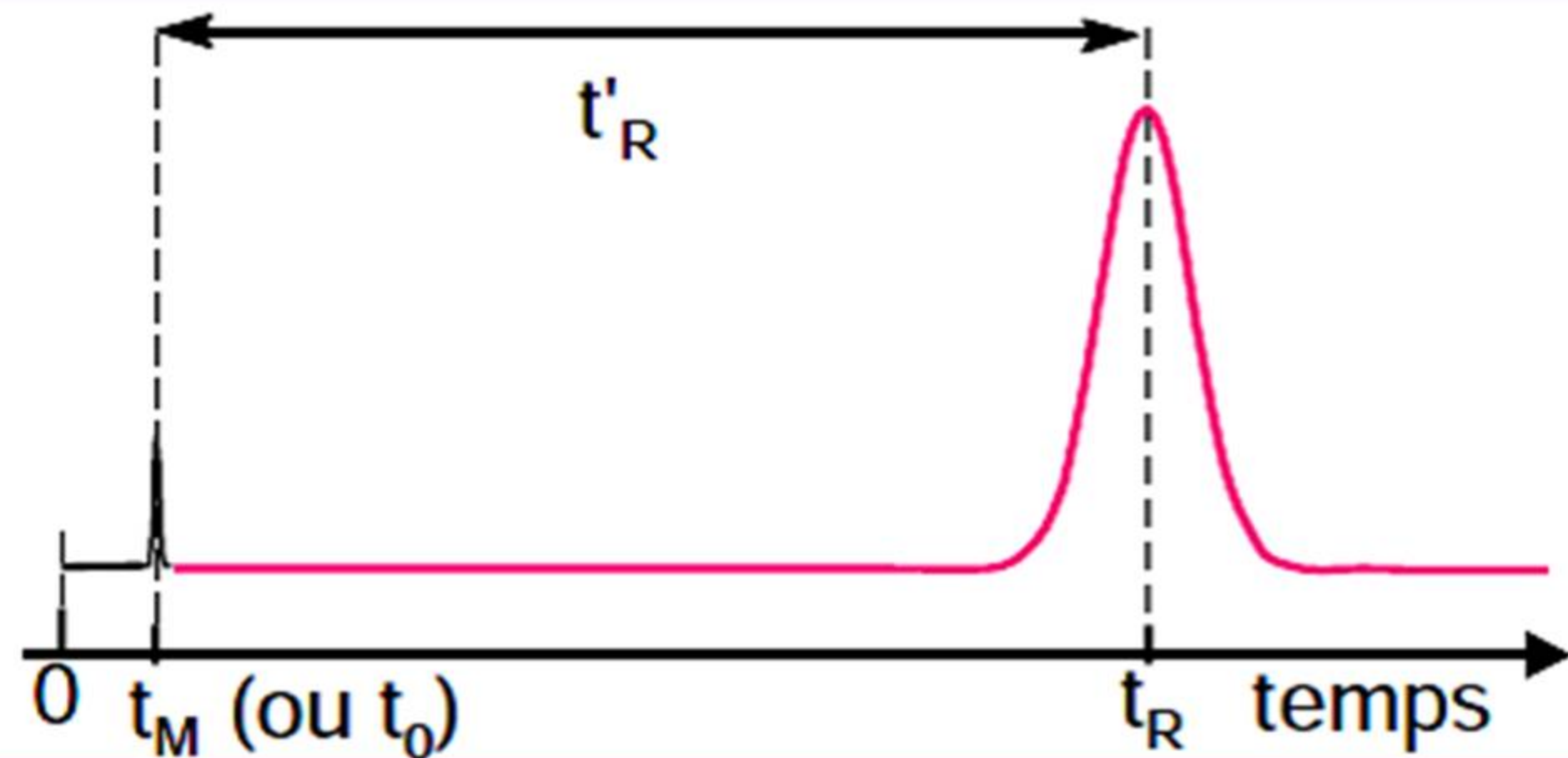


# *Chromatogramme*

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 1**). Le temps (ou très rarement le volume d'élution) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée.

## a) Temps de rétention

*Dr Laib*



**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.



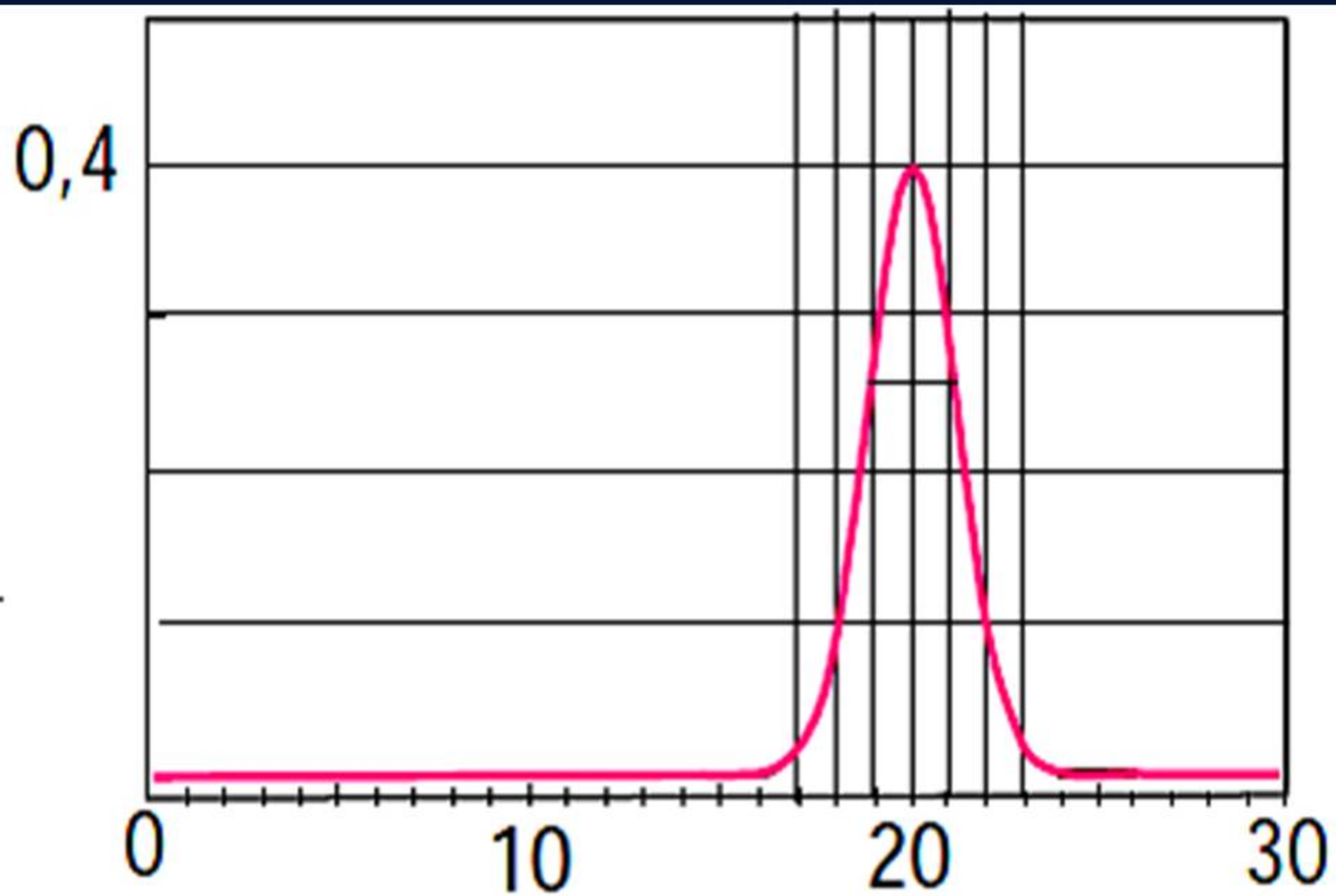
**Temps de rétention  $t_R$** , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié.

Un constituant non retenu sort de la colonne au temps  $t_M$ , appelé temps mort (désigné également par  $t_0$ ).

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé  $t'_R$ .

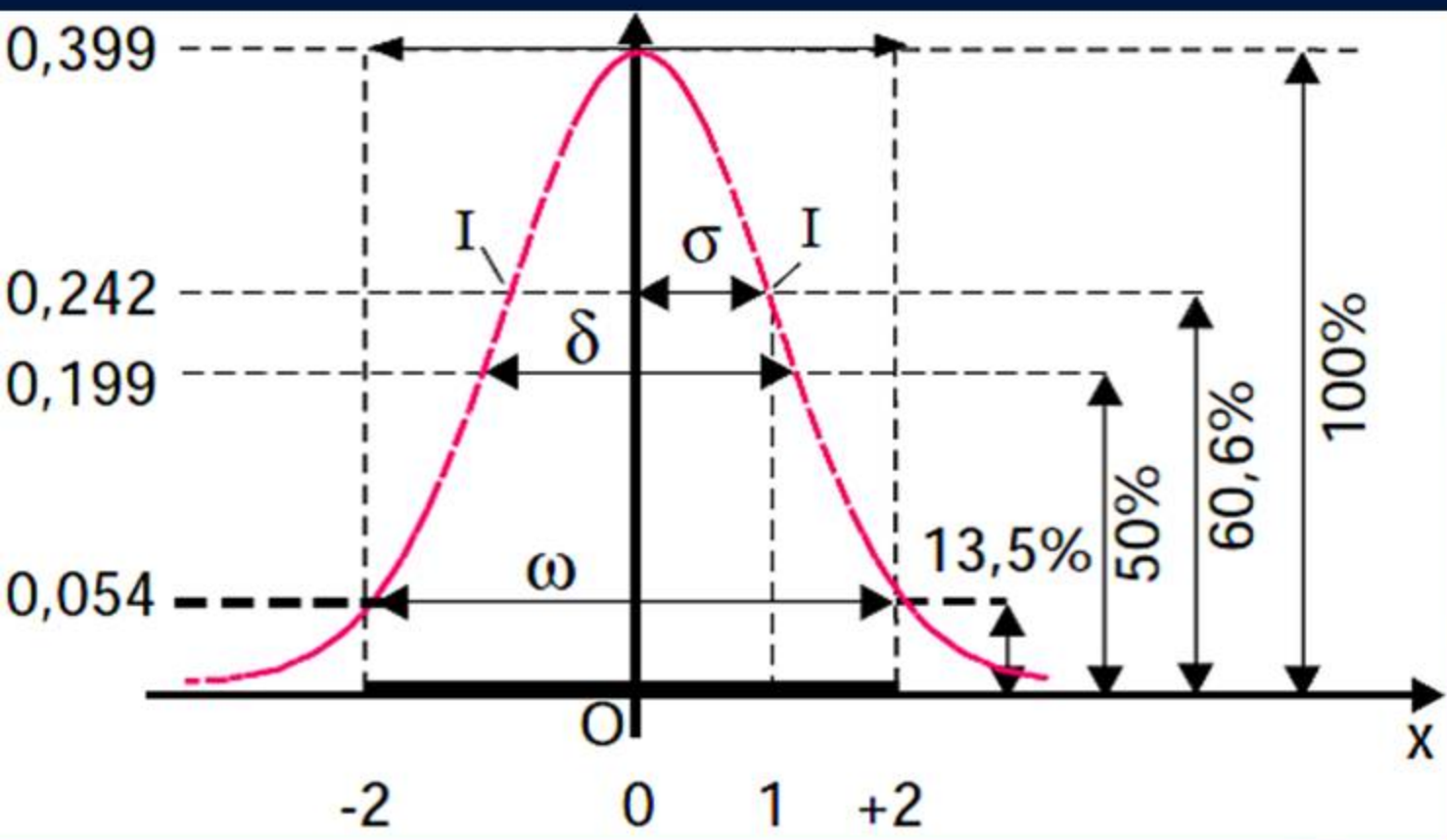
**b) Courbe de Gauss avec  $\mu$  20 et  $\sigma = 1$**

*Dr Laib*



## c) Caractéristiques du pic idéal

Dr Laïb



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

En chromatographie,  $\delta$  désigne la largeur à mi-hauteur ( $\delta = 2,35 \sigma$ ) et  $\sigma^2$  la variance du pic. La largeur « à la base » du pic, appelée  $\omega$  est mesurée à 13,5 % de la hauteur, point où, la courbe étant gaussienne, on a  $\omega = 4 \sigma$  par définition.

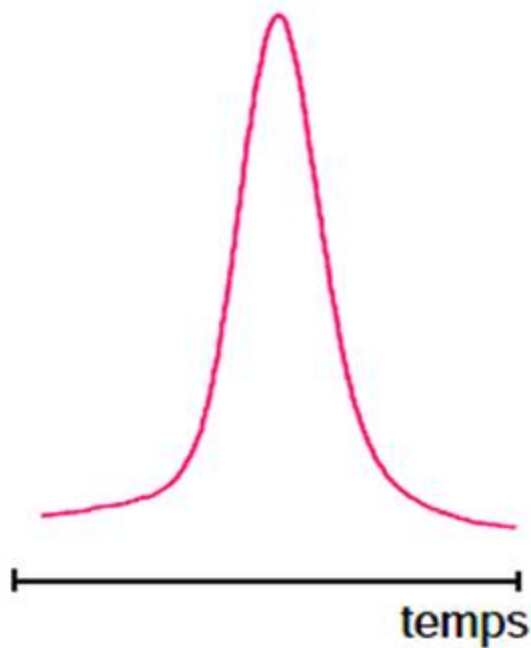
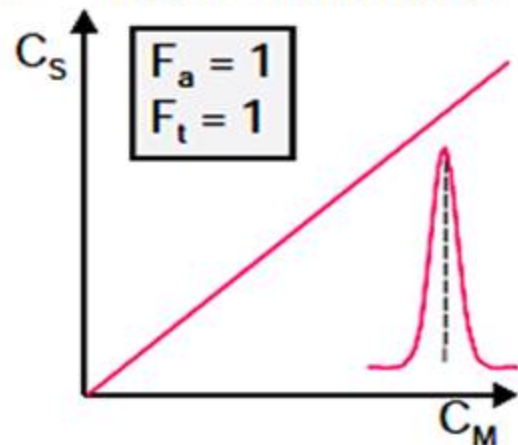


L'asymétrie observée d'un pic est traduite par deux paramètres appelés facteur d'asymétrie ( $F_a$ ) et facteur de traînée ( $F_t$ ), mesurés à 10 % de sa hauteur (figure 2) :

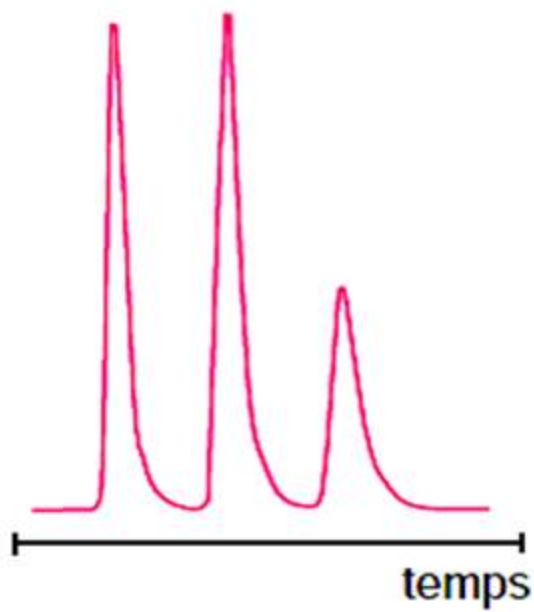
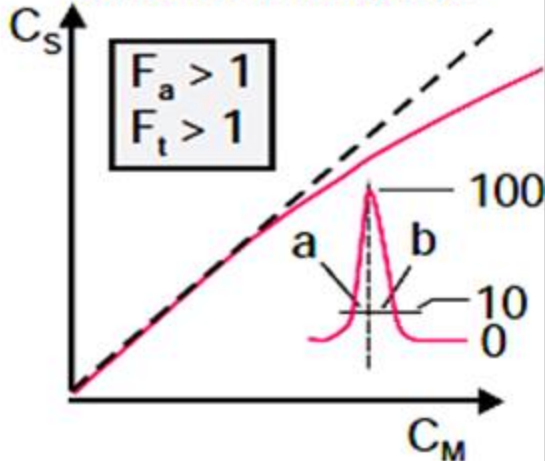
$$F_a = \frac{b}{a}$$

$$F_t = \frac{a + b}{2a}$$

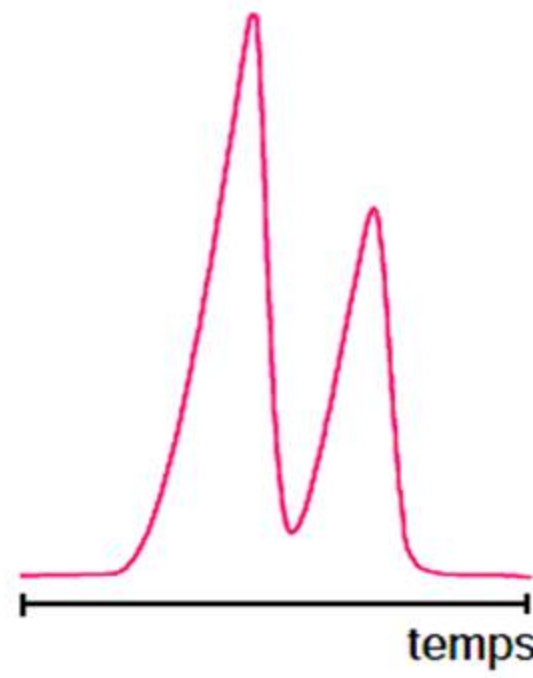
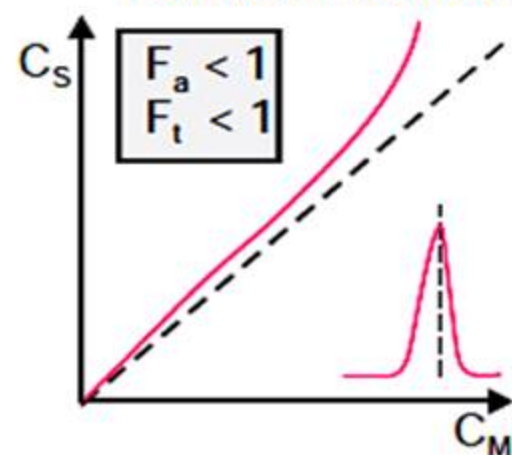
a *isotherme linéaire*



b *isotherme convexe*



c *isotherme concave*





**a) Situation idéale correspondant à l'invariance** *Dr Laib*

**De l'isotherme de concentration;**

- b) Situation dans laquelle la phase stationnaire est saturée (la montée du pic est plus rapide que la descente) (facteur de traînée ( $F_t$ ) plus grand que 1);**
- c) Situation inversée : le constituant est trop retenu dans la phase stationnaire, le temps de rétention est allongé et la montée du pic est plus lente que la descente, qui apparaît normale.**

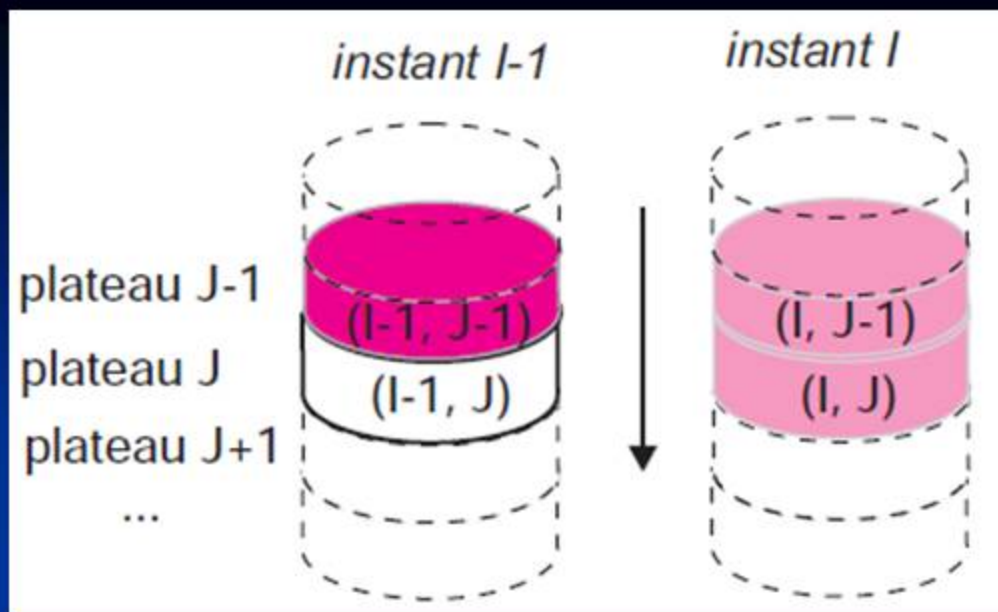
## 1. Modèle des plateaux

Pour expliquer le mécanisme de migration et de séparation des composés dans la colonne, le modèle des plateaux de Craig, permet de décrire de manière simple les séparations.

Chaque soluté se déplace progressivement en une suite d'étapes distinctes.

Le processus élémentaire est représenté par un cycle d'adsorption/désorption.





Si on se place à l'instant  $I$ , le plateau  $J$  contient une masse totale de soluté  $m_T$  qui se compose de la quantité  $m_M$  de ce soluté qui vient d'arriver de la phase mobile du plateau  $J-1$ , en équilibre à l'instant  $I-1$ , à laquelle s'ajoute la quantité  $m_S$  déjà présente dans la phase stationnaire du plateau  $J$  à l'instant  $I-1$ .

Ces équilibres successifs sont à la base de la notion

De plateau théorique selon lequel la colonne de longueur

$L$  est découpée en  $N$  petits disques fictifs de même

Hauteur  $H$ , numérotés de 1 à  $n$ .

Pour chacun d'eux, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration dans la phase stationnaire de ce soluté.

À chaque nouvel équilibre le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire dans la colonne, appelé **plateau**



La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou  $H$ ) vaut :

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

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

## 2. Coefficient (constante) de distribution de Nernst ( $K$ )

C'est le paramètre physico-chimique de base en chromatographie qui quantifie le rapport de concentration de chaque composé entre les deux

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

Les valeurs de  $K$  sont très variables. Elles sont grandes (ex : 1000) lorsque la phase mobile est un gaz, et petites (ex : 2) lorsque les deux phases sont à l'état condensé.

### 3. Efficacité d'une colonne

*Dr Laib*

#### ■ 3.1. Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

À mesure que le soluté migre dans la colonne, il occupe une zone allant s'élargissant (figure 3). Cette dispersion linéaire  $\sigma_l$ , repérée par la variance  $\sigma_l^2$  croît avec la distance parcourue. Lorsque cette distance vaut  $L$ , longueur de la colonne, on pose :

$$\sigma_L^2 = H \cdot L$$



## En rappel du modèle de la théorie des plateaux

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

:

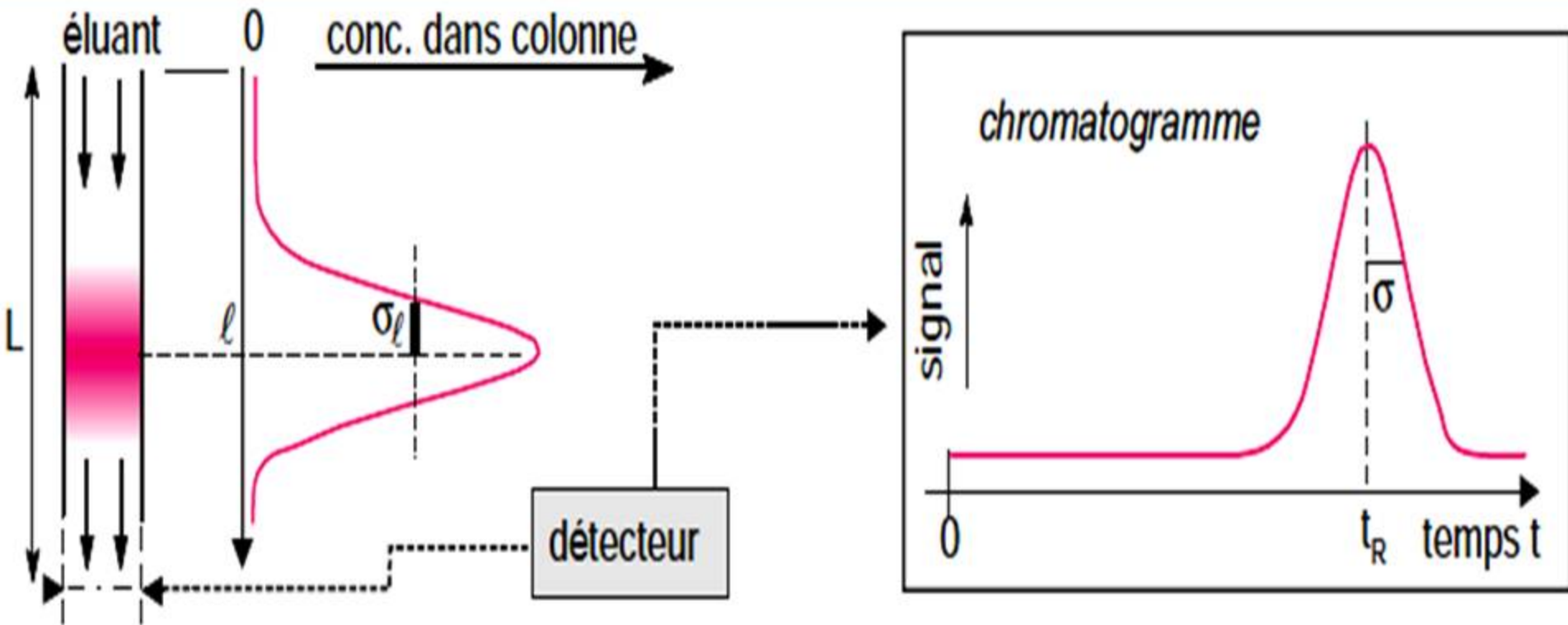
$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2}$$

ou

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2}$$

- Ces deux paramètres sont accessibles de manière indirecte à partir du pic d'élution du composé. On mesure  $t_R$  et  $\sigma$  dont le rapport à même valeur que celui de  $L$  et de  $\sigma_L$ .





**Figure 3 :** La courbe de gauche correspond à une image de la concentration du composé élué à l'instant considéré ; Le chromatogramme de droite, à la variation de la concentration en sortie de colonne en fonction du temps.

Sur le chromatogramme,  $\sigma$  représente la demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur et  $t_R$  le temps de rétention du composé.  $t_R$  et  $\sigma$  doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant).

Si on exprime  $\sigma$  en unités de volume (en faisant intervenir le débit),  $4\sigma$  correspond au «volume du pic» soit 95 % du composé injecté.

Par suite des propriétés de la courbe de Gauss ( $\omega = 4\sigma$ ),  
il en résulte la formule :  $N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2}$

Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette  
dernière est rarement employée : on utilise de  
préférence la formule équivalente :  $N = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2}$

**N** est un paramètre relatif, puisqu'il dépend à la fois du  
soluté et des conditions opératoires suivies.



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

Afin de comparer les performances de colonnes de conceptions différentes, vis-à-vis d'un même composé, (cas en CPG lorsqu'on voulait comparer les performances d'une colonne capillaire et d'une colonne remplie), on remplace le temps total  $t_R$  qui figure dans les expressions :

$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2}$$

ou

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2}$$

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2}$$

$$N = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2}$$



Par le temps de rétention réduit  $t'_R$  qui ne tient pas compte du temps mort  $t_M$  passé par le composé dans la phase mobile. Les trois précédentes expressions deviennent :

$$N_{\text{eff}} = \frac{t_R'^2}{\sigma^2}$$

$$N_{\text{eff}} = 16 \frac{t_R'^2}{\omega^2}$$

$$N_{\text{eff}} = 5,54 \frac{t_R'^2}{\delta^2}$$

### 3.3. Hauteur de plateau

En chromatographie gazeuse, on a longtemps utilisé une valeur corrigée appelée hauteur de plateau effectif  $H_{\text{eff}}$  faisant intervenir l'efficacité réelle à la place de l'efficacité théorique.

Le calcul de  $H_{\text{eff}}$  à partir de l'efficacité réelle utilise l'expression :

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{N_{\text{eff}}}$$

**Hauteur de plateau réduite.** En chromatographie *Dr Laib*  
dont la **phase mobile** est un **liquide** et pour les colonnes  
dont le **remplissage** est formé de **particules sphériques**,  
on rencontre assez souvent la **hauteur de plateau réduite**,  
 **$h$** , qui tient compte du **diamètre moyen  $d_m$**  des particules.  
On **élimine** en quelque sorte l'**effet** de la **taille** des  
**particules**. Des colonnes présentant le même rapport  
(longueur de la colonne)/(diamètre des particules)  
conduisent à des performances semblables.

$$h = \frac{H}{d_m} = \frac{L}{N \cdot d_m}$$



## 4. Grandeurs de rétention

### 4.1. Temps de rétention ( $t_R$ )

Le temps de rétention  $t_R$  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.

Dans le cas idéal  $t_R$  est indépendant de la quantité injectée.



## 4.2. Volume d'élution ou de rétention ( $V_R$ )

- Le volume d'élution (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. Si le débit  $D$  est stationnaire :
- $$V_R = t_R \cdot D$$

- Volume d'un pic,  $V_{\text{pic}}$ . Il correspond au volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne. Il vaut par définition :

$$V_{\text{pic}} = \omega.D$$

### 4.3. Volume de la phase mobile ( $V_M$ )

- 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  $D$  :

$$V_M = t_M \cdot D$$



## 4.4. Volume de la phase stationnaire

Ce volume désigné par  $V_s$  n'apparaît pas sur le chromatogramme. Dans les cas simples :

- Volume total interne de la colonne vide - le volume de la phase mobile.

## 4.5. Facteur de rétention $k$ (ou de capacité) *Dr Laib*

- 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. 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.

Quand un composé de masse totale  $m_T$  est introduit dans la colonne, il se répartit en deux quantités :  $m_M$  dans la phase mobile et  $m_S$  dans la phase stationnaire.

Si on ne change pas les conditions opératoires, ces deux quantités demeurent constantes au cours de sa migration dans la colonne.



Le rapport de  $m_T$  et  $m_S$ , appelé facteur de rétention ou de capacité ( $k$ ), est indépendant de  $m_T$  :

$$k = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_M} = K \frac{V_S}{V_M}$$

Prenons le cas d'une molécule qui passe les 9/10 de son temps dans la phase stationnaire.

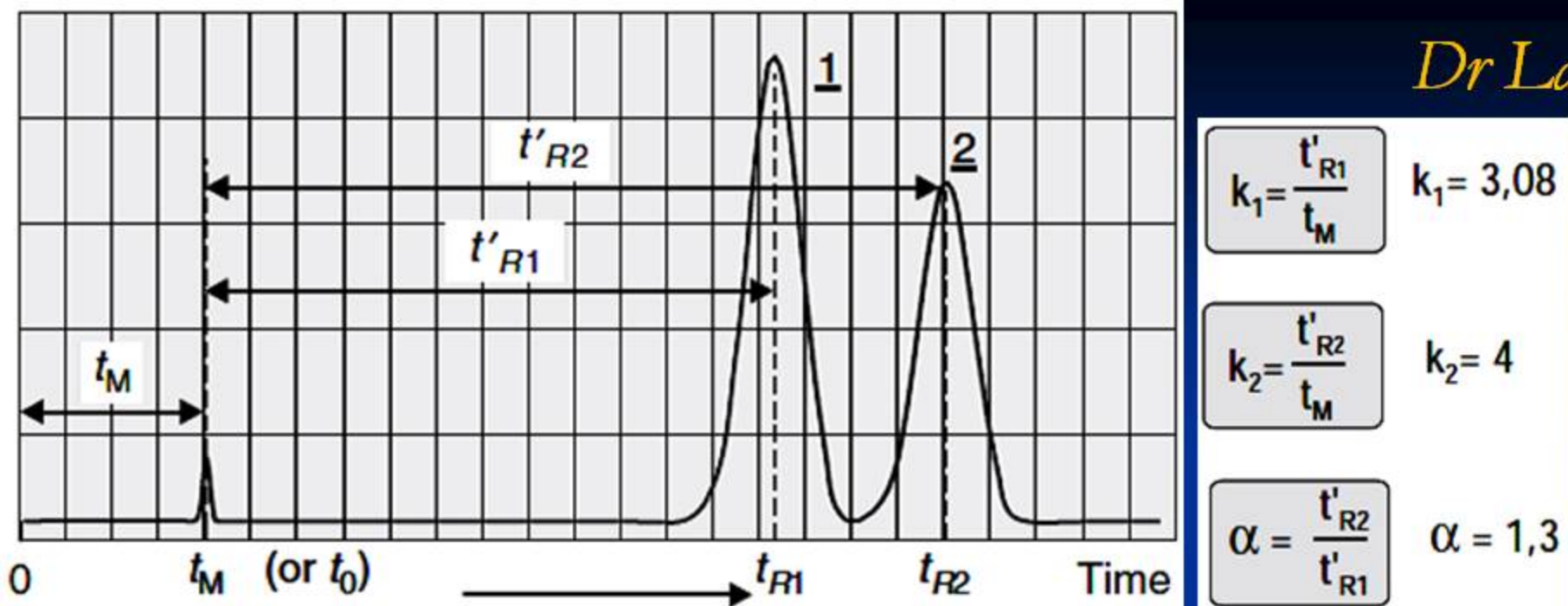
Sa vitesse moyenne sera 10 fois plus lente que si elle restait en permanence dans la phase mobile. Par conséquent si 20 mg de composé ont été introduits dans la colonne, il y aura en moyenne et en permanence 2 mg dans la phase mobile et 18 mg dans la phase stationnaire.

- **5. Facteur de séparation (ou sélectivité) entre deux solutés ( $\alpha$ )**
- Le facteur de séparation  $\alpha$  permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents 1 et 2 sur un chromatogramme (figure 3). Il est défini par les relations suivantes :

$$\alpha = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}} \quad \text{ou} \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

Il ne peut, par définition, être inférieur à 1.





**Figure 3 : Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents.** Chaque composé a un **facteur de rétention** qui lui est propre.  $\alpha$  à lui seul, ne permet pas de savoir si la séparation est réellement possible. Sur **cette figure**, le **facteur de séparation** est d'environ 1,3.

## 6. Facteur de résolution entre deux pics R

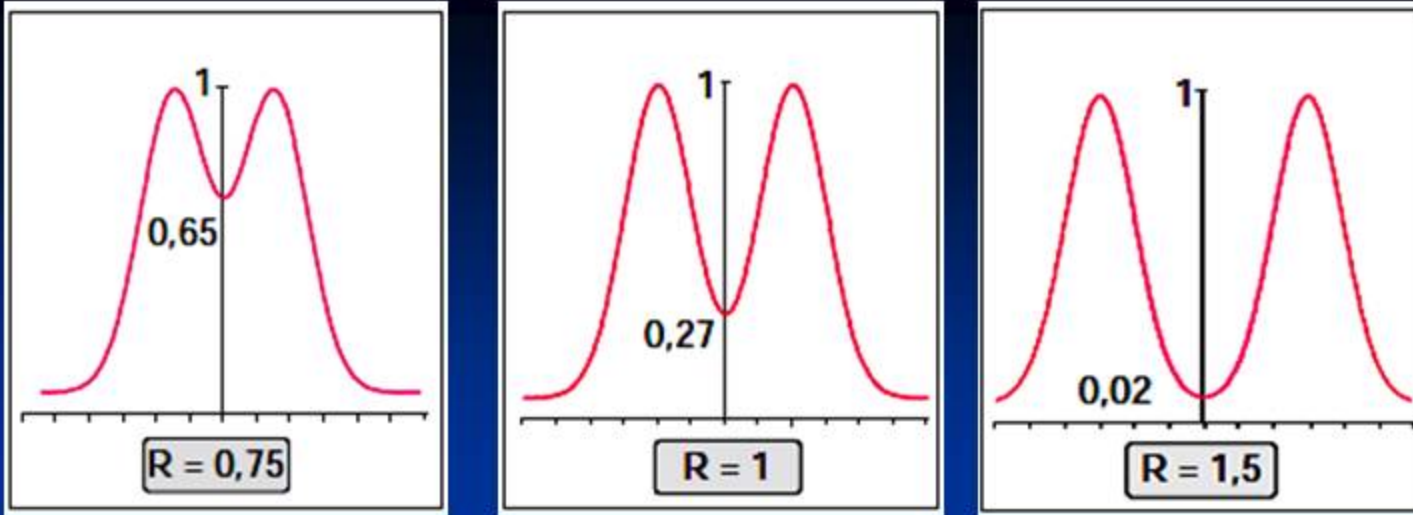
Pour traduire numériquement la plus ou moins bonne séparation entre deux composés, on utilise le facteur de résolution R :

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

$$R = 1,177 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\delta_1 + \delta_2}$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2}$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \cdot \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2}$$



**Figure 4 : Facteur de résolution.**

Simulation de pics chromatographiques par juxtaposition plus ou moins rapprochée de 2 courbes gaussiennes identiques. Aspect visuel correspondant aux valeurs de R indiquées sur les diagrammes.

À partir de  $R = 1,5$  on considère que les pics sont résolus, la vallée entre les pics étant d'environ 2 %.