

3. CHROMATOGRAPHIE - ASPECTS GENERAUX

OBJECTIFS

- comprendre les principes d'une séparation chromatographique
- connaître les paramètres principaux qui décrivent la séparation et l'efficacité de la séparation
- savoir de manière quantitative comment améliorer la résolution d'une séparation chromatographique

3.1 Introduction

Chromatographie est un terme général, utilisé pour définir des méthodes de séparation basées sur la distribution d'un soluté entre deux phases, l'une étant mobile (un gaz ou un liquide), l'autre stationnaire (un solide ou un liquide).

C'est en 1906 que le botaniste russe **TSWETT**, mit à profit pour la première fois les essais entrepris dès 1903 concernant les possibilités de séparer les constituants d'un mélange par les phénomènes d'adsorption. Il déposa dans une colonne remplie de carbonate de calcium finement pulvérisé un mélange de pigments végétaux (chlorophylles et xanthophylles) dissous dans de l'éther de pétrole. Il constata que ceux-ci s'adsorbaient au sommet de la colonne. L'adjonction continue de ce solvant pur au sommet de la colonne provoqua la migration, du haut vers le bas, de chaque **pigment** à une vitesse qui leur était propre. Tswett donna à cette méthode de séparation le nom de **chromatographie** (du grec khrôma, couleur).

Cependant, c'est durant les années 30 que cette technique se développa effectivement. Les bases de la chromatographie sur couche mince ont été établies en 1938 par **IZMAILOV** et **SCHRAIBER** puis reprises par **STAHL** vingt ans plus tard (1958).

Les travaux remarquables de **MARTIN** et **SYNGE** (1941) pour lesquels ils reçurent le prix Nobel, révolutionnèrent non seulement la chromatographie liquide (CL) mais aussi celles en phase gazeuse et sur papier. C'est en 1952 que **MARTIN** et **JAMES** publièrent les premiers travaux proprement dits sur la chromatographie gazeuse (CG) et sur papier et dont l'essor dura jusqu'en 1960. A partir de cette année, la chromatographie en phase liquide devient un partenaire à valeur égale. En effet, jusqu'à lors, celle-ci était pratiquée dans des colonnes relativement larges et à pression atmosphérique d'où la lenteur des séparations et l'absence de détecteurs couplés en ligne.

Bien qu'étant la plus ancienne de méthodes elle avait trouvé peu d'applications. Actuellement, la chromatographie liquide « moderne » est devenue la méthode de choix pour bon nombre de problèmes analytiques et de chimie préparative.

Comme nous le verrons, les principes des méthodes chromatographiques sont tellement semblables qu'elles peuvent être assez largement décrites par des théories communes. Mais, tout d'abord établissons une classification des principales techniques.

Bien que l'adsorption soit le phénomène originel ayant donné naissance à la chromatographie, **MARTIN** et **SYNGE** montrèrent que, dans certains cas, la phase stationnaire solide pouvait être avantageusement remplacée par une phase stationnaire liquide, la chromatographie de partage pris donc le pas sur celle d'adsorption. De par le partage du soluté entre deux phases liquides, ce type de chromatographie s'apparente à la séparation par extraction à contre-courant selon Craig.

3.2 Définitions

• élution	percolation d'un composé sur une colonne
• éluant	solvant permettant d'éluier le composé
• éluat	solution recueillie au bas de la colonne
• chromatogramme	enregistrement des pics élués perçus par un détecteur

Dans tous les cas, une fluide appelé **phase mobile** procure un **tube** (colonne) ou une **surface plane**, constitués d'un matériau relativement poreux (éventuellement imprégné d'un liquide), c'est la **phase** dite **stationnaire**. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange à séparer, appelés généralement **solutés** sont **inégalement retenus** par celle-ci lorsqu'ils la traversent, entraînés par le **fluide** (ou solvant).

Il est possible de faire une classification des techniques chromatographiques en fonction de la **nature des phénomènes** mis en jeu dans la séparation.

- **la chromatographie d'échange d'ions ou ionique (CL)**. La phase stationnaire est un solide ayant des propriétés particulières que l'on appelle un « échangeur d'ions ». Ce solide comporte des groupements fonctionnels fixes ionisés ou ionisables. Les ions qui assurent l'électroneutralité de la structure sont mobiles et échangeables avec ceux de la phase mobile en contact avec l'échangeur (greffé sur des polymères ou des silices).
- **la chromatographie de paires d'ions (CL)**. On forme des paires d'ions entre les constituants (ionisés) du mélange à séparer et un contre-ion convenable. Ces paires d'ions se distribuent entre la phase mobile et la phase stationnaire (le plus souvent celle-ci est une phase greffée).
- **la chromatographie d'échange de ligands (CL)**. La phase stationnaire contient une espèce fixée irréversiblement capable de former des complexes avec les solutés à séparer.
- **la chromatographie d'exclusion (CL)**. (On dit aussi de perméation ou de filtration sur gel). La phase fixe est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine des dimensions de certaines des molécules à séparer. Celles qui sont trop grosses pour pénétrer dans les pores sont exclues de la phase stationnaire et sont éluées d'abord, celles qui pénètrent sont éluées ensuite.
- **la chromatographie d'affinité (CL)**. Cette méthode s'apparente à celle de l'échange de ligand. Elle est dite bio-spécifique lorsque la phase stationnaire est constituée d'un ligand présentant une grande affinité pour certaines molécules bioactives.

- Chromatographie en phase liquide (CL)
- Chromatographie en phase gazeuse (CG)
- Chromatographie en phase supercritique (CS)

On peut distinguer :

- **la chromatographie d'adsorption** (CG et CL) lorsque la phase stationnaire est un solide adsorbant et que la séparation est fondée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange par la phase fixe.
- **la chromatographie de partage** (CG et CL) lorsque la séparation est fondée sur des différences de solubilité (ou d'interaction) des molécules à séparer dans la phase liquide (ou greffée) qui recouvre un solide.

LES SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES LES PLUS IMPORTANTS

Système	Phase mobile	Phase stationnaire	Configuration	Séparation
gaz	gaz	liquide	colonne	partage
	gaz	solide	colonne	adsorption, partage
liquide	liquide	liquide	colonne	partage
	liquide	solide	colonne	adsorption, partage
papier	liquide	cellulose	feuille, bande (surface)	partage, adsorption
couche mince	liquide	solide	film mince (surface)	adsorption

3.3 Principes

- séparations sont basées sur les différences de distribution de solutés entre deux phases non miscibles (l'une étant solide)
- Comme en extraction, on définit le coefficient de distribution (ou de partage) du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile

$$K = C_S / C_M$$

C_S = concentration dans la phase stationnaire

C_M = concentration du soluté dans la phase mobile

- Mais ce n'est pas un vrai équilibre puisque le renouvellement continu de la phase mobile permet aux composés de se déplacer dans la colonne selon une vitesse différente en fonction de leur affinité pour les deux phases.

En effet dû à des différences d'affinité des divers constituants d'un mélange pour chacune des deux phases, il résulte des différences entre les vitesses de migration de ces composés, d'où une possibilité de séparation. Sous l'action de la phase mobile, les divers constituants migrent d'autant plus lentement qu'ils ont plus d'affinité pour la phase stationnaire.

Dans le cas de la chromatographie sur colonne on obtient, à la sortie du détecteur, un « signal » que l'on peut enregistrer graphiquement : le chromatogramme. Chaque constituant est caractérisé, sur le chromatogramme, par un « pic ». Les pics seront plus ou moins larges et plus ou moins éloignés les uns des autres; ils rendront compte de l'efficacité de la séparation.

Pour une séparation imparfaite de deux composés, deux démarches sont concevables :

- la première revient à éloigner les pics l'un de l'autre par l'emploi d'une phase stationnaire plus **sélective**. Cette démarche est fondée sur la **thermodynamique de la séparation**.
- la seconde consiste à rendre chacun des pics plus étroits en modifiant les paramètres qui influencent la **cinétique des séparations** pour rendre la séparation plus efficace.

Aussi, les théories de la séparation chromatographique peuvent être classées en **théories thermodynamiques**, qui traitent des temps ou des volumes de rétention, en en **théories cinétiques**, qui s'attachent au processus de transfert de matière.

- théorie thermodynamique
 - Martin et Synge (1941)
 - théorie des plateaux
 - "système statique en équilibre"
- théorie cinétique
 - van Deemter (1956)
 - "rate theory"
 - dynamique

3.4 Paramètres décrivant la colonne et le chromatogramme

3.4.1 N (Plateaux théoriques)

- fictivement, on assimile la colonne chromatographique à une suite de plateaux sur lesquels s'établit l'équilibre du soluté entre les phases stationnaires et mobiles
- plus N est grand, plus la colonne est efficace
- on peut atteindre des valeurs de N de l'ordre de 100000

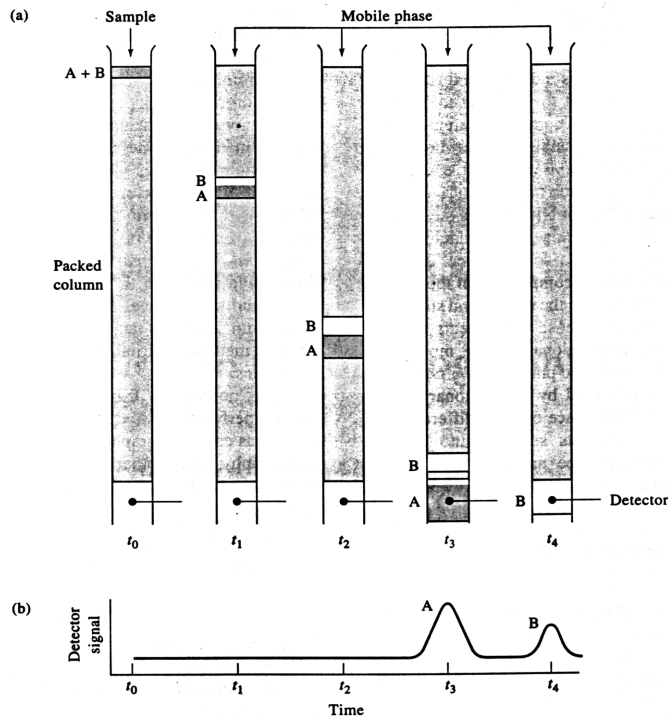


Figure 26-1 (a) Diagram showing the separation of a mixture of components A and B by column elution chromatography. (b) The output of the signal detector at the various stages of elution shown in (a).

- dû à l'augmentation du volume, il y a un élargissement des pics dans le temps

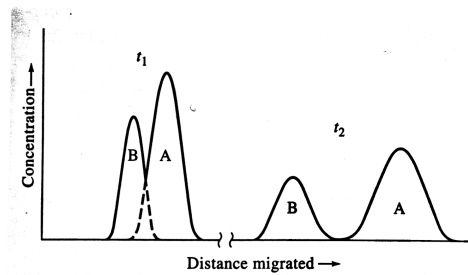


Figure 26-2 Concentration profiles of analyte bands A and B at two different times in their migration down the column in Figure 26-1. The times t_1 and t_2 are indicated in Figure 26-1.

3.4.2 Grandeurs de rétention

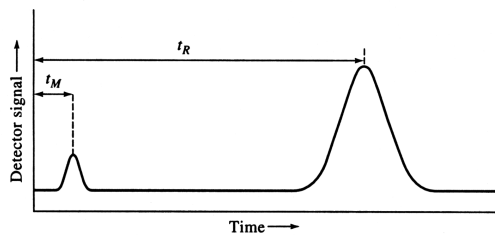


Figure 26-4 A typical chromatogram for a two-component mixture. The small peak on the left represents a species that is not retained on the column and so reaches the detector almost immediately after elution is started. Thus its retention time t_M is approximately equal to the time required for a molecule of the mobile phase to pass through the column.

La vitesse de passage de la phase mobile est **constante**. Chacun des solutés se déplace indépendamment les uns des autres avec une vitesse qui leur est propre et qui dépend de leur comportement vis-à-vis des deux phases, notamment de leur affinité avec la phase stationnaire. La répartition d'un soluté dans la colonne après un certain « temps de passage » peut être représentée par une **courbe d'allure sensiblement gaussienne** si ce « temps de passage » est suffisamment long. On définit ainsi :

$t_R \rightarrow$ temps écoulé entre l'introduction du composé dans la colonne et le moment où il sort à sa concentration maximale [**temps de rétention brut**] ;

$t_S \rightarrow$ temps de « séjour » du composé dans la phase stationnaire, [**temps de rétention net**] (aussi nommé : temps corrigé ou réduit t'_R) ;

$t_M \rightarrow$ temps que met l'**éluant** (non retenu) pour arriver au bas de la colonne, ce qui correspond au temps mis pour parcourir les espaces interstitiels et les volumes dits morts

$$t_M = t_R - t_S$$

Le **débit** de la phase mobile étant **constant**, on déduit des temps définis plus hauts que les volumes correspondants sont :

$V_R \rightarrow$ volume de la phase mobile nécessaire pour amener la substance à sa concentration maximum au bas de la colonne **volume de rétention brut** ;

$V_S \rightarrow$ on peut également définir un **volume de rétention net** (aussi nommé : volume corrigé ou réduit, V'_R) en tenant compte du volume de la phase mobile (V_M) dans la colonne ($V_S = V_R - V_M$). A ne pas confondre avec le « **volume de la phase stationnaire** » aussi (V_S) ;

$V_M \rightarrow$ volume de la phase mobile contenue dans la colonne ou **volume mort de la colonne** (intra et extraparticulaire : $V_M = V_R - V_S$).

Les grandeurs de ces valeurs dépendent des substances et des colonnes utilisées.

3.4.3 Vitesses linéaires moyennes

Vitesse moyenne linéaire de la phase mobile

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M}$$

ou L = longueur de la colonne

Vitesse moyenne linéaire du soluté

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

Fraction de temps dans la phase mobile

$$f = \frac{\bar{V}}{u}$$

Aussi

$$f = \frac{n_{\text{soluté}}(\text{phase mobile})}{n_{\text{TOTAL}}}$$

3.4.4 Facteur de rétention (capacité)

Pour s'affranchir des paramètres géométriques d'une colonne et pour caractériser la rétention d'un composé, le facteur de capacité (k') est défini comme le rapport de la quantité d'un soluté (A) dans la phase stationnaire ($(m_A)_S$) par rapport à la quantité dans la phase mobile ($(m_A)_M$).

Sachant que la masse est égale au produit de la concentration par le volume ($m = C \cdot V$) et que le rapport des masses est aussi égal au rapport du temps de résidence du soluté dans la phase stationnaire (t_s) au temps passé dans la phase mobile, on obtient :

$$k' = \frac{(m_A)_S}{(m_A)_M} = \frac{(C_A)_S V_M}{(C_A)_M V_M} = K_m \frac{V_S}{V_M} = \frac{t_s}{t_M}$$

Pour une colonne donnée, le rapport V_S/V_M est constant. Les variations de k' ne dépendent donc que de celles de K_m et par la suite des interactions mises en jeu.

D'autre part, sachant que le débit ($F = V/t$) de la phase mobile passant à travers la colonne est constant on peut poser :

$$\frac{V_M}{V_R} = \frac{t_M}{t_R} = \frac{t_M}{t_s + t_M}$$

En combinant certains paramètres tirés des deux relations précédentes on obtient :

$$V_R = V_M + K_p V_S$$

V_S étant le volume de la phase stationnaire (ou la masse, ou la surface spécifique du support selon les unités dans lesquelles K_m est exprimé), cette formule établit une relation entre le volume de rétention (V_R) d'un composé, son coefficient de partage entre les deux phases (K_m) et les caractéristiques des phases (V_m, V_s) c'est-à-dire de la colonne.

On remarquera aussi que le facteur de capacité (k') peut être déterminé expérimentalement. En effet, sachant que :

$$K_p V_S = V_R - V_M$$

$$\text{et } k' = \frac{K_p V_S}{V_M} = \frac{t_s}{t_M}$$

$$(\text{avec : } t_s = t_R - t_M)$$

alors :

$$k' = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

puisque $V_R = V_M + K_p V_S$ (voir ci-dessus), on peut aussi écrire :

$$k' = K_p \frac{V_S}{V_M} = \frac{t_s}{t_m}$$

Le volume ou le temps de rétention sont ainsi liés au facteur de capacité par les relations :

$$V_R = V_M(1+k')$$

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

Le temps de rétention t_M d'un composé non retenu étant égal au quotient de la longueur de la colonne (L) par la vitesse linéaire de la phase mobile (\bar{u}) on obtient ($t_M = L/\bar{u}$) :

$$t_R = \frac{L}{\bar{u}}(1+k')$$

Interprétation

De faibles valeurs de k' indiquent des composés peu retenus, élués peu de temps après le volume de phase mobile contenu dans la colonne, lequel correspond à $k' = 0$. **Des valeurs élevées de k'** indiquent des composés fortement retenus, élués après un temps d'analyse assez long : chaque accroissement d'une unité de facteur de capacité nécessite le passage sur la colonne d'un volume supplémentaire de phase éluante égale à V_M pour éluer ce composé.

3.4.5 Facteur de sélectivité

Lorsque nous sommes en présence de plusieurs composés on peut définir un facteur de sélectivité :

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A}$$

$$K_B > K_A$$

$$\alpha \geq 1$$

Expérimentalement,

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_m}{(t_R)_A - t_m}$$

La valeur de α peut être déterminée selon le temps de rétention ou on peut utiliser α pour estimer s'il est possible de séparer les deux espèces en question.

3.5 Efficacité - Détermination de N et de H

- **Détermination de N (pour des courbes gaussiens)**

Dans l'hypothèse d'une distribution approximativement gaussienne (à laquelle conduit d'ailleurs aussi la théorie des plateaux), la formule de définition du nombre de plateaux théoriques :

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

$$N=5.54\left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2$$

ou w = largeur du pic à la base (segment intercepté sur la ligne de base par les tangentes d'inflexion du pic) ou la mi-hauteur du pic (1/2). Elle définit l'*efficacité* d'une colonne chromatographique. Il est possible de calculer N, pour un soluté donné, directement à partir d'un chromatogramme.

- **Détermination de H**

Afin de pouvoir comparer les colonnes chromatographiques, on définit la hauteur équivalente de plateaux théoriques: (HEPT=H):

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

ou L = longueur de la colonne

H et N caractérisent donc le fonctionnement de la colonne car ils dépendent non seulement de la nature des phases et de la géométrie de la colonne, mais également de tous les autres facteurs qui influencent les équilibres. Pour des colonnes de même longueur, celles où les équilibres se réalisent le plus rapidement sont celles où le nombre de plateaux théoriques est le plus élevé ou - ce qui revient au même - sont celles dont les HEPT sont les plus basses.

- **Transformation des unités (secs. en cm)**

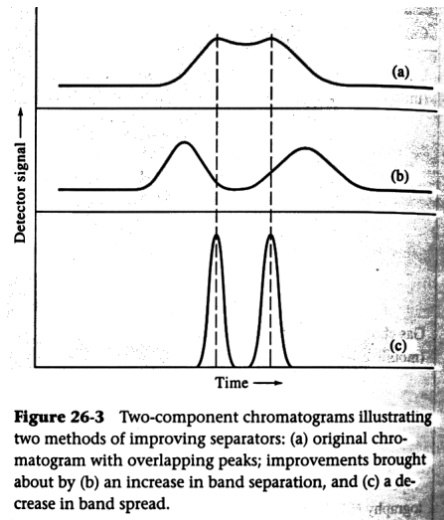
Normalement, la longueur de la colonne (L) est en cm et la variance (σ^2) en cm^2 . Par contre, le chromatogramme aura des unités en minutes ou secondes, et

$w = \tau_a$ (i.e. la largeur du pic est approximativement égale (95%) à 4 X l'écart-type en secondes τ).

$$\tau=\frac{\sigma}{L/t_R}$$

3.6 Résolution

Dans un cas concret, la résolution est une mesure de la qualité d'une séparation chromatographique. Celle-ci dépend à la fois de l'écartement relatif des sommets des pics (facteur thermodynamique exprimé en temps de rétention relatif) et de la finesse des pics (facteur cinétique exprimé en efficacité de colonne).



Supposons deux substances A et B, dont l'une, A, est plus retenue que l'autre, B. On observe alors sur le chromatogramme deux pics :

- (1) substance A
- (2) substance B

$$(t_R)_B > (t_R)_A$$

$$(K_D)_B > (K_D)_A$$

$$\sigma_B > \sigma_A$$

La résolution R_S est définie par la relation :

$$R_S = \frac{\Delta Z}{\frac{W_A}{2} + \frac{W_B}{2}}$$

$$R_S = \frac{2[(t_R)_A - (t_R)_B]}{W_A + W_B}$$

ou

$$R_S = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{w}$$

et puisque

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

$$R_s = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{(t_R)_B} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

$$R_s = 2 \frac{\Delta Z}{w_B + w_A} = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{2(\sigma_B + \sigma_A)}$$

La résolution dépend donc des deux grandeurs : (1) la distance qui sépare les sommets des deux pics (ΔZ) et (2) la largeur de chacun des pics (w). Ces grandeurs sont aisément mesurables sur le chromatogramme et R_s peut être calculé.

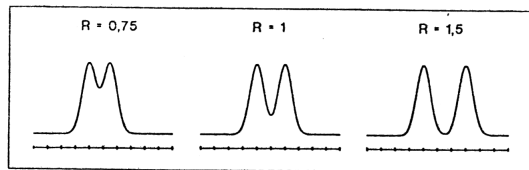
On remarquera que plus la valeur de R_s est élevée, meilleure est la résolution. Quelques exemples permettront d'en réaliser l'incidence pratique.

Cas 1 : $R_s = 1$

Pour ce cas, $(t_R)_B - (t_R)_A = 4\sigma_B$, ce qui signifie que les triangles sont contigus et que les courbes de Gauss, un peu plus larges que les triangles, ne se chevauchent que de 2.3 % ce qui est suffisant pour des séparations rapides.

Cas 2 : $R_s = 1.5$

Pour ce cas, $(t_R)_B - (t_R)_A = 6\sigma_B$, ce qui signifie que la distance entre les bases des deux triangles est de 2. Les courbes de Gauss correspondantes ne se chevauchent, alors que de 0.13 %.



3.7 Optimisation de la séparation

- Il est important de relier les facteurs de sélectivité et capacité à la résolution

$$k_A = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

donc,

$$R_s = \frac{k_B - k_A}{1 + k_B} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right)$$

$$N = 16 R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k_B}{k_B} \right)^2$$

$$(t_R)_B = \frac{16R_S^2 H}{\bar{u}} \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right) \frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2}$$

Toute séparation est donc un compromis entre une bonne résolution et un temps de séparation raisonnable.

$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \cdot \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k'_B}{1+k'_B} \right)$
$(t_R)_B = \frac{16R_S^2 H}{\bar{u}} \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \cdot \frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2}$
<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> I II III </div>

I = partie cinétique

II = partie thermodynamique (sélectivité)

III = partie thermodynamique (rétention)

• **La résolution et le temps de séparation dépendent de 3 facteurs:**

- le facteur de capacité, k'
- la sélectivité, α
- l'efficacité de la colonne, N (ou H)

3.7.1 Rôle du facteur de capacité (III)

- Le facteur de capacité doit être compris entre 1 et 10 pour que son influence soit importante sur la résolution
- L'influence du facteur de capacité n'est pas prépondérante

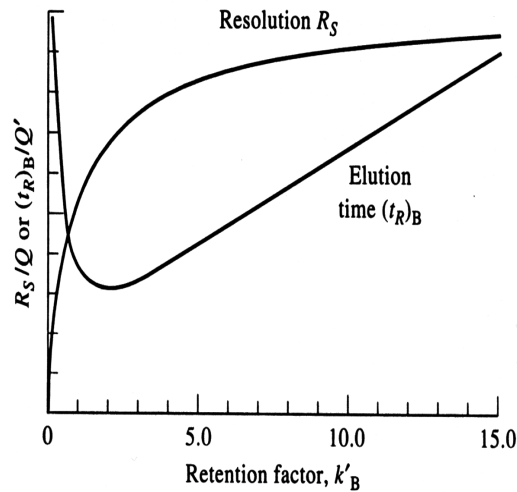


Figure 26-12 Effect of retention factor k'_B on resolution R_s and elution time $(t_R)_B$. It is assumed that Q and Q' remain constant with variation in k'_B .

$$k = \frac{(m_A)_s}{(m_A)_m} = \frac{(C_A)_s}{(C_A)_m} \cdot \frac{V_s}{V_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

$$R_s = Q \left(\frac{k'_B}{1+k'_B} \right)$$

$$(t_R)_B = Q' \left(\frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2} \right)$$

- optimal entre 1 et 5 (~ 2)
- très important (surtout en CPL)
- *En CPL* : on peut modifier la phase mobile
- *En CPG* : on peut modifier la température de la phase mobile

3.7.2 Rôle de la sélectivité (II)

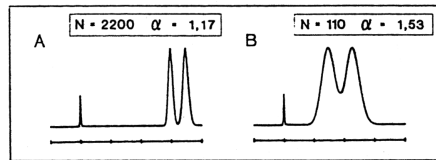
- La sélectivité doit être supérieure à 1
- très grande influence sur la qualité de la séparation

$$R_s = f\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)$$

$$(t_R)_B = f\left(\frac{\alpha}{\alpha-1}\right)^2$$

- Si $\alpha \approx 1$, on n'aura jamais de séparation efficace, même avec un grand N et une valeur optimale de k'

- Il faut donc augmenter α , tout en gardant k' entre 1 et 5
 - modification de la phase mobile (y compris des modifications de pH)
 - modification de la température (CG, CL [échange ionique])
 - modification de la composition de la phase stationnaire
 - plusieurs colonnes
 - modifications chimiques de la phase stationnaire



3.7.3 Rôle de l'efficacité de la colonne N (ou H) (I)

- Il faut examiner le rôle de la cinétique des échanges à travers H (hauteur équivalent d'un plateau théorique ; van Deemter)

3.7.3.1 Equation de van Deemter

La théorie des plateaux néglige donc le fait que la chromatographie est un phénomène dynamique résultant du passage continu de la phase mobile sur la phase stationnaire. En effet, elle ne tient pas compte d'un élargissement ou au contraire d'un rétrécissement des pics que l'on peut pourtant observer pratiquement selon le **débit de la phase mobile**.

- Plusieurs versions existent de l'équation de van Deemter:

e.g.

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_g}{\bar{u}} + \left(\frac{8}{\pi^2} \frac{k' d_f^2}{(1+k')^2 D_l} \right) \bar{u}$$

$$H = \frac{2k_D D_M}{\bar{u}} + \frac{qk' d_f^2 \bar{u}}{(1+k')^2 D_S} + \frac{2t_{dk} \bar{u}}{(1+k')^2} + \frac{f(d_p^2, d_c^2, \bar{u})}{D_M} \bar{u}$$

ce qu'on peut estimer par:

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

ou

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + (C_S + C_M)\bar{u}$$

- Selon ces équations, les trois phénomènes qui contribuent à l'élargissement des pics sont :
 - existence de chemins multiples (anisotropie d'écoulement) (A)
 - diffusion moléculaire longitudinale (B)
 - résistance au transfert de masse (C)

3.7.3.2 Anisotropie d'écoulement (A)

L'anisotropie d'écoulement du fluide est souvent qualifié du terme ambigu de « diffusion tourbillonnaire » (en anglais « eddy diffusion »). Ce phénomène tire son origine du contournement aléatoire des particules du support solide par le fluide. Il entraîne une inégalité dans la vitesse de déplacement axial des différents « filets du fluide » qui contourne les grains. La contribution de ce phénomène à la hauteur d'un plateau est à première approximation indépendante du débit de la phase mobile :

$$A = 2 \lambda d_p$$

d_p : diamètre des particules constituant la phase stationnaire,

λ : paramètre qui tient compte des irrégularités du remplissage de la colonne.

- indépendante du débit
- réduction de A pour des particules qui sont petites et uniformes
- important de réduire les espaces morts

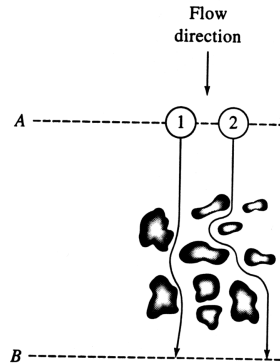


Figure 26-8 Typical pathways of two molecules during elution. Note that distance traveled by molecule 2 is greater than that traveled by molecule 1. Thus, molecule 2 would arrive at B later than molecule 1.

3.7.3.3 Diffusion moléculaire longitudinale (B)

La diffusion moléculaire longitudinale est bien connu pour toute particule au sein d'un fluide en mouvement ou non (dispersion par diffusion due à l'entropie du soluté des zones de grande concentration dans des régions de faible concentration, selon les lois de Fick). Cette diffusion est d'autant plus importante que la vitesse de passage du fluide est plus faible. L'influence de ce phénomène sur la hauteur d'un plateau est représentée par la relation :

$$\frac{B}{u} = \frac{2\gamma D_M}{u}$$

D_M : Coefficient de diffusion moléculaire du soluté dans la phase mobile

γ : « facteur de tortuosité » ou « d'obstruction » tenant compte de la sinuosité du parcours du fluide (obstacle à la diffusion du soluté).

- dispersion des molécules dans une direction parallèle à l'axe de la colonne
- diffusion selon le gradient de concentration
- la diffusion dans le sens inverse à l'écoulement est plus importante dû au débit de la phase mobile

3.7.3.4 Résistances au transfert de masse (C)

La résistance au transfert de masse tant dans la phase mobile que dans la phase stationnaire s'exercent à tout moment au cours de la chromatographie : fixation ou élution.

- Dans la phase mobile, toutes les molécules ne sont pas entraînées à la même vitesse. Celles du milieu du flux progressent plus vite que celles se trouvant à l'extérieur, créant ainsi des conditions de partage différentes ;

- b) Le contact phase mobile-phase stationnaire ne s'effectue pas partout de manière identique et il est bien évident que le trajet à l'intérieur des anfractuosités du support est différent de celui se produisant à la surface :
- c) Lorsque la phase stationnaire est constituée par un liquide recouvrant la surface du support inerte, les molécules une fois fixées dans la phase stationnaire sont situées à des distances différentes de la phase mobile et l'élution ne se fait pas partout à la même vitesse. Le temps de séjour (t_s) dans la phase stationnaire est donc fonction du chemin à parcourir.

- Ce paramètre représente l'équilibre élution-rétention du soluté entre les phases stationnaire et mobile.
- Elle est d'autant plus important que le débit de la phase mobile est important.

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + (C_s + C_m)\bar{u}$$

$$C_s \cdot \bar{u} = \frac{f_s(k) d_f^2}{D_s} \quad (\text{phase stationnaire})$$

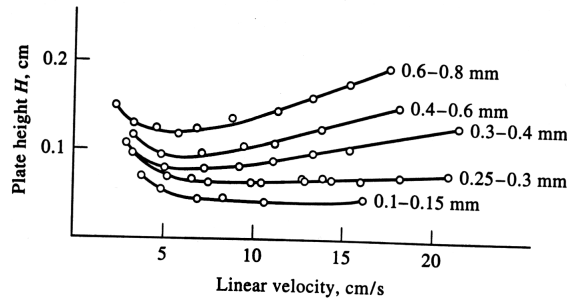
$$C_m \cdot \bar{u} = \frac{f_m(k) d_p^2}{D_m} \quad (\text{phase mobile})$$

- Elle est due aux processus de non-équilibre (*i.e.* soluté passe trop de temps dans une des phases).
- Si l'on augmente le temps du soluté dans la colonne (en diminuant le débit), on approche de plus en plus de l'équilibre.

3.7.3.5 Résumé: pour réduire w (H)

Tous les phénomènes précédentes entraînent ainsi des retards pour l'établissement des équilibres et ceci d'une manière **d'autant plus accentuée que le débit de la phase mobile est plus rapide**. Pour atténuer ces facteurs de résistance, il y a lieu de diminuer les distances à parcourir dans chaque phase en réduisant le diamètre des particules, l'épaisseur de la phase stationnaire et en utilisant une colonne régulièrement remplie et bien tassée. De même, en CG on peut diminuer la température afin de réduire le coefficient de diffusion (pas très utile en CL puisque D_m est déjà trop petit).

e.g. effet du diamètre des particules

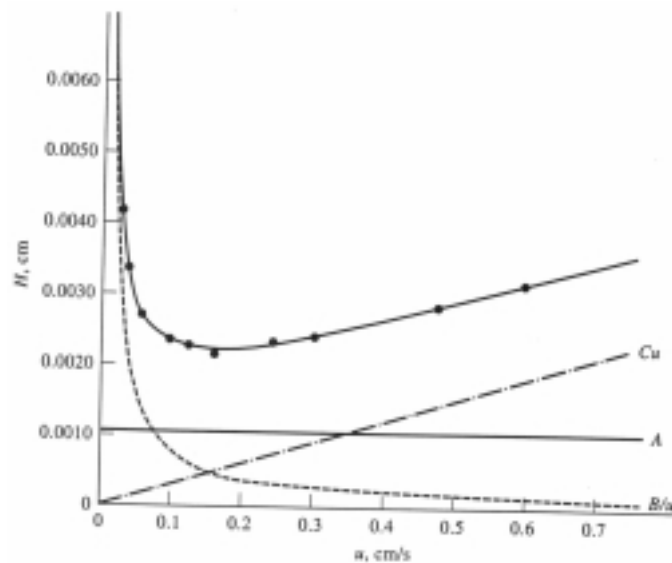


3.7.3.6 Equation globale de van Deemter

L'équation globale. Finalement la hauteur du plateau peut s'exprimer par la relation générale:

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + (C_s + C_m)\bar{u}$$

En effet, la vitesse linéaire liée au débit est le principal paramètre physique à la disposition de l'expérimentation pour modifier la cinétique de la chromatographie. L'équation ci-dessus correspond à celle proposée par Van Deemter, Zuderweg et Kinkenber (1956) et appelée « **relation de Van Deemter** ». \bar{u} représente donc la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile.



Aux faibles valeurs de \bar{u} , le terme B / \bar{u} prédomine (la courbe devient asymptote à une droite de pente négative) et explique la perte d'efficacité vers les très faibles vitesses. Aux grandes vitesses, le terme $C\bar{u}$ prédomine (la courbe devient asymptote à une droite de pente positive) et explique la perte d'efficacité aux très grandes vitesses). Dans la région intermédiaire, le terme A est prépondérant et H passe par un minimum (H_{\min}).

La courbe représentant l'équation de Van Deemter est donc une hyperbole. Elle montre que la variation de H en fonction de \bar{u} passe par une valeur minimale calculée en cherchant la valeur de \bar{u} correspondant à l'annulation de la dérivée première de cette fonction (\bar{u}_{opt}) :

$$f'(\bar{u}) = -\frac{B}{\bar{u}^2} + C$$

d'où pour que $f'(\bar{u}) = 0$, il faut que :

$$-\frac{B}{\bar{u}^2} + C = 0,$$

alors la vitesse optimale :

$$\bar{u}_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

Dans ce cas, H devient (minimum) :

$$H_{min} = A + 2\sqrt{BC}$$

d'où :

$$N_{max} = \frac{L}{H_{min}} = \frac{L}{A + 2\sqrt{BC}}$$

REMARQUES

- L'équation de Van Deemter bien qu'initialement appliquée à la chromatographie en phase gazeuse (CG) peut être également, par extension, appliquée à la **chromatographie liquide** (CL). Si la formule générale reste la même, la courbe représentative est cependant différente car on n'observe apparemment pas de valeur minimale pour H. Celle-ci croît en effet régulièrement avec le débit ce qui est dû au fait que dans les liquides le terme B est très petit et qu'il n'intervient que pour des valeurs de \bar{u} très faibles, pratiquement jamais réalisées.

- **La détermination des paramètres A, B et C** est difficile à effectuer (théoriquement) mais il est toutefois possible de tracer expérimentalement l'équation précédente pour une colonne de longueur L de la manière suivante (voir aussi problèmes de chimie analytique): on effectue plusieurs chromatographies successives (au moins 3) en faisant varier le débit de la phase mobile (ou la température). Pour chaque expérience, le tracé chromatographique permet, comme nous le savons ($N = (t_R/\sigma_t)^2$), de calculer le nombre de plateaux N et ainsi de connaître la valeur de H ($H = L/N$).

Trois équations, trois inconnus : les courbes reliant H aux valeurs correspondantes de \bar{u} (ou de T) peuvent alors être construites et permettre de connaître les conditions optimales correspondant à la plus petite valeur de H.