



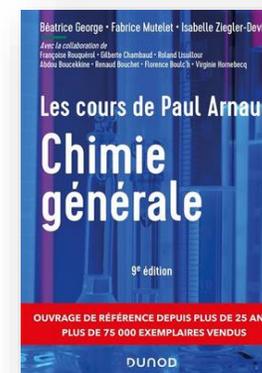
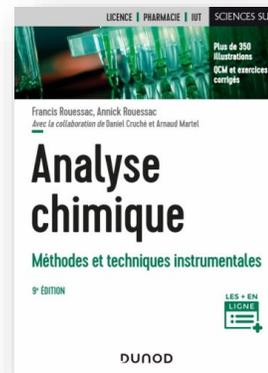
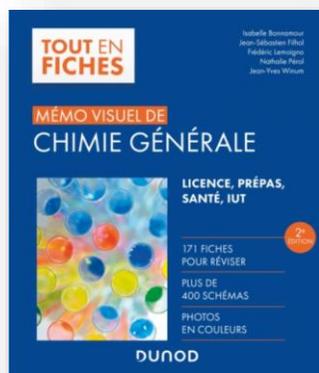
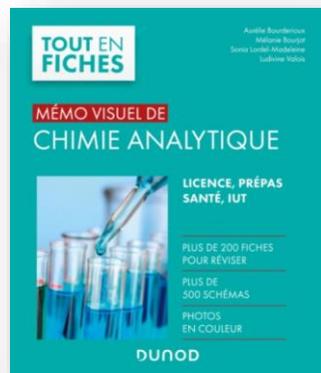
# Techniques Chromatographiques

## Partie 1 – Grandeurs Caractéristiques



# Les lectures impératives

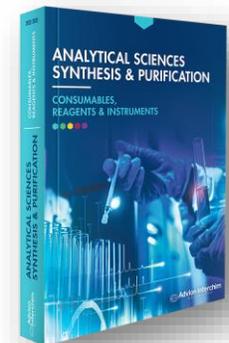
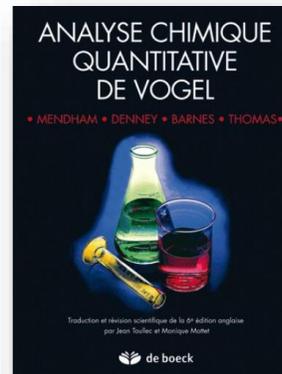
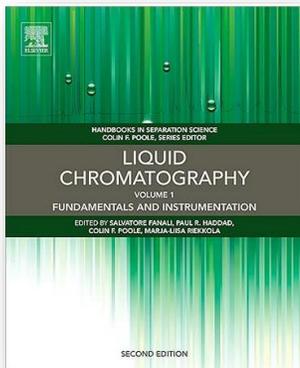
- ✕ Bourderieux A., Bourjot M., Lordel S., Valois L., *Mémo Visuel de Chimie Analytique*, Tout en fiches, Dunod 2020.
- ✕ Bonnamour I., Filhol J.S., Lemoigno F., Pérol N., Winum J.Y. *Mémo Visuel de Chimie Générale*, Tout en fiches, 2<sup>ème</sup> édition, Dunod 2022.
- ✕ Rouessac F., Rouessac A. *Analyse Chimique Méthodes et techniques instrumentale*, 9<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris, 2019.
- ✕ Arnaud P., *Les cours de Paul Arnaud Chimie Générale*, 8<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris, 2016.





# Les lectures pour aller plus loin

- ✗ Poole C., Fanali S., et al *Liquid Chromatography : Fundamentals and Instrumentation*, 2<sup>nd</sup> Edition, Elsevier, Juillet 2017.
- ✗ Vogel A., Mendham J., Denney R. C., Barnes J. D., *Analyse Chimique Quantitative De Vogel*, 6<sup>ème</sup> édition, De Boeck, 2006.
- ✗ Caude M. Jardy A. *Chromatographie en phase liquide Théorie et méthode de séparation* PE 1 455, Technique de l'ingénieur, 1994
- ✗ Arpino P. *Chromatographie en phase Gazeuse* P 1 485, Technique de l'ingénieur, 1996
- ✗ *Analytical Sciences Synthesis & Purification – Consommables Reagents & Instruments*, Interchim 2024 - 2025





# Le programme

## × Naissance de la Chromatographie

→ Quelques dates clés

## × Prérequis – Les liaisons faibles

→ Existence

→ Moment dipolaire

→ Liaisons de Van der Waals

→ Liaisons Hydrogène

## × Prérequis – Le coefficient de Partage

→ Illustration

→ Le log de P

→ Polarité des solvants

## × Principes et grandeurs caractéristiques

→ Dimension du chromatogramme

→ Facteur de rétention

→ Facteur de sélectivité

→ Coefficient de résolution

→ Facteur d'asymétrie



# Evolution Historique - évènements clés

## 21 mars 1903

Mikhail Tswett (botaniste Russe) présente ses travaux sur la chromatographie de pigments végétaux, marquant la naissance de la chromatographie

## 1948 et 1952

Attribution de prix Nobel à Tiselius, Martin et Synge pour leurs contributions à la chromatographie

## Aujourd'hui

Diversification des détecteurs et déploiement massif en biologie

## 1931

Publication de Kuhn et Lederer sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle, redécouvrant les travaux de Tswett

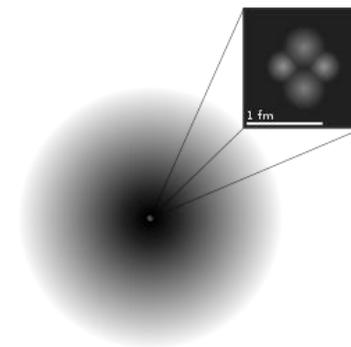
## 1944 - 1969

Développement de nouvelles techniques chromatographiques (papier, gel, HPLC) étendant les applications de la chromatographie

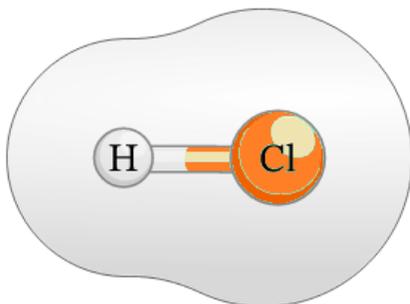


# Prérequis – Les liaisons faibles

- ✗ Noyau (Protons/Neutrons)
- ✗ Electrons chargés négativement réparti autour du noyau chargé positivement



- ✗ L'association de deux atomes forme une liaison plus ou moins polarisée.
- ✗ La polarisation dépend de l'électronégativité de chaque atome. Elle traduit une densité de probabilité électronique plus grande ou plus petite que ce que prévoit le modèle de la liaison covalente.

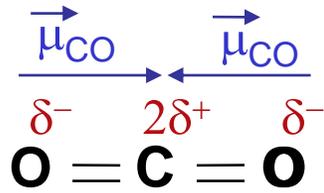


H 2,2																		He
Li 0,98	Be 1,57											B 2,04	C 2,55	N 3,04	O 3,44	F 3,98		Ne
Na 0,93	Mg 1,31											Al 1,61	Si 1,9	P 2,19	S 2,58	Cl 3,16		Ar
K 0,82	Ca 1	Sc 1,36	Ti 1,54	V 1,63	Cr 1,66	Mn 1,55	Fe 1,83	Co 1,88	Ni 1,91	Cu 1,9	Zn 1,65	Ga 1,81	Ge 2,01	As 2,18	Se 2,55	Br 2,96		Kr

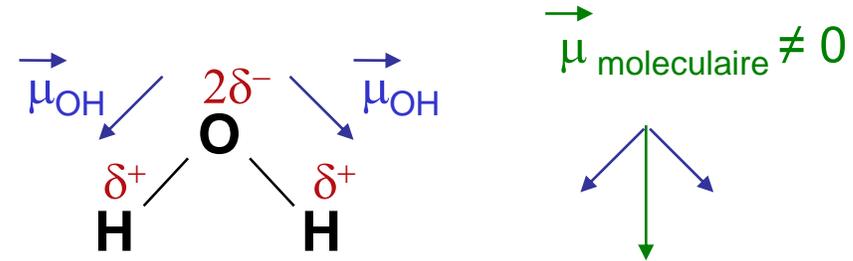


# Prérequis – Les liaisons faibles

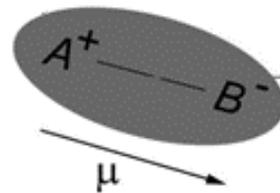
- × Conséquence de la polarisation des liaisons
  - Apparition de moment dipolaire



$$\vec{\mu}_{\text{moléculaire}} = 0$$



- Les molécules peuvent localement être modélisé comme des dipôles.



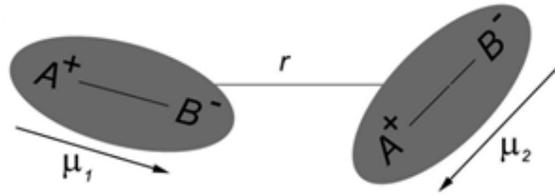
- Il existe alors des **interactions intermoléculaires et intramoléculaire** : **les liaisons faibles**



# Prérequis – Les liaisons faibles

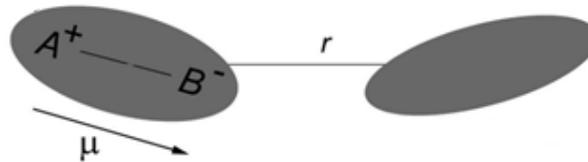
✕ On les nomme de manière générale interactions de **Van der Waals**. Elles se décomposent en trois types : **Keesom**, **Debye** et **London**.

✕ **Keesom** Dipôle – Dipôle :



$$E(r) = \frac{-\mu_1^2 \mu_2^2}{3(4\pi\epsilon_0)^2 kT r^6}$$

✕ **Debye** Dipôle – Dipôle induit :



$$E(r) = \frac{-\mu^2 \alpha}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6}$$

✕ **London** Dipôle Induit – Dipôle induit :

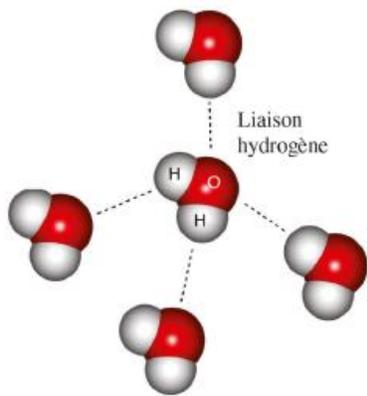


$$E(r) = \frac{-3h\nu\alpha^2}{4(4\pi\epsilon_0)^2 r^6}$$

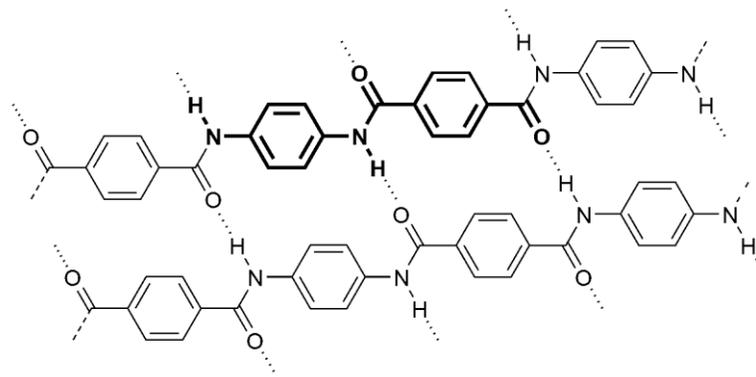


# Prérequis – Les liaisons faibles

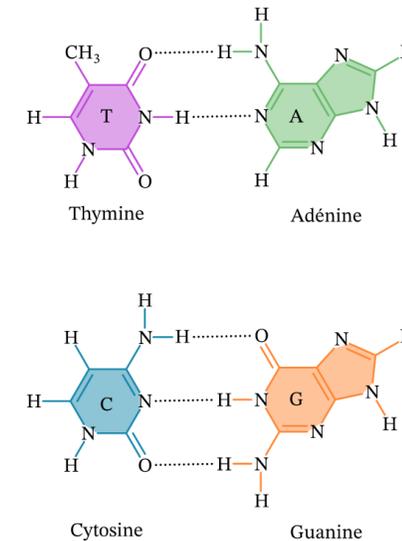
- ✗ Il existe une interaction intermoléculaire **plus forte** que l'interaction de Van der Waals : **la liaison hydrogène**.
- ✗ Elle existe entre un électrophile et un nucléophile.
- ✗ L'électrophile est un hydrogène lié à un hétéroatome électronégatif.
- ✗ Le nucléophile est quasi-systématiquement le doublet non liant de l'oxygène, l'azote ou du fluor.
- ✗ Elle se matérialise par des pointillées.



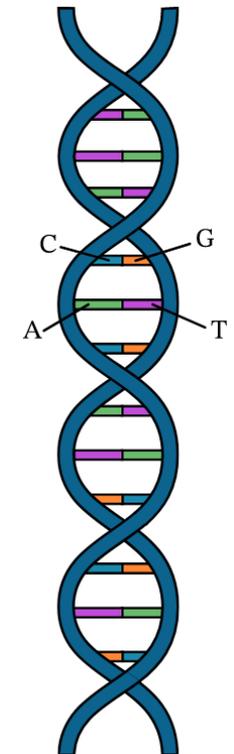
Liaison H de l'eau



Liaison H dans le Kevlar



Liaison H dans l'ADN





# Prérequis – Les liaisons faibles

✕ Ordre de grandeur des énergies de liaison :

Energie de la liaison covalente	Energie de liaison ionique	Energie de la liaison Hydrogène	Energie des liaisons de Keesom	Energie des liaisons de London	Energie des liaisons de Debye
150 à 500 kJ/mol	100 kJ / mol	20 à 50 kJ/mol	10 à 20 kJ/mol	5 à 15 kJ/mol	2 à 10 kJ/mol

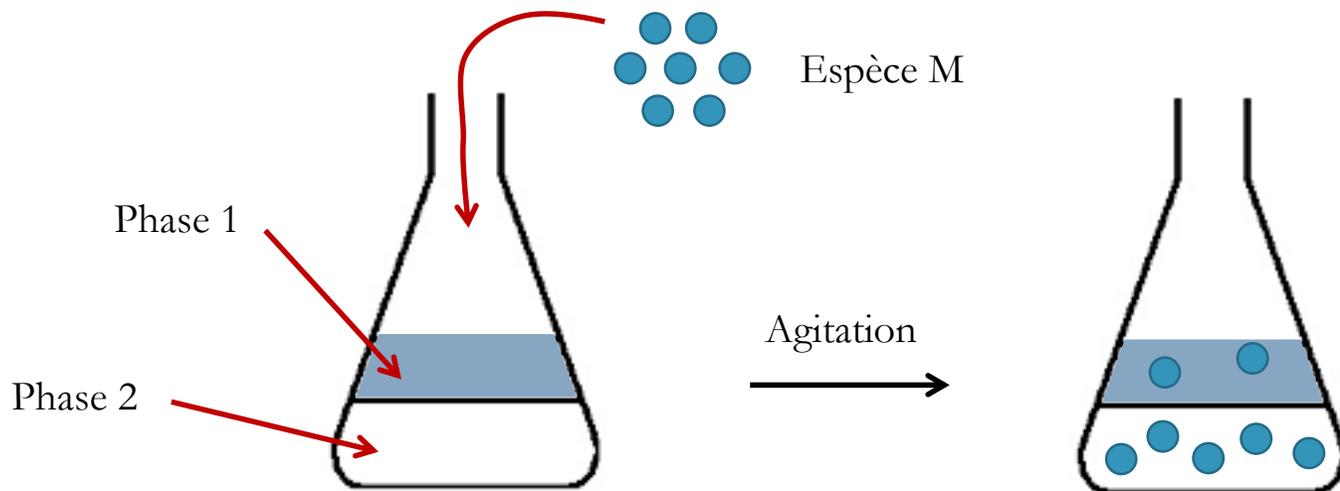
✕ Une molécule qui peut faire des liaisons hydrogène aura des propriétés physico-chimique spécifique :

- **Interaction inter/intra moléculaire**
- **Température d'ébullition** plus grande
- **Polarité locale**
- ...

✕ Conclusion : Les interactions faibles ont un rôle fondamentale dans l'explication de la solubilité des molécules. Il existe une échelle de polarité des solvants. Un autre critère rentrera en compte la propriété **protique ou aprotique** du solvant.



# Prérequis – le coefficient de partage

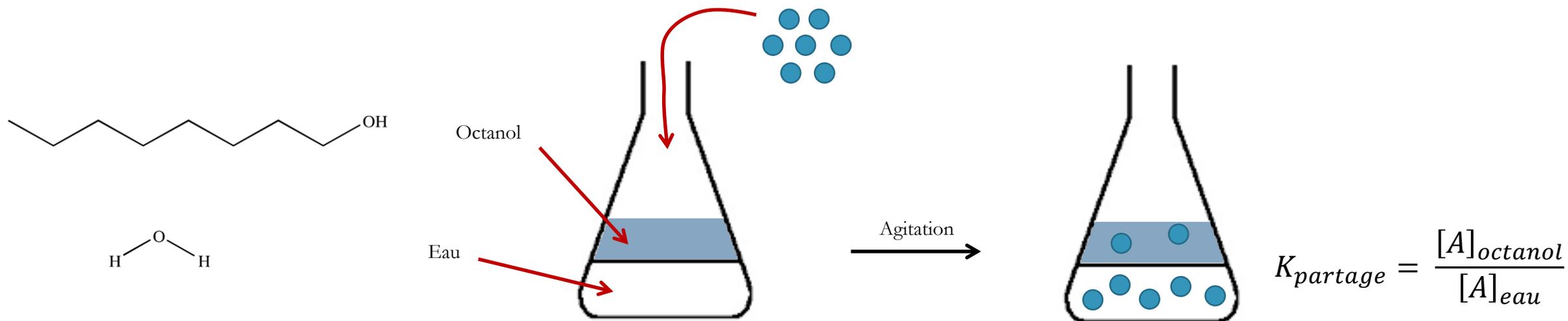


$$K_{partage} = \frac{a_{M Phase 1}}{a_{M Phase 2}}$$

✘ Conclusion : Affinité en fonction de la polarité des espèces. **Qui se ressemble s'assemble.**

# Prérequis – le coefficient de partage

✘ Situation spécifique : le mélange biphasique Octanol/Eau :



$$\log (K_{ow}) = \log \left( \frac{[A]_{octanol}}{[A]_{eau}} \right) = \log (P)$$

- ✘ Si le **log (P) augmente** il y a plus de molécule dans l'octanol la molécule est plus **apolaire**.
- ✘ Si le **log (P) diminue** il y a plus de molécule dans l'eau la molécule est plus **polaire**.

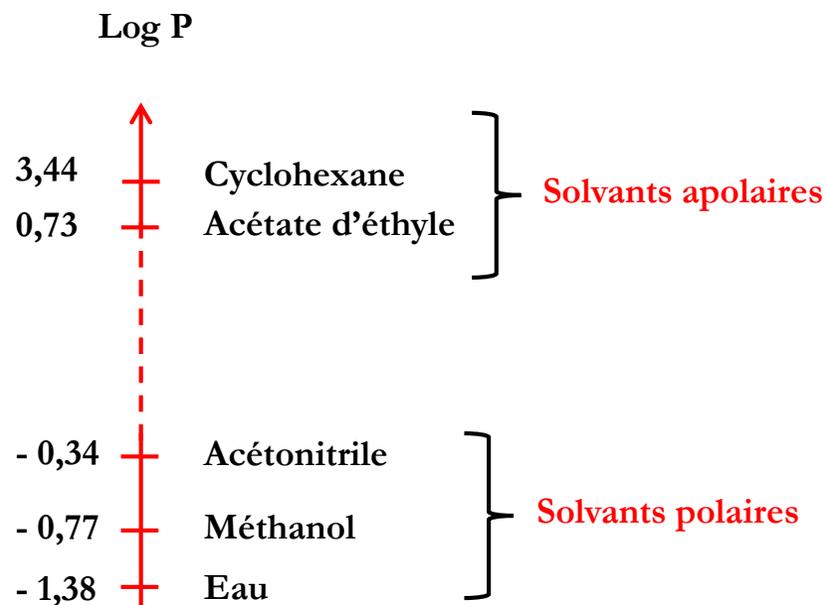




# Prérequis – La polarité des solvants

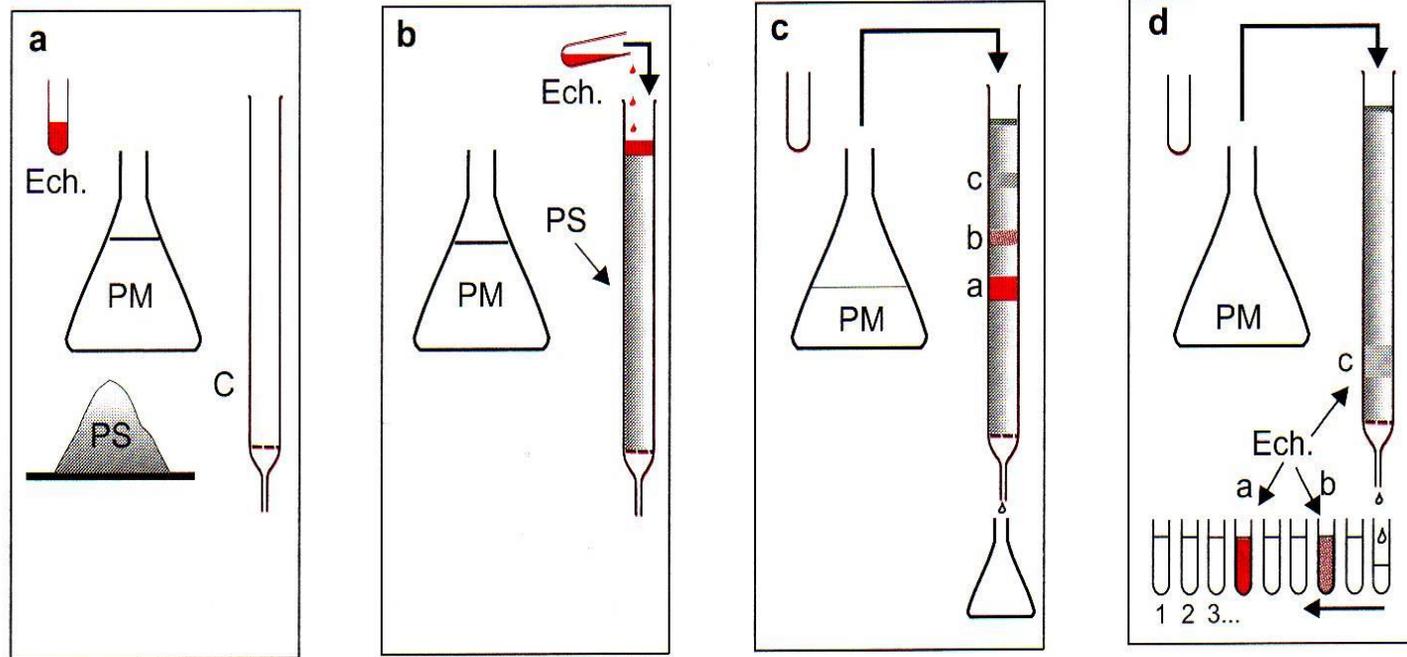
Conséquences :

- ✗ Les solvants polaires et apolaires sont non **miscibles**.
- ✗ **La polarité** des molécules peut être estimée sans calcul de moment dipolaire par leur log de P.
- ✗ **Séparation** en chromatographie.





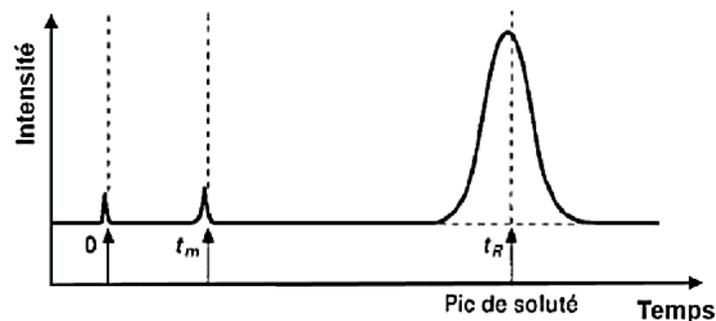
# Principe et grandeurs caractéristiques



- ✗ La chromatographie va suivre les lois des équilibres ( $K_{\text{partage}}$ ) et des statistiques (grand nombre de molécule).
- ✗ Les molécules vont avoir des vitesses de déplacements différentes
- ✗ On définit des plateaux d'équilibres dans la colonne qui se succèdent.

# Principe et grandeurs caractéristiques

- × Quelque soit le type de chromatographie (ionique, gaz, liquide, ...) le résultat est fourni sur un chromatogramme.
  - En ordonnées les grandeurs seront détaillées au fur et à mesure. Elles dépendent du type de chromatographie.
  - En abscisse le temps.



- × Le temps du démarrage de l'analyse :  $t_0$ 
  - Base de temps correspondant au moment de l'injection. Le 0 temporelle. Parfois il existe une confusion avec le temps mort.
- × Le temps mort :  $t_m$ 
  - Temps pour une molécule ne faisant aucune interaction à passer devant le détecteur.
- × Le temps de rétention :  $t_R$ 
  - Temps pour une molécule ayant fait des interactions dans la colonne à passer devant le détecteur.
- × Le temps de rétention réduit :  $t'_R = t_R - t_m$ 
  - Différence entre le temps de rétention de la molécule et le temps mort.



# Principe et grandeurs caractéristiques

✘ La **séparation** se base sur les **vitesse**s différentes des analytes dans la colonne.

✘ La vitesse moyenne de déplacement d'une molécule du soluté :

$$\bar{v} = \frac{\text{Longueur colonne}}{t_R}$$

✘ La vitesse moyenne de déplacement d'une molécule de phase mobile :

$$\bar{u} = \frac{\text{Longueur colonne}}{t_m}$$

✘ La vitesse est directement liée au coefficient de partage :

$$K_{\text{partage}} = \frac{[A]_{\text{stationnaire}}}{[A]_{\text{mobile}}} = \frac{C_s}{C_m}$$

$$\bar{v} = \bar{u} \times \frac{\text{quantité de soluté dans la phase mobile}}{\text{quantité totale de soluté}}$$

$$\bar{v} = \bar{u} \times \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S}$$

$$\bar{v} = \bar{u} \times \frac{1}{1 + K_{\text{partage}} \frac{V_S}{V_M}}$$



# Principe et grandeurs caractéristiques

- ✘ On définit alors le **facteur de capacité ou coefficient de rétention**  $k'_A$  est une mesure de la distribution du soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire :

$$k'_A = K_{partage} \frac{V_S}{V_M} \qquad k'_A = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = \frac{m_S}{m_M}$$

- ✘ Il vient alors en utilisant la définition des vitesses :

$$\bar{v} = \bar{u} \times \frac{1}{1 + K_{partage} \frac{V_S}{V_M}}$$

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_m} \times \frac{1}{1 + k'_A}$$

$$k'_A = \frac{t_R - t_m}{t_m} = \frac{t'_R}{t_m}$$



# Principe et grandeurs caractéristiques

- ✘ Le **facteur de capacité  $k'_A$**  est donc un paramètre expérimental permettant de comparer la vitesse de progression des solutés dans la colonne.

$$k'_A = \frac{t'_R}{t_m}$$

- ✘ Les valeurs généralement acceptées sont comprises entre  $2 < k < 10$ .
- ✘ Si  $k > 30$  il sera probablement préconisé de modifier les conditions d'analyse pour les améliorer.
- ✘ Si  $k < 1$  les problèmes seront plus délicats à traiter on dit que la colonne n'est pas assez rétentive.

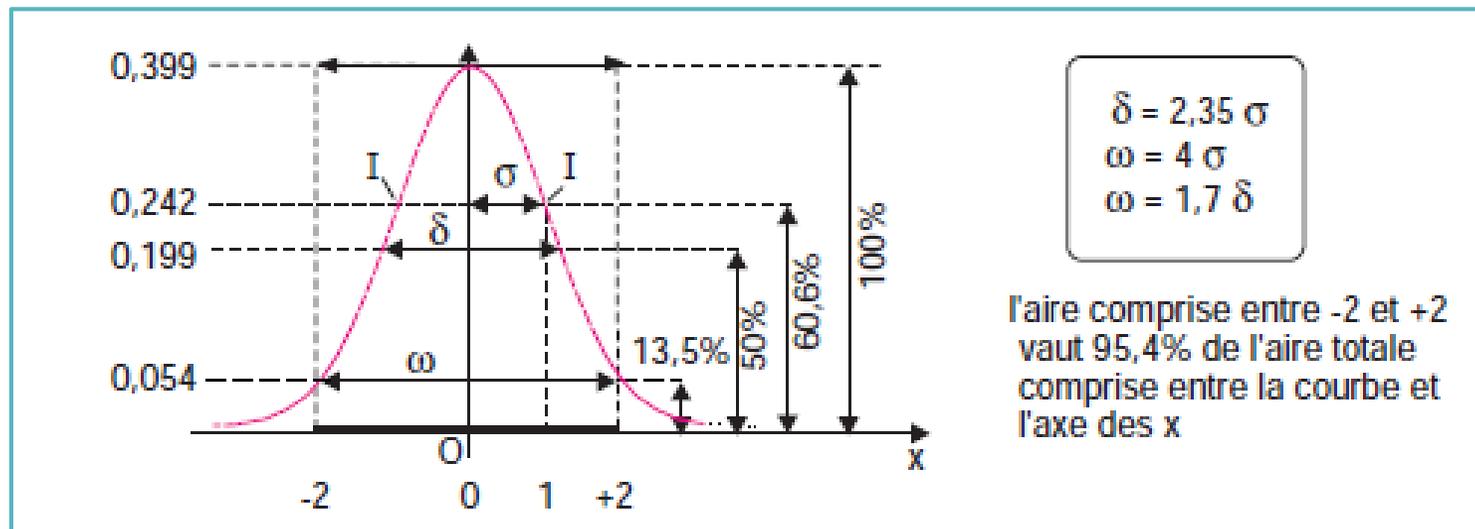
- ✘ Pour **comparer** la vitesse de progression entre deux composés A et B on utilise **le facteur de sélectivité  $\alpha$**  :

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} > 1$$

- ✘ B est toujours le composé le plus retenu dans la colonne. De fait  $\alpha > 1$
- ✘ Le facteur de sélectivité permet de déterminer dans quelle mesure une colonne peut séparer deux molécules.

# Principe et grandeurs caractéristiques

✕ Etudions de plus près le **modèle du pic idéal** de chromatographie :



✕ Le pic idéal suit la loi statistique de distribution normale.

✕ Il est caractérisé par

- Sa largeur à 13,5% de sa hauteur :  $\omega$
- Sa largeur à 50 % de sa hauteur :  $\delta$
- Sa symétrie par rapport à son sommet
- Sa surface



# Principe et grandeurs caractéristiques

- ✘ La théorie des plateaux suppose une multitude de petits états d'équilibres thermodynamiques successifs dans la colonne. La **hauteur d'un plateau** ( $H$ ) est défini comme la **variance par unité de temps** passé dans la colonne. Et le **nombre de plateau** est défini en fonction de la longueur de la colonne :

$$H = \frac{\sigma^2}{t_r} \qquad N = \frac{L}{H}$$

- ✘ Plus le temps de rétention d'un composé est long dans la colonne plus la largeur du pic va augmenter ce qui se traduit par l'augmentation de la variance. Il est possible d'exprimer le nombre de plateau en fonction des caractéristiques du pic :

$$\sigma = \frac{\omega}{4} \quad \text{d'où} \quad H = \frac{\omega^2}{16L} \cdot \frac{1}{t_r} \quad \text{enfin} \quad N = \frac{16 t_r L}{\omega^2}$$

- ✘ Le temps de rétention a une dépendance direct avec la longueur de la colonne donc il est possible de la normaliser : Parfois l'expression utilisant la largeur à mi-hauteur du pic est préférée.

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{\omega} \right)^2 \qquad N = 5,545 \left( \frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

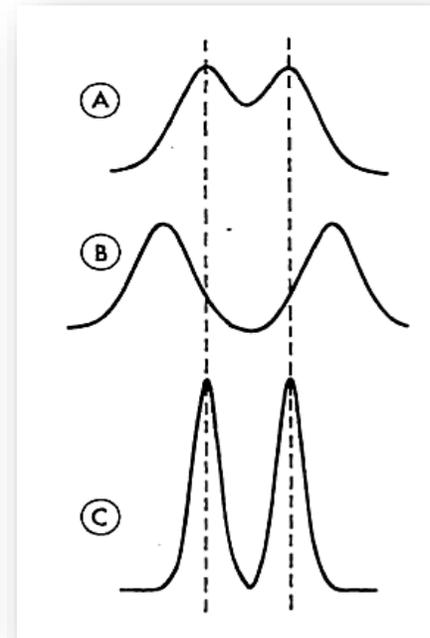
- ✘ Plus le nombre de plateaux théoriques est grand, plus la largeur des pics sera faible. Plus la colonne est efficace.

# Principe et grandeurs caractéristiques

- ✗ **La théorie des plateaux est un modèle.** Comme tout modèle il ne reflète pas parfaitement la réalité.
- ✗ L'efficacité dans la colonne dépend donc de divers paramètres :
  - Vitesse de la phase mobile
  - Facteur de rétention
  - Longueur de la colonne
  - Etc.

Enfin la séparation entre 2 pics dépend de 2 paramètres :

- ✗ L'aspect thermodynamique  $K_{\text{partage}} = \text{temps de rétention}$
- ✗ L'aspect cinétique des échanges de phase = largeur des pics





# Principe et grandeurs caractéristiques

✕ On définit alors pour estimer la qualité de la séparation le **facteur de résolution**  $R_s$

For 2 close peaks  $w_1 \approx w_2$

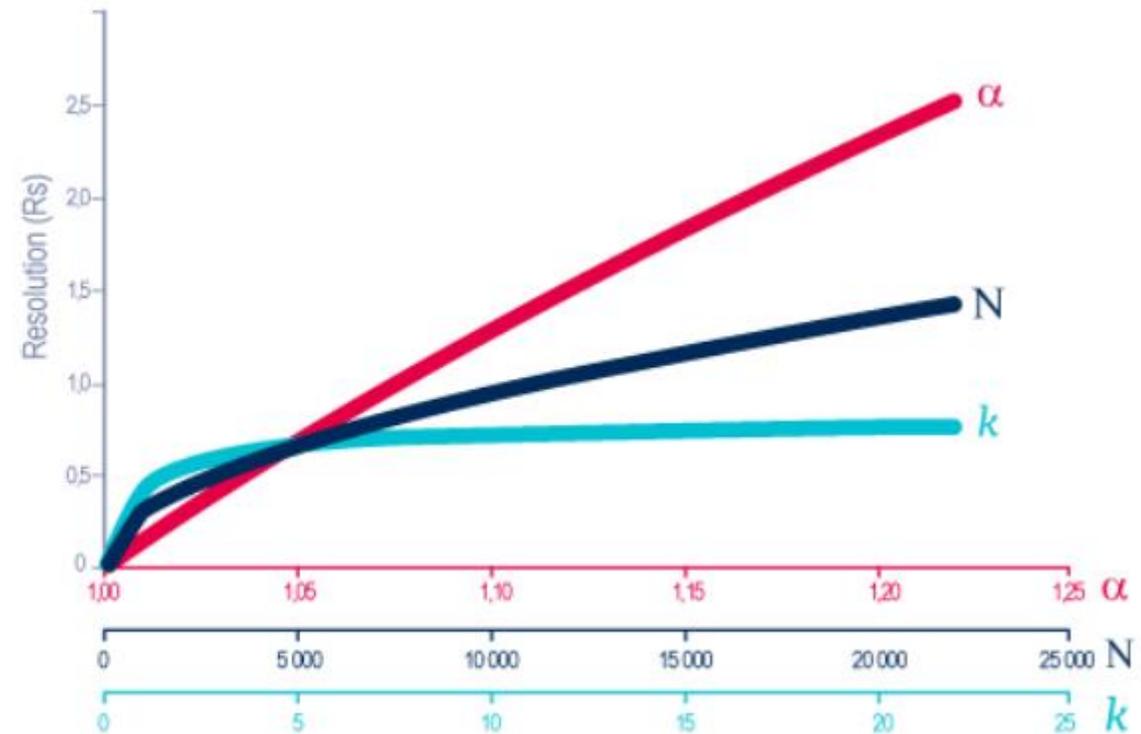
$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2}{1 + k_2} \right)$$

Increasing efficiency by using a smaller particle size

Enhance selectivity by modifying elution conditions and adapting stationary phase

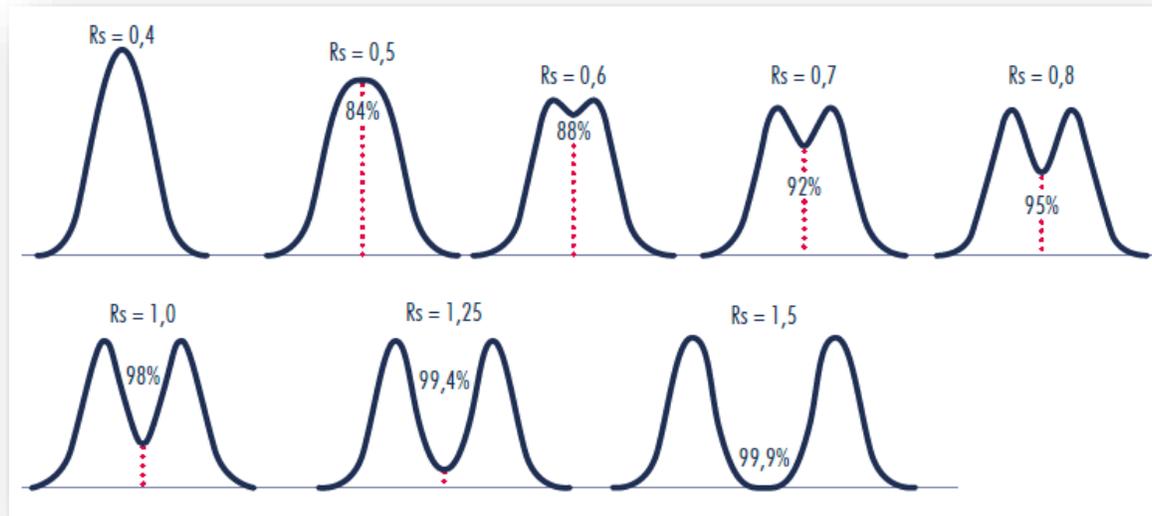
Keep this value between 2 and 10 by adjusting the retention time

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{\omega_A + \omega_B}$$



# Principe et grandeurs caractéristiques

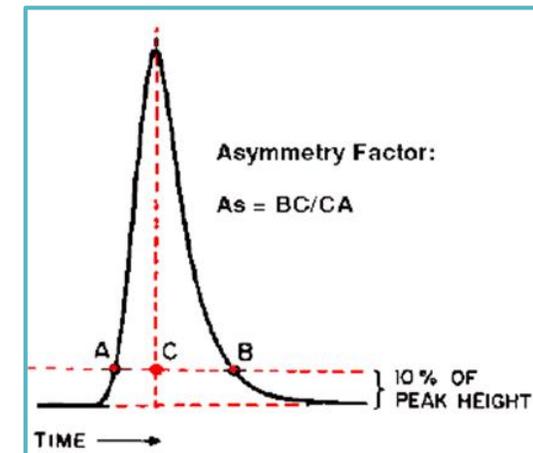
✕ On définit alors pour estimer la qualité de la séparation le **facteur de résolution**  $R_s$



$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{\omega_A + \omega_B} = \frac{1,18[(t_R)_B - (t_R)_A]}{\delta_A + \delta_B}$$

✕ Le pic parfait n'existe pas ! On définit alors un facteur d'asymétrie :

- Si AC inférieur à CB on dit que c'est un « tailing pic »
- Si AC supérieur à CB on dit que c'est un « fronting pic »





# Résumé formulaire

$$K_{\text{partage}} = \frac{[A]_{\text{stationnaire}}}{[A]_{\text{mobile}}} = \frac{C_s}{C_m}$$

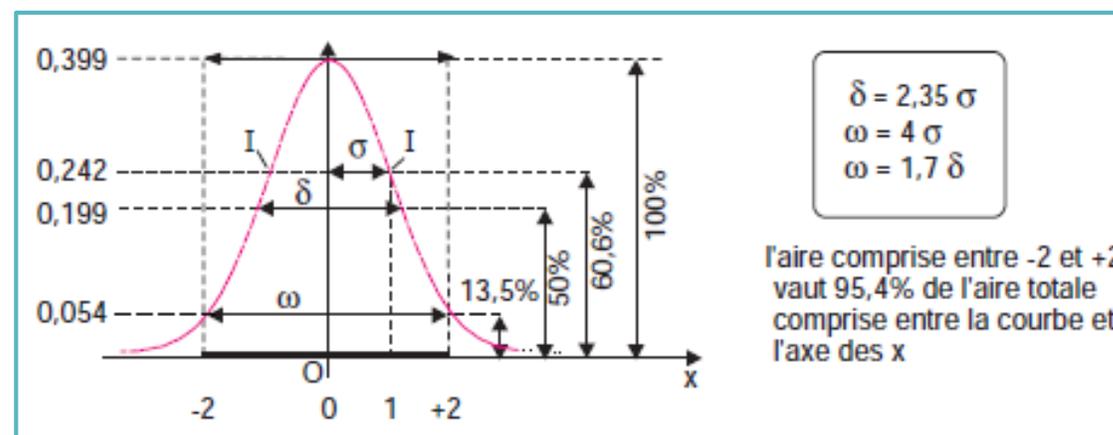
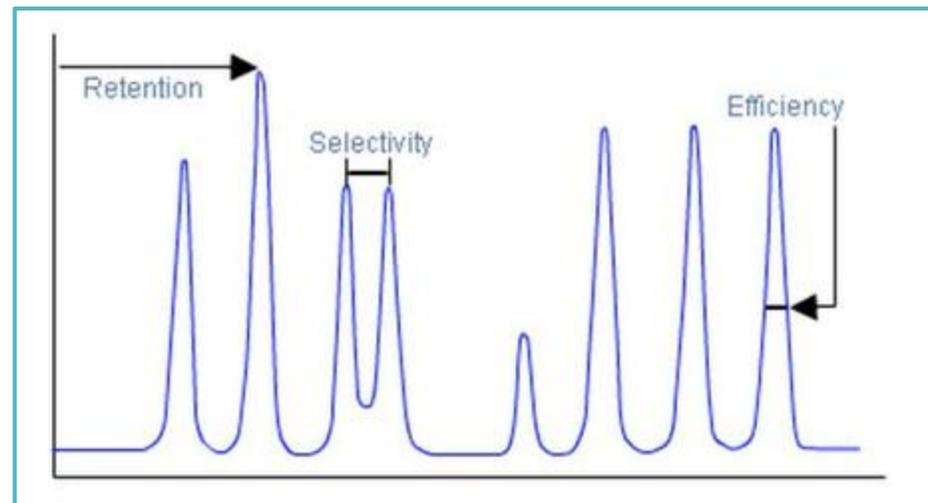
$$k'_A = \frac{t_R - t_m}{t_m} = \frac{t'_R}{t_m}$$

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}}$$

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

$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{\omega_A + \omega_B} = \frac{1,18[(t_R)_B - (t_R)_A]}{\delta_A + \delta_B}$$





# TD 1 – Illustration des grandeurs caractéristiques