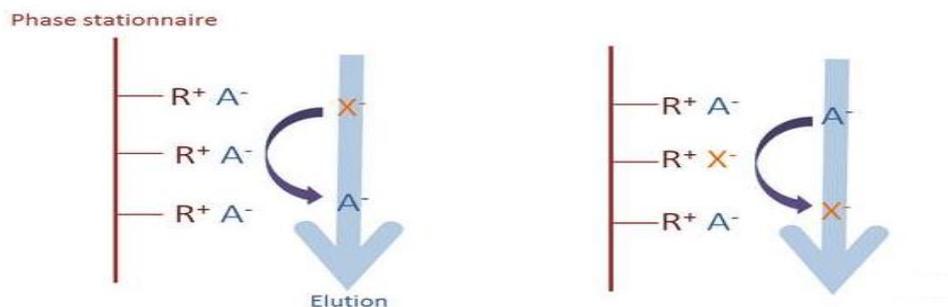


Figure 1. Chromatographie ionique

4.2.4. Chromatographie d'exclusion

La phase stationnaire est généralement un polymère poreux dont les pores ont des dimensions choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise une sorte de tamis à l'échelle moléculaire, dit à perméation sélective. Le coefficient de partition s'appelle dans ce cas le coefficient de diffusion. Cette technique est encore appelée filtration sur gel ou perméation de gel selon la nature de la phase mobile (aqueuse ou organique). Le diamètre des pores est une caractéristique de chaque type de gel. Un mélange de solutés de masses molaires variables traverse une épaisseur donnée de gel: les grosses molécules, celles dont le diamètre est supérieur à celui des pores, sont exclues et éluées les premières; les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses, leur migration est freinée en diffusant dans le gel. La séparation est donc réalisée par le fait que les solutés sont élués dans l'ordre inverse des masses molaires.

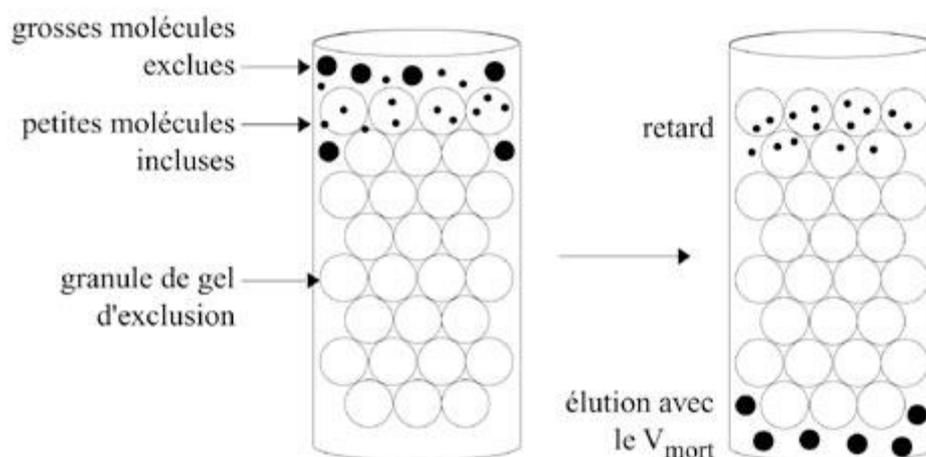


Figure2. Schéma du tamisage moléculaire

4.2.4. La chromatographie d'affinité

Très utilisée par les biochimistes, elle consiste à fixer par exemple une enzyme sur la phase stationnaire de façon à complexer sélectivement les substrats correspondants (ou vice versa). Il s'agit là d'une association entre une molécule polyfonctionnelle et une phase stationnaire comportant des sites stériquement définis et de capacité d'échange multiple. Il s'agit souvent d'un système coopératif d'interactions différentes (ioniques, hydrophobe, Van der Waals, hydrogène), liaisons parfaitement positionnées dans l'espace.

Il est bon de rappeler qu'il ne peut pas exister de phase stationnaire « inerte ». Quelle que soit sa structure elle sera toujours capable de donner des interactions d'un type donné. Dans la mesure où le système requiert un niveau d'interaction le plus faible possible, c'est par les choix judicieux des phases mobiles et stationnaires qu'il sera possible d'y parvenir.

4.3. Classification selon la technique mise en jeu

Selon la technologie mise en jeu on distingue:

- la chromatographie sur colonne
- la chromatographie de surface (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

5. Notions de base et grandeurs de rétention

5.1. Chromatogramme

Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne (Figure 3). Le temps est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. La ligne de base correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. La séparation est complète quand le chromatogramme présente autant de pics chromatographiques revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser.

Cette courbe est utilisée à la fois en analyse qualitative et quantitative.

- Analyse qualitative : permet l'identification des composés par la position du pic
- Analyse quantitative : évaluer la concentration ou la masse d'un composé en utilisant l'aire des pics

Le pic chromatographique est caractérisé par plusieurs dimensions (Figure 3):

δ : la largeur à mi hauteur (mesurée à 50% de la hauteur totale)

σ : l'écart-type du pic (qui est égal à la demi-largeur du pic à 60,6% de sa hauteur totale)

ω : largeur de la base du pic mesurée à 13,5% de la hauteur totale

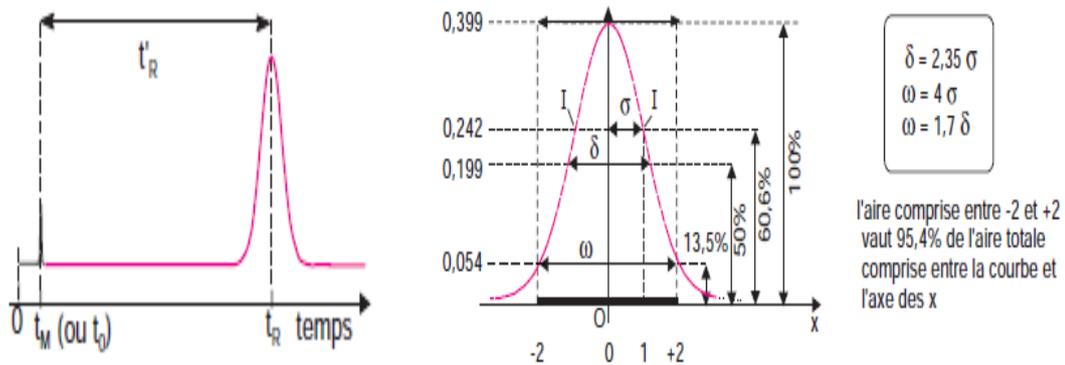


Figure 3. Caractéristiques d'un pic chromatographique

On peut également tracer les tangentes aux points d'inflexion des deux flans du pic. Le triangle formé avec la ligne de base est environ égal à 96% de l'aire totale du pic (2σ (écarts-types)). La largeur ω à la base du pic est mesurée à la base du triangle.

5.2. Éluion

L'éluion est l'entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile. En chromatographie liquide solide, la phase mobile peut être appelée éluant.

5.3. Le temps mort

Le temps mort (t_M) est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire de la colonne, pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne (ou temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne).

5.4. Le temps de rétention

Le temps de rétention (t_R) est le temps mis par les molécules d'un composé à analyser (Soluté) pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne.

Le temps de rétention est indépendant

- de la quantité injectée.
- de la nature et de l'abondance des autres constituants dans le mélange.

Par contre il dépend :

- de la masse de phase stationnaire dans la colonne
- du débit de la phase mobile
- du volume mort du chromatographe (injecteur, détecteur, canalisations..)
- de la nature de la phase stationnaire.

5.5. Le temps de rétention corrigé ou réduit t'_R

Le temps de rétention réduit (t'_R) représente le temps passé par le soluté dans la phase stationnaire.

$$t'_R = t_R - t_M$$

5.6. Le volume de rétention

Le volume de rétention de chaque soluté représente le volume de la phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Ce volume 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. Si D est le débit alors:

$$V_R = t_R \cdot D$$

$$V_R = t_R \cdot u \cdot S \cdot \varepsilon$$

u : vitesse linéaire de la phase mobile

S : Sélection droite de la colonne

ε : Porosité de la phase stationnaire (0,75 pour la silice poreuse)

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. Cette grandeur est exprimée par :

$$V_M = t_M \cdot D$$

Le volume de la phase stationnaire désigné par V_S est calculé en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

5.7. Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile

La vitesse linéaire moyenne de progression du soluté V est égale à :

$$V = L/t_R$$

L : longueur de la colonne

La vitesse linéaire moyenne de la phase mobile u est égale à :

$$u = L/t_M$$

5.8. 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 nul.

6. Performances des colonnes chromatographiques

6.1. Facteur de capacité

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

$$K' = C_S / C_M \cdot V_S / V_M = K \cdot V_S / V_M$$

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 :

$$t_R = t_M (1 + K')$$

6.2. Facteur de sélectivité

Le facteur de sélectivité α décrit la position de deux pics adjacents 1 et 2 situés sur un chromatogramme. Il correspond au rapport des facteurs de rétention de la colonne pour les deux composés.

Il définit si la séparation est chimiquement possible :

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

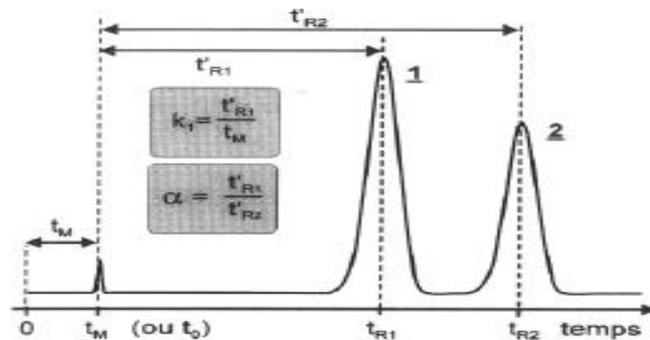


Figure 4. Facteur de Sélectivité

α est toujours supérieur à 1, t_M et V_M ne dépendent que de la colonne.

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

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

6.3 Facteur de résolution

La résolution R d'une colonne donne la mesure quantitative de son aptitude à séparer deux solutés. Elle est définie par :

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

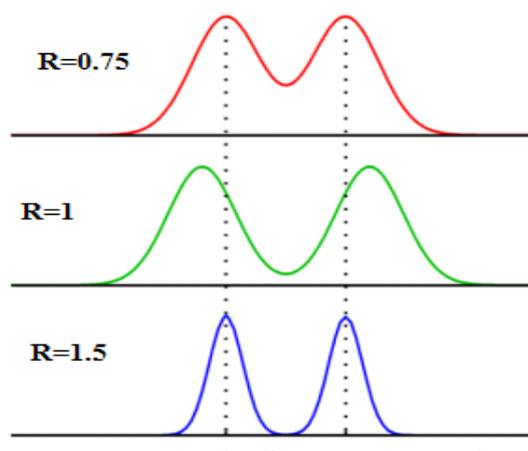


Figure 5. Facteur de Résolution

Une résolution de 1,5 permet la séparation pratiquement complète de 1 et 2.

6.4. Facteur de l'efficacité

L'efficacité d'une colonne chromatographique s'évalue généralement soit à partir de la HEPT soit à partir du nombre de plateaux théoriques N . Ces deux grandeurs sont liées par l'équation:

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

L'efficacité de la colonne augmente lorsque le nombre de plateaux théoriques augmente ou si H diminue à longueur L constante. Elle peut varier considérablement selon le type de colonne et la nature des deux phases.

L'efficacité d'une colonne est liée à la largeur des pics et on définit cette efficacité comme étant la variance σ par unité de longueur de colonne soit :

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

Comme H est exprimé en unité de longueur, σ et L sont exprimés en unité de longueur.

La théorie des plateaux établit qu'après un certain parcours dans la colonne, les pics d'éluion peuvent être assimilés à des courbes de Gauss dont l'écart type (exprimé en unité de temps) est lié au nombre de plateaux théoriques parcourus par la relation :

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2$$

Les caractéristiques géométriques de la courbe de Gauss (Figure 1) permettent de calculer, pour un soluté donné, N à partir du chromatogramme.

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2} \quad , \quad N = 5.54 \frac{t_R^2}{\delta^2}$$

7. Perte de charge dans une colonne (loi de darcy)

La perte de charge est une caractéristique de la colonne. Elle exprime sa résistance à l'écoulement de la phase mobile. Elle est donnée par la loi de DARCY:

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot L \cdot v}{K^\circ}$$

$$K^\circ = \frac{d_p^2}{180} \cdot \frac{\varepsilon^3}{(1 - \varepsilon)^2}$$

ΔP : perte de charge (en barye = 10^{-6} bars)

η : viscosité (poise)

L : longueur de la colonne (cm)

v : vitesse de la phase mobile ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

K° : constante de perméabilité (cm^2)

d_p : diamètre des particules (cm)

ε : porosité interstitielle (volume interstitiel de la colonne/volume total).

$$\Delta P = 400 \frac{F \cdot L \cdot \eta}{d_p^2 \cdot d_c^2}$$

Avec

F : débit ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)

d_c : diamètre de la colonne en mm

8. Courbe de Van Deemter

C'est une équation mathématique qui relie la HEPT à la vitesse moyenne d'écoulement de la phase mobile u dans la colonne selon

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

Avec

A : la diffusion turbulente

B : la diffusion moléculaire

C : la résistance du transfert de masse

U : la vitesse moyenne de la phase mobile

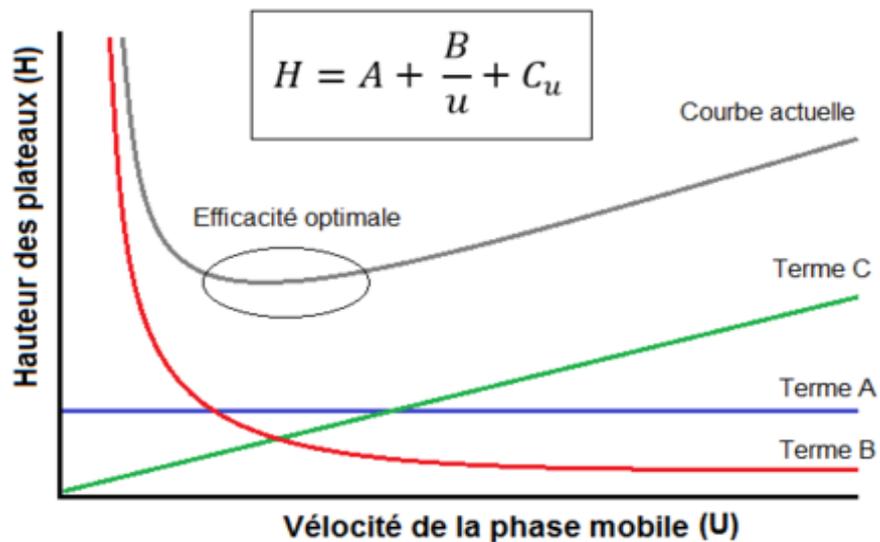


Figure 6. Courbe de Van Deemter

La courbe décrivant cette équation est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum pour la HEPT, correspondant au débit optimal (Figure 6).

Les trois coefficients numériques expérimentaux A, B et C caractérisent divers paramètres physico-chimiques du système:

- A : terme de remplissage

Ce terme caractérise l'écoulement de la phase mobile le long de la phase stationnaire. Il dépend de la taille des particules constituant la phase stationnaire ainsi que de leur répartition. La vitesse d'écoulement sera différente selon : D L'écart entre les particules : plus elles sont serrées, plus le passage est ralenti. D Pour un écart important entre deux particules, la vitesse d'écoulement sera plus rapide au centre qu'au contact des particules. Ce terme est une constante, indépendante de la phase mobile u, qui est d'autant plus grande que le diamètre des particules est grand. A est influent dans les colonnes remplies de particules, peu important en chromatographie liquide et nul pour les colonnes capillaires.

- B : terme de diffusion longitudinale

B traduit la tendance naturelle des molécules de solutés à se disperser c'est-à-dire à diffuser dans toutes les directions dans la phase mobile; cette dispersion est d'autant plus grande que le débit est faible. Ce terme est peu important quand la phase mobile est un liquide, car son coefficient de diffusion est plus faible que pour un gaz.

- C : terme de résistance contre le transfert de masse

C traduit la résistance des solutés à se répartir à l'équilibre entre les deux phases. Plus le débit augmente, plus l'équilibre est difficile à atteindre (du fait des turbulences et des gradients de concentration qui sont plus importants), et une partie des solutés peut-être entraînée hors équilibre. Ce terme C est égal à la somme du coefficient de diffusion dans la phase mobile (C_m) et du coefficient de diffusion dans la phase stationnaire (C_s). Depuis que la taille des particules est devenue une variable, la courbe de Van Deemter peut être utilisée pour rechercher les meilleures performances en termes de séparation.

9. Optimisation d'une analyse chromatographique

L'optimisation de l'analyse qui met à profit les connaissances de l'analyste et les ressources de l'appareil pour simuler les résultats à attendre des modifications de la composition de la phase mobile et d'autres paramètres physico-chimiques tels la température ou le pH dans le cas de substances ionisables.

-En chromatographie en phase gazeuse, les séparations peuvent être si complexes qu'on ne peut déterminer par avance s'il est préférable de baisser ou d'élever la température. Le choix de la colonne, de sa longueur, de son diamètre, de la phase stationnaire, du rapport de phase ainsi que des paramètres de séparation (température et débit), sont autant de facteurs qui interagissent les uns sur les autres.

-La résolution et le temps d'élution sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante du ou des composés intéressants en un minimum de temps. Dans certains cas, il ne faut toutefois pas oublier le temps nécessaire à la colonne pour revenir aux conditions initiales avant d'effectuer l'analyse suivante. La chromatographie correspond en effet à un type d'analyse lente. Si la résolution est très bonne, l'optimisation aura encore sa raison d'être pour gagner du temps en utilisant une colonne plus courte.

Selon l'expression mathématique de la résolution R (facteur de résolution), donc le facteur de résolution R dépend de trois paramètres :

La racine carrée du nombre de plateaux théoriques \sqrt{N} , le facteur de rétention (ou de capacité) k' et le facteur de la sélectivité α .

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

- N peut être optimisé en jouant sur H (diminution du diamètre des particules, diminution du diamètre du support).
- R augmente avec k' (facteur de rétention, $1 < k' < 10$) Pour augmenter k' : baisser la T en CPG, modifier la composition de la phase mobile en CPL.
- Inutile d'optimiser N et k si α (facteur de séparation) = 1.
- Pour augmenter α tout en conservant $1 < k' < 10$, programmation de T en CPG, modifier la composition de la phase mobile en CPL, modification de la phase stationnaire.
- Le chromatographe est toujours prisonnier d'un triangle dont les sommets correspondent à la résolution, à la vitesse et à la capacité, trois paramètres qui s'opposent (Figure 7). Une chromatographie analytique optimisée utilise à plein le potentiel du paramètre le plus efficace : la sélectivité. Dans ce triangle elle se situe donc près du sommet résolution.

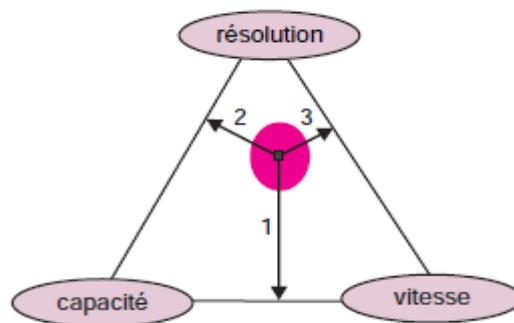


Figure 7. Le triangle des chromatographistes.

La zone ombrée indique le domaine qui correspond à la chromatographie analytique.

Celle-ci tire profit des 5 paramètres : K , N , k' , α et R .