

## 1. Définition.

C'est une méthode de séparation, non destructrice en son principe, basée sur le fait que le coefficient de partage d'un soluté entre deux phases dépend de la nature du soluté, et donc, si l'une des phases est mobile par rapport à l'autre, les solutés mettront un temps plus ou moins long à parcourir le chemin imparti à cette phase mobile.

## 2. Buts de la chromatographie.

On peut distinguer deux objectifs principaux:

### 2.1. Objectif analytique.

Il s'agit d'identifier des solutés qualitativement et/ou quantitativement, l'opération se faisant par le seul processus chromatographique, auquel peuvent être associées, en passage direct, d'autres techniques analytiques chimiques ou physico-chimiques destinées à faciliter l'analyse qualitative (on qualifie cela de *couplage*). Les quantités analysées doivent être extrêmement minimales afin de ne pas s'écarter des règles d'idéalité de la thermodynamique (le coefficient de partage n'est autre qu'une constante d'équilibre thermodynamique, où les activités intervenant ne sont égales aux concentrations que si elles sont très faibles. Les systèmes de détection devront donc être très sensibles.

### 2.2. Objectif préparatif.

Les concentrations des solutés sont ici importantes et on travaille hors des règles d'idéalité thermodynamiques. Les quantités produites demeurent cependant faibles (de l'ordre du  $\mu\text{g}$  / jour) et le procédé ne sera utilisé que pour préparer des substances rares, sensibles à la chaleur (protéines, etc...).

## 3. Variantes chromatographiques.

On peut distinguer les chromatographies en phase liquide et celles en phase gazeuse.

### 3.1. Chromatographies en phase liquide.

On distingue:

**3.1.1. La chromatographie sur colonne (CPL):** le substrat actif est tassé dans un tube. Il s'agit soit d'un adsorbant (chromatographie liquide - solide : CLS), ou bien d'un substrat agissant par partage (chromatographie liquide - liquide : CLL). Dans les deux cas, le véhicule porteur, un liquide, peut être soit à la pression ordinaire, soit soumis à une pression pouvant atteindre plusieurs centaines de bars. Dans ce dernier cas, on utilise le procédé de chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP).

3.1.2. Si le substrat est un échangeur d'ion, on opère par *chromatographie par échange d'ions*.

3.1.3. On peut utiliser la chromatographie sur *gel perméable*. Elle permet d'obtenir des séparations de constituants de degrés de polymérisation différents dans un polymère.

3.1.4. *La chromatographie sur papier (CP)*: le substrat est la charge (eau, sels,...) et les fibres d'un papier convenablement choisi, le véhicule se déplaçant dans le papier grâce aux forces capillaires.

3.1.5. *La chromatographie sur couche mince (CCM)* répond à la même description, mais le substrat est étalé et fixé sur une plaque inerte, verre ou autre.

### 3.2. Chromatographie en phase gazeuse.

Le substrat est toujours contenu dans un tube ou *colonne* (classiques ou capillaires). Là encore, c'est un adsorbant (chromatographie gaz - solide : CGS) ou un support inerte imprégné d'un liquide lourd stationnaire (chromatographie gaz - liquide : CGL). Quand le mélange à analyser est liquide, il est généralement introduit sous cette forme dans l'appareil, conçu pour le vaporiser instantanément. Le véhicule est toujours un gaz dont la pression d'entrée peut être choisie et éventuellement programmée, de même que la température à laquelle est portée la colonne peut être maintenant constante ou au contraire programmée.

### 4. Terminologie générale de la chromatographie.

4.1. Soluté: toute substance constituant d'un mélange, séparée par chromatographie.

4.2. Phase mobile: le vecteur, liquide ou gazeux, qui déplace le soluté.

4.3. Phase stationnaire: le produit qui, par ses affinités avec les solutés, va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace.

4.4. Support: Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire.

4.5. Remplissage: l'ensemble des produits (adsorbant, support + phase stationnaire, etc...) qui garnissent une colonne chromatographique.

4.6. Colonne chromatographique: tube de diamètre et longueur variable, en verre, métal, ou autre substance, à l'intérieur duquel s'opèrent les séparations chromatographiques.

4.7. Développant: une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, de telle manière qu'ils demeurent dans celle-ci : cas de la CP et de la CCM.

4.8. Éluant: une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, jusqu'à ce qu'ils sortent de celle-ci

4.9. Chromatographie d'éluion: celle dans laquelle la phase mobile parcourt en permanence la phase stationnaire afin que les solutés introduits à une extrémité de celle-ci sortent à l'extrémité opposée. Dans cette méthode, la phase mobile est inerte vis-à-vis de la phase stationnaire.

4.10. Chromatographie de déplacement: procédé dans lequel la phase mobile a plus d'affinité que le soluté pour la phase stationnaire, donc le pousse devant elle.

4.11. Rapport frontal: rapport entre la distance parcourue par un soluté dans une phase stationnaire et la distance parcourue dans le même temps par le développant.

4.12. Coefficient de partage: rapport des concentrations respectives du soluté dans la phase stationnaire et la phase mobile, au cours de l'analyse.

4.13. Valeurs de rétention: toutes données qui permettent de chiffrer l'action spécifique d'une phase stationnaire donnée sur un soluté donné, au cours d'une analyse chromatographie.

4.14. Chromatogramme: trace sur un papier enregistreur des réponses successives du détecteur, au cours de l'éluion des solutés hors des colonnes.

# *Analyses qualitative et quantitative en chromatographie*

## 1. Analyse qualitative

Elle sert essentiellement à l'identification des composants d'un mélange.

### 1.1. Utilisation des grandeurs de rétention.

Pour une phase stationnaire donnée, le volume de rétention spécifique est caractéristique du soluté concerné. mais sa mesure précise n'est pas possible avec un chromatographe ordinaire Aussi recourt-on aux valeurs de rétention relatives, c'est-à-dire en rapportant la grandeur (essentiellement un temps de passage dans la colonne) relative à un soluté inconnu, à celle d'un produit connu, injecté sur la même colonne,

dans les mêmes conditions. on obtient ainsi une valeur  $\alpha_{1,2} = \frac{(V_g)_1}{(V_g)_2} = \frac{(t_r)_1}{(t_r)_2}$  où les valeurs de rétention indicées "2" correspondent à l'étalon.

Les temps de rétention sont mesurés au sommet des pics chromatographiques.

### 1.2. Tables.

Des tables ont été constituées, avec comme entrées la nature de la phase stationnaire et la température. Néanmoins, un certain nombre de contraintes existent au niveau du choix des étalons et l'on préfère souvent se référer à une échelle universelle, par exemple à celle des indices de rétention, proposée par KOVATS (1963). Ces derniers sont fondés sur la relation linéaire constatée entre le logarithme du volume de rétention spécifique et le nombre  $n$  d'atomes de carbone du soluté, dans une famille de produits homologues, par exemple celle des hydrocarbures saturés aliphatiques:  $\log V_g = an + b$ , relation valable uniquement pour les termes comportant plus de cinq atomes de carbone.

## 2. Performances des colonnes chromatographiques.

### 2.1. Facteur de capacité.

Soit  $t_0$  le temps mis pour la phase mobile à traverser la colonne, et  $t_i$  le temps de rétention de chaque soluté. Le facteur de capacité de la colonne  $k'$  s'exprime de la

manière suivante:  $k' = \frac{t_i - t_0}{t_0}$

### 2.2. Sélectivité d'une colonne.

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs 1 et 2, on utilise le *facteur de sélectivité* (ou rétention relative) défini par la relation:

$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} = \frac{K_2}{K_1}$  où  $K_1$  et  $K_2$  sont les coefficients de partage des solutés 1 et 2 entre

les phases stationnaire et mobile. Ce facteur de sélectivité a mesure la différence de distribution thermodynamique des deux solutés. Il est facile de démontrer que:

$\ln \alpha = -\frac{\Delta G_2^0 - \Delta G_1^0}{RT}$ , où apparaissent les enthalpies libres de distribution des solutés

entre les deux phases.

### 2.3. Efficacité d'une colonne.

Les pics étant supposés Gaussiens, on peut caractériser l'élargissement des pics, d'autant plus important que l'efficacité de la séparation est faible, par un *nombre de*

*plateaux théoriques*  $n$ , semblable à celui rencontré pour la distillation fractionnée. Pour une gaussienne vraie,  $n$  s'exprime des trois manières suivantes:

$$N = \left( \frac{t_r}{\sigma} \right)^2 \quad \text{où } \sigma \text{ est l'écart-type de la gaussienne exprimé en unité de temps,}$$

$N = 16 \left( \frac{t_r}{\omega} \right)^2$  où  $\omega$  est la largeur du pic à la base exprimée en unité de temps, déterminée par l'intersection des tangentes au points d'inflexion à la courbe gaussienne et de la ligne de base, et

$$N = 5,54 \left( \frac{t_r}{\delta} \right)^2 \quad \text{où } \delta \text{ est la largeur du pic à mi-hauteur, exprimée en unité de temps.}$$

En pratique, on mesure directement  $t_r$ ,  $\delta$  et  $\omega$  sur le chromatogramme.

Pour pouvoir comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, on définit la *hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT)*, de la manière suivante:  $H = L/N$  où  $L$  est la longueur de la colonne. Une colonne efficace présente souvent une HEPT de quelques microns (colonnes capillaires en CPG).

#### 2.4. Résolution des colonnes.

La résolution  $R$  entre deux pics est définie par la relation:  $R = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{(\omega_2 + \omega_1)}$

Il découle de cette définition que la séparation est d'autant meilleure que  $R$  est plus grand. Ainsi pour deux pics d'aires voisines, lorsque  $R$  est supérieur à 1, la séparation est pratiquement complète, puisqu'il n'y a alors que 2% de recouvrement. Pour  $R$  inférieur à 0,8 la séparation est généralement insuffisante.

En supposant les largeurs des pics à la base du même ordre, on démontre que la résolution  $R$  peut être exprimée par la relation:

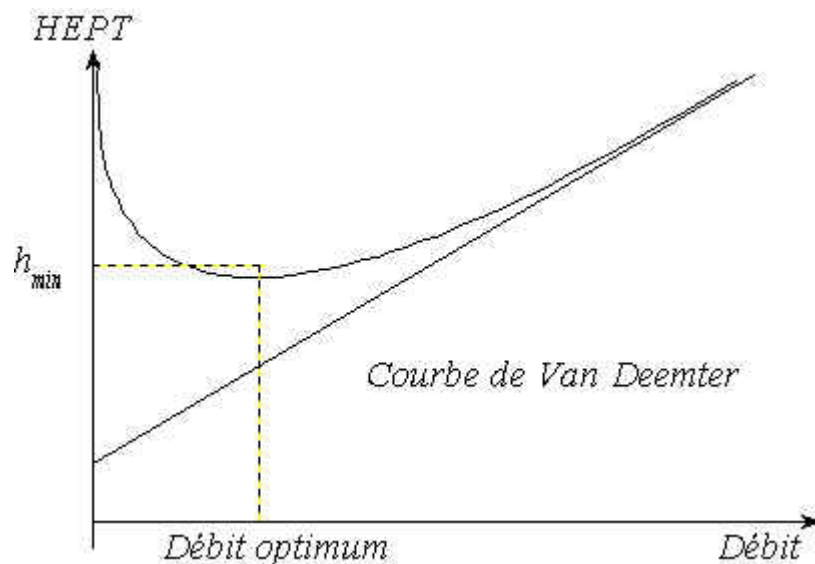
$$R = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2'}{1 + k_2'} \right) \sqrt{N} \quad \text{ou} \quad R = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{t_R - t_0}{t_R} \right) \sqrt{N}$$

où  $\alpha$  est la sélectivité de la colonne,  $k_2'$  le facteur de capacité du second pic et  $N$  le nombre de plateaux théoriques relatif au second soluté.

#### 2.5. Paramètres influençant l'efficacité.

Globalement, interviennent les facteurs suivants:

- le diamètre des particules de remplissage de la colonne qui doit être petit. Cette dernière doit être chargée de façon très homogène.
- le gaz porteur ne doit pas être trop léger (en CPG)
- l'épaisseur du film de phase stationnaire doit être très petite.
- le débit de phase mobile influe de manière complexe, selon la courbe suivante:

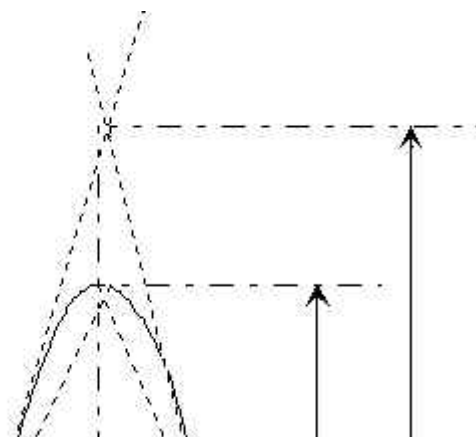


On montre qu'il existe également un optimum de température, et généralement, en CPG, plus la température de la colonne est basse, meilleure est la séparation, avec cependant un temps d'analyse parfois rédhibitoire.

## 2. Analyse quantitative.

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

### 2.1. mesure de l'aire des pics.



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

#### *2.1.1. Triangulation*

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

en calculant l'aire:

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

### 2.1.2. Intégration

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

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

## 2.2. Détermination du coefficient de proportionnalité.

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

### 2.2.1. Normalisation interne.

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

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

### 2.2.2. Méthode des ajouts dosés.

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

Démontrons maintenant le résultat suivant:

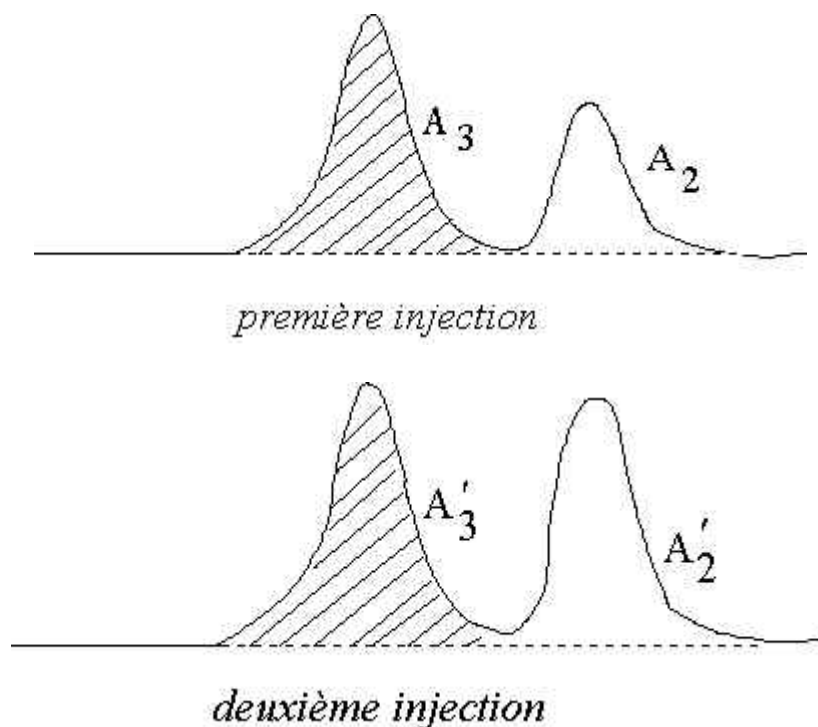
$$\% \text{ en masse} = \frac{m_0 \times 100}{M \left( \frac{A_2 \cdot A_3}{A_2 \cdot A_3} - 1 \right)}$$

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

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

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

$$\frac{m_3}{M+m_0} = \frac{\mu'_3}{\mu'} \quad \text{et} \quad \frac{m_2+m_0}{M+m_0} = \frac{\mu'_2}{\mu'} \quad (2)$$



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

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

D'où nous éliminons les constantes de proportionnalité:

$$\Rightarrow \frac{\mu_2}{\mu_3} = \frac{A_2}{A_3} \quad \text{et} \quad \frac{\mu'_2}{\mu'_3} = \frac{A'_2}{A'_3}$$



Le rapport de ces égalités donne:

$$\frac{\mu_2}{\mu_2} \times \frac{\mu_3}{\mu_3} = \frac{A_2}{A_2} \times \frac{A_3}{A_3} \quad (3)$$

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

$$\frac{\mu_3}{\mu_2} = \frac{m_3}{m_2 + m_0} \quad \text{et} \quad \frac{\mu_2}{\mu_3} = \frac{m_2}{m_3}$$

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

$$\frac{m_2}{m_3} \times \frac{m_3}{m_2 + m_0} = \frac{A_2}{A_2} \times \frac{A_3}{A_3} = \frac{m_2}{m_2 + m_0}$$

$$\Leftrightarrow m_2 = \frac{m_0}{\left( \frac{A_2 \times A_3}{A_2 \times A_3} - 1 \right)}$$

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

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

La méthode demande une bonne linéarité de la réponse du détecteur chromatographique, ce qui n'est pas toujours le cas. Nous supposons cependant que le détecteur utilisé en TP, le catharomètre, présente cette qualité.

### 2.2.3. Étalonnage interne

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

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

$$\text{On définit alors } K_{i,e} = \frac{K_i}{K_e}$$

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

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