

<http://www2.univ-reunion.fr/~briere>

COURS DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

**Dr Thierry BRIERE - Professeur agrégé – Département de Chimie
Université de La Réunion**

MASTER “VALORISATION DES RESSOURCES NATURELLES” et ESIDAI 3

Ce document est mis à disposition sous un contrat CREATIVE COMMONS



Vous pouvez l'utiliser à des fins pédagogiques et NON COMMERCIALES sous certaines réserves dont la citation obligatoire du nom de son auteur et l'adresse <http://www2.univ-reunion.fr/~briere> de son site d'origine pour que vos étudiants puissent y accéder. Merci par avance de respecter ces consignes. Voir contrat (lien en page d'accueil) ...

J'ai moi même utilisé des sources “internet” vous en trouverez la liste non exhaustive en liens externes. Certaines illustrations proviennent de sources diverses je me suis efforcé de les citer mais il peut y avoir quelques oublis, que les auteurs originaux veuillent bien m'en excuser...

Cours N° 2

THEORIE DE LA CHROMATOGRAPHIE

Dans ce chapitre nous allons établir une théorie simplifiée de la chromatographie
Nous établirons toutes les relations importantes permettant de décrire les effets des principaux paramètres physiques sur le chromatogramme.

Ces paramètres physiques sont :

- la longueur et le diamètre interne de la colonne
- le diamètre des particules de phase stationnaire
- la porosité de la colonne
- le débit de la phase mobile

Ils affectent l'efficacité de la colonne.

Nous envisagerons ultérieurement l'effet des paramètres chimiques et celui de la température.

Le but est d'être capable à la fin de l'étude de ce chapitre de créer un simulateur de chromatogrammes qui nous permettra de visualiser facilement l'effet de ces divers paramètres.

Au cours de notre progression diverses activités illustrant les notions présentées vous seront proposées. Il suffira de cliquer sur les hyperliens pour pouvoir y accéder...

Rappels mathématiques : La courbe de Gauss

$$y = 1 / \sigma \exp \left[- (x - m)^2 / (2 \sigma^2) \right]$$

m : valeur moyenne = temps de rétention

σ : écart type

σ^2 : Variance

Propriétés remarquables à retenir :

Deux points d'inflexion à **$x = m - \sigma$** et **$x = m + \sigma$**

$G(m) = 1 / \sigma = h$ (hauteur du pic)

$G(m - \sigma) = G(m + \sigma) = 1/\sigma \exp(-1/2) = 0,6065 / \sigma = 60,5 \% \text{ de } h$

$G(m - 2\sigma) = G(m + 2\sigma) = 1/\sigma \exp(-2) = 0,1353 / \sigma = 13,5 \% \text{ de } h$

$G(m - 1,1774 \sigma) = G(m + 1,1774 \sigma) = 0,5000 / \sigma = 50 \% \text{ de } h$

Intégration = surface du pic

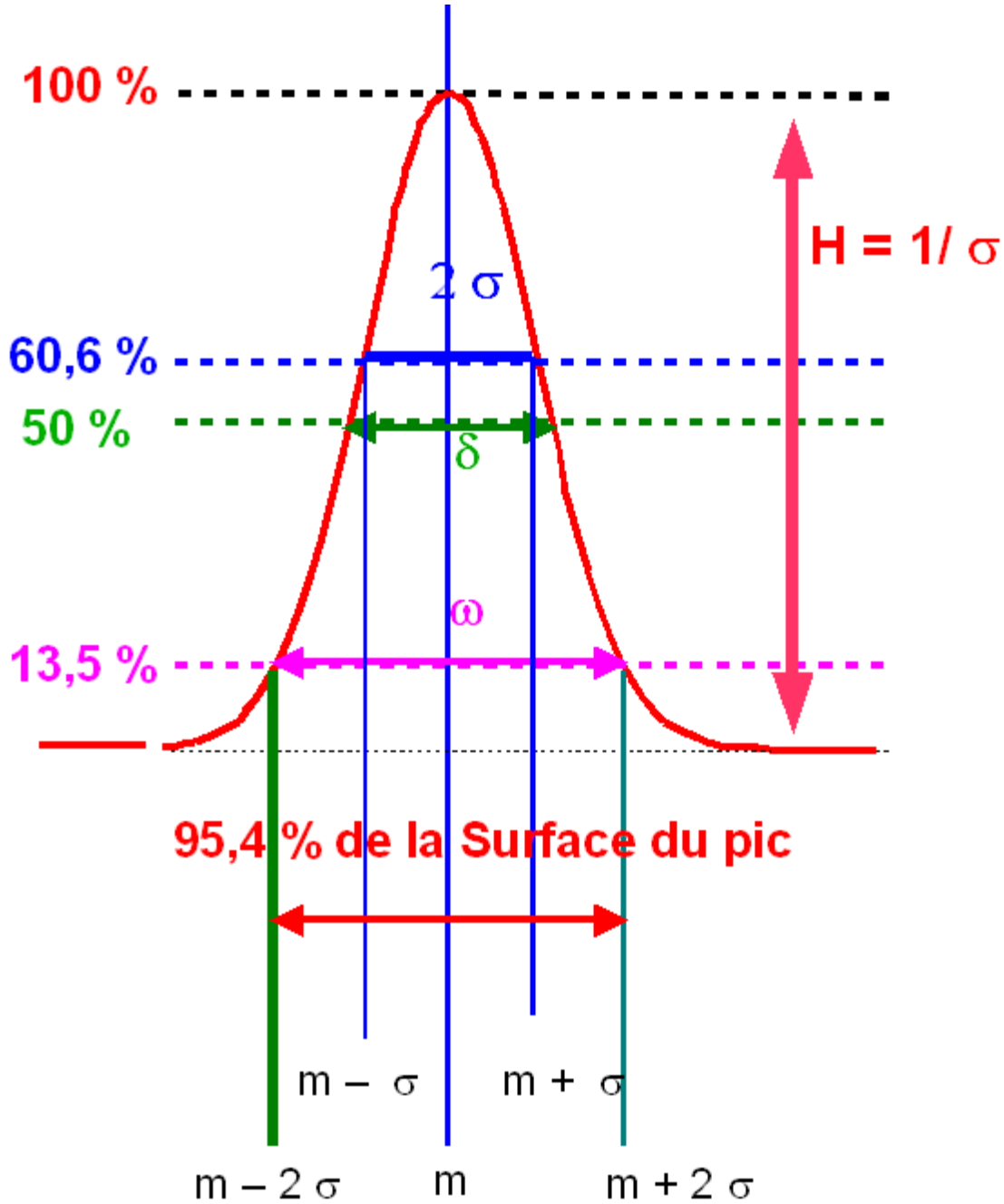
(de $-\infty$ à $+\infty$) $\int G(x) dx = 2,507 = S$ (surface du pic)

(de $m - 2\sigma$ à $m + 2\sigma$) $\int G(x) dx = 2,393 = 95,4 \% \text{ de } S$

Activité N°1 : Courbe de Gauss sur EXCEL

Activité N°2 : Utilisation de calculatrice graphique étude de la courbe de Gauss

Activité N°3 : Courbe de Gauss appliquée à la chromatographie pour un soluté unique



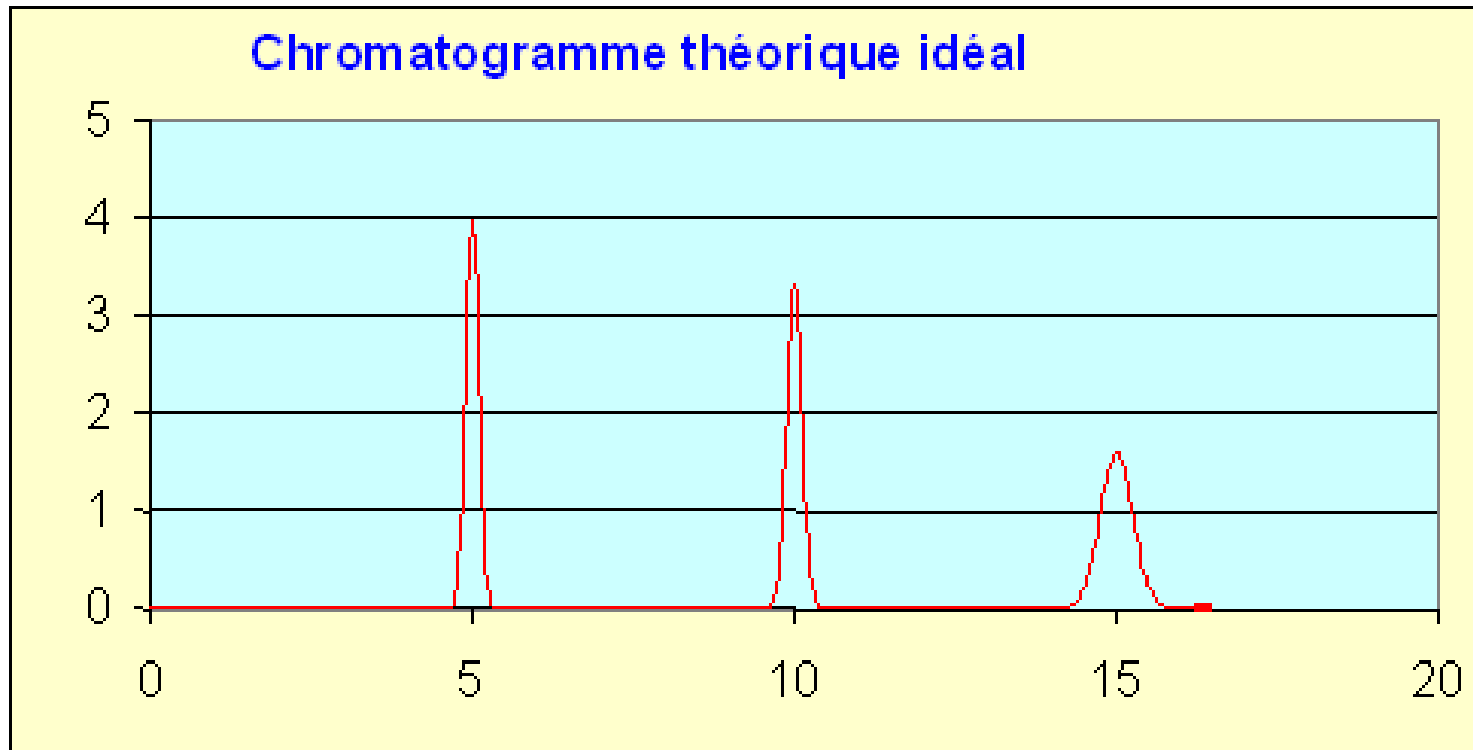
Résumé des points fondamentaux

$$\delta = 2,35 \sigma$$

$$\omega = 4 \sigma$$

Efficacité théorique d'une colonne :

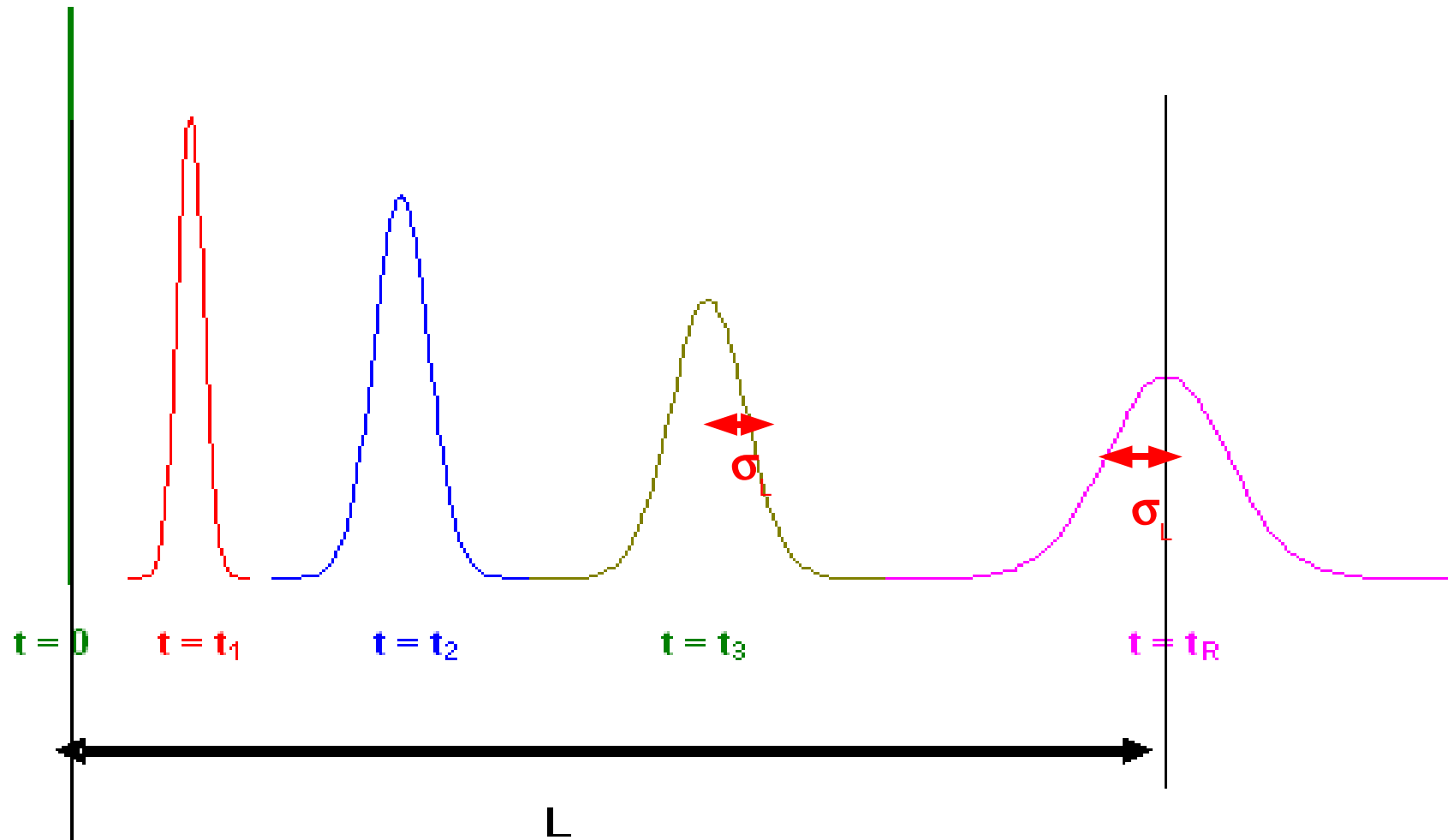
Lors de sa progression dans la colonne, le soluté subit une diffusion longitudinale. Les pics sont donc de plus en plus larges au fur et à mesure que les temps d'élution augmentent. Simultanément, et "toutes choses égales par ailleurs" la hauteur des pics proportionnelle à $1/\sigma$ diminue. L'allure d'un chromatogramme idéal est alors la suivante :



Remarque : Nous supposons ici des composés possédant des coefficients de réponse identiques et à des concentrations égales.

Activité N°4 : Simulation d'un chromatogramme à trois solutés avec Excel

Evolution du pic chromatographique (gradient de concentration) d'un soluté au cours de la traversée de la colonne



A l'intérieur de la colonne on observe une distribution quasi gaussienne du soluté. Au cours de la migration du composé, la diffusion longitudinale provoque un élargissement du pic, concomitamment, sa hauteur diminue.

L'écart type du pic σ_L augmente lors de la traversée de la colonne.

Remarque : Ces profils théoriques ne sont pas accessibles expérimentalement. Seul le chromatogramme final est observable pratiquement.

Efficacité d'une colonne :

Pour exprimer l'efficacité d'une colonne chromatographique on définit son nombre de plateaux théorique N.

On définit également la hauteur équivalente à un plateau théorique (h.e.p.t) h

Soit L la longueur de la colonne et N son nombre de plateaux.

$$h = \text{h.e.p.t} = L / N$$

Plus N sera grand (ou h petit) et plus la colonne sera efficace.

Dans la pratique, le paramètre le plus important est l'écart type σ de chaque pic.

Il est évident que plus les pics seront fins, plus il sera facile de les séparer.

N est donc inversement relié à σ .

On peut imaginer, à la limite que l'écart type d'un pic devienne égal à la longueur de la colonne entière. Le composé occuperait alors toute la colonne à lui seul. Il serait alors impossible de séparer deux composés sur une telle colonne dont l'efficacité serait minimale. Inversement, plus les pics sont étroits et plus la colonne sera efficace.

On conçoit également que plus les temps de rétention seront importants et plus on aura de chance de pouvoir séparer les composés.

N est donc directement relié à t_R .

La colonne la moins efficace aura par définition un seul plateau théorique et une colonne très efficace possédera au contraire un très grand nombre de plateaux théoriques.

Soit L la longueur de la colonne et N son nombre de plateaux théoriques, la longueur équivalente à un plateau théorique (H.E.P.T) est $h = L / N$.
Pour une colonne de 1 plateau théorique on pose :

$$L = h = \sigma_L$$

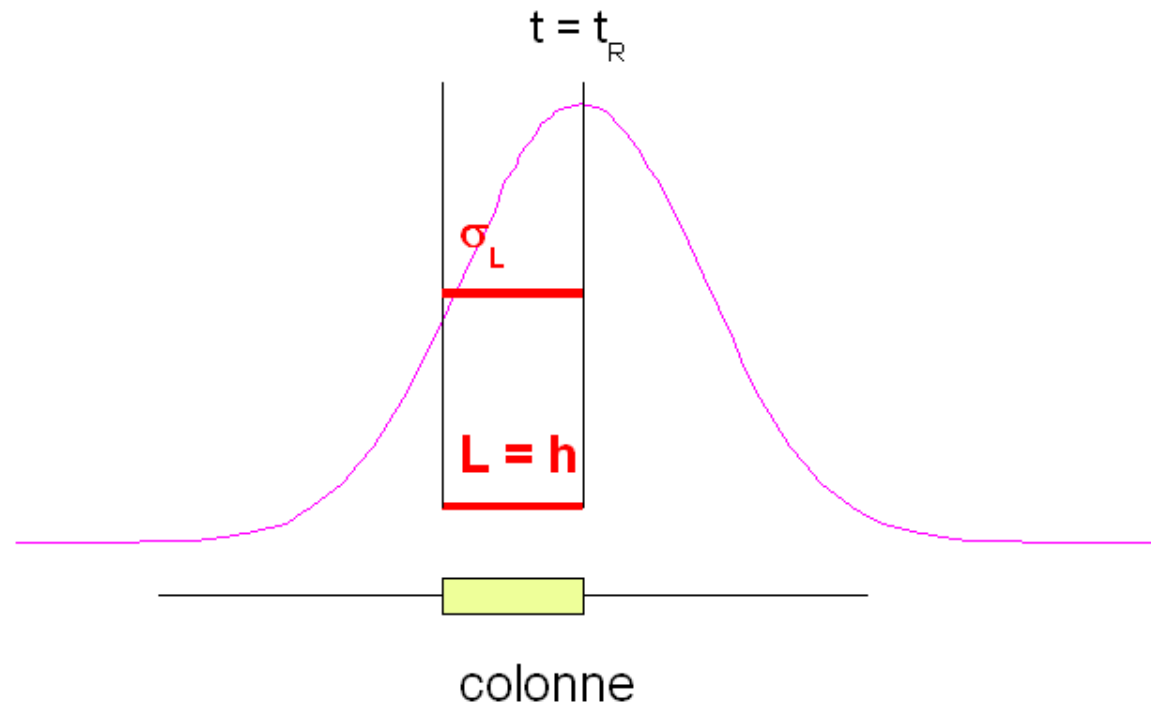
$$\text{Soit } \sigma_L^2 = L * h$$

$$\sigma_L^2 = L * L / N = L^2 / N$$

Soit

$$N = L^2 / \sigma_L^2$$

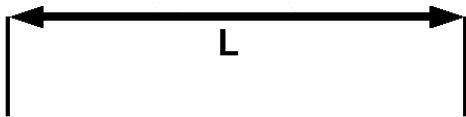
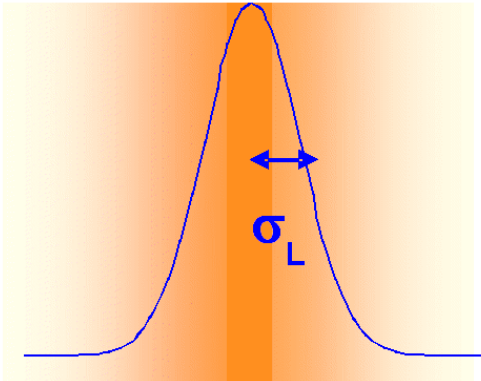
Le composé occuperait à lui seul un supérieur à celui de la colonne entière
séparation impossible.



Profil hypothétique de la concentration pour $t = t_R$ dans une colonne de 1 seul plateau théorique

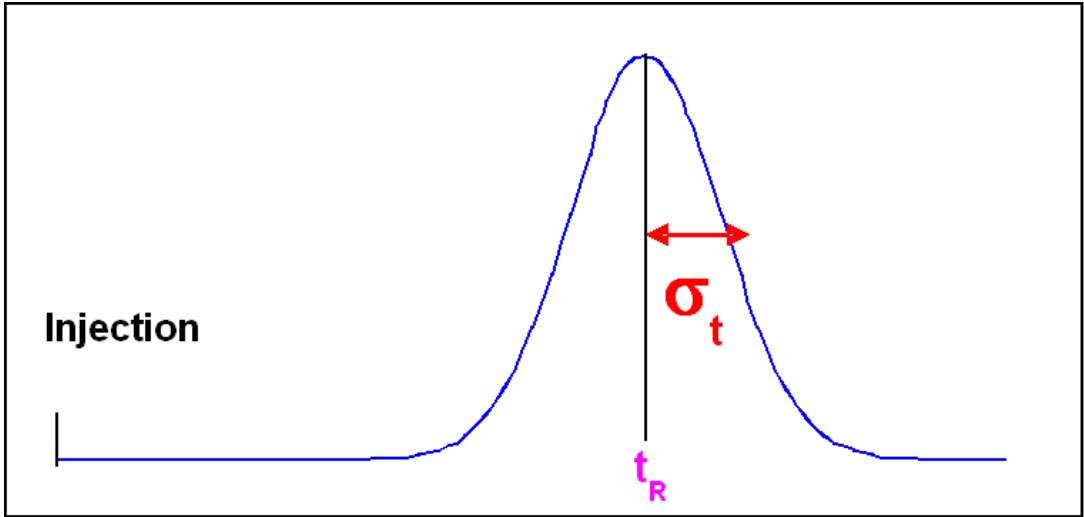
Le temps de rétention d'un composé est par définition le temps pour lequel sa concentration est maximale à la sortie de la colonne, c'est à dire dans le détecteur.

Gradient de concentration d'un composé à l'intérieur de la colonne à un instant t
Diffusion longitudinale



Entrée de la colonne
Injection

Sortie de la colonne
Détection



Chromatogramme :
Enregistrement en fonction du temps du signal du détecteur.

Inaccessible expérimentalement

Seul accessible expérimentalement

A cet instant, l'écart type de la courbe de Gauss est σ_L pour le profil de concentration et $\sigma_t = \sigma$ pour le chromatogramme en fonction du temps.

Pour parcourir la distance L , le composé a mis le temps t_R .
C'est le déplacement de l'éluant qui a provoqué ce déplacement du composé.
La vitesse de ce "déplacement" est proportionnelle au débit de l'éluant que nous allons supposer constant.

Il y a donc proportionnalité entre la distance parcourue et le temps.

On a donc :

$$L / \sigma_L = t_R / \sigma$$

$$\text{Soit : } N = L^2 / \sigma_L^2 = t_R^2 / \sigma^2$$

On pourra donc déterminer le nombre de plateaux théorique de la colonne à partir du chromatogramme en fonction du temps.

Il faudra pour cela déterminer t_R et σ .

Activité N°5 Efficacité effet sur le chromatogramme pour un soluté unique.

Activité N° 6 : Efficacité effet sur le chromatogramme pour deux solutés.

Activité N°7 : Détermination pratique de N à partir d'un chromatogramme

Efficacité réelle d'une colonne :

L'efficacité théorique d'une colonne est une grandeur relative, on préfère utiliser une grandeur plus réaliste pour pouvoir comparer des colonnes de conceptions différentes ; On définit alors le nombre effectif de plateaux N_{eff} .

t'_R est le temps de rétention réduit du composé.

$$t'_R = t_R - t_m$$

t_m est le temps mort de la colonne il correspond au temps que met le solvant ou un soluté non retenu pour traverser la colonne.

L'utilisation de l'efficacité réelle permet ainsi de comparer entre elles des colonnes de géométrie très différentes. En effet le temps mis par le solvant pour traverser la colonne dépend étroitement de la géométrie de celle-ci et en particulier de son volume interstitiel.

$$N_{\text{eff}} = t'^2_R / \sigma^2$$

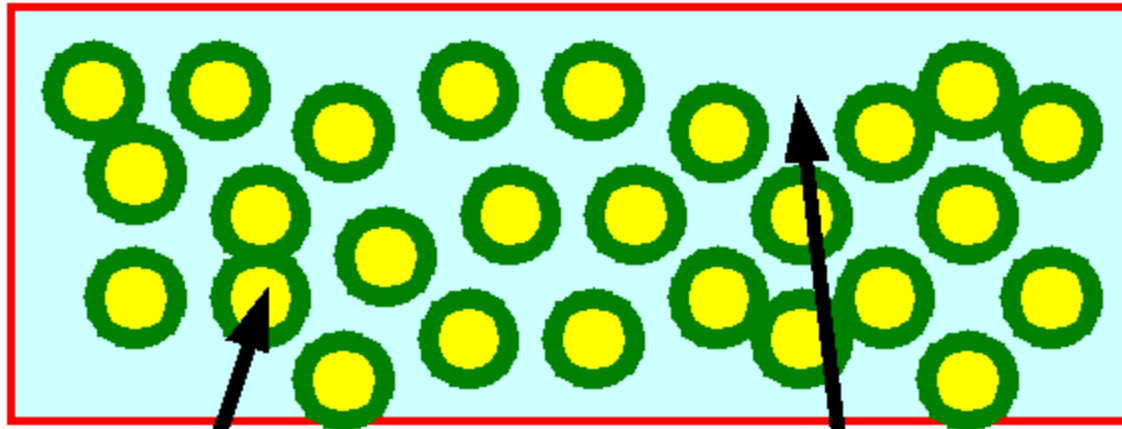
$$N_{\text{eff}} = 16 t'^2_R / \omega^2$$

$$N_{\text{eff}} = 5,54 t'^2_R / \delta^2$$

Activité N° 8 : Efficacité et efficacité réelle d'une colonne

Grandeurs de rétention

Colonne chromatographique
Volume interne : V_{int}



Grains de phase stationnaire
Volume occupé : V_s

Volume interstitiel ou volume mort
occupé par la phase mobile
Volume V_M

Grandeurs de rétention

Volume mort : V_m

Il correspond au volume occupé par la phase mobile dans la colonne, c'est à dire au volume interstitiel de celle-ci.

Le temps mort ou le volume mort sont déterminables sur le chromatogramme à condition que l'un des composés détectés soit non retenu (ou le moins possible) par la phase stationnaire.

Si on suppose un débit D constant :

$$V_M = t_M D$$

avec t_M = temps mort

Le temps mort t_M est le temps mis par le solvant ou un composé non retenu pour traverser la colonne.

Porosité de la colonne ε :

La porosité d'une colonne correspond au rapport entre son volume mort V_M et son volume interne V_{Int}

$$\varepsilon = V_M / V_{Int}$$

Volume interne V_{Int} :

Les colonnes sont généralement cylindriques leur volume interne se calcule donc à partir de leurs caractéristiques géométriques : diamètre interne ϕ_{int} et longueur L .

$$V_{Int} = \frac{1}{4} \pi \phi_{int}^2 * L$$

Volume de la phase stationnaire : V_S

Ce volume n'est pas accessible sur le chromatogramme mais on peut le déduire si on connaît le volume interne V_{Int} de la colonne :

$$V_S = V_{Int} - V_M$$

Volume de rétention : V_R

Le volume de rétention de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne.

Remarque : on considère que l'injecteur et le détecteur qui ont leur propre volume mort sont compris dans la colonne.
Dans ces conditions, le volume de rétention correspond au volume de phase mobile écoulé entre le moment de l'injection et celui de la détection du composé.

A débit constant :

$$V_R = t_R * D$$

Temps mort et volume mort :

Le temps mort est calculable si on connaît le débit du solvant, la géométrie et la porosité de la colonne.

Soit la vitesse moyenne d'écoulement du solvant u .

Le temps que met le solvant pour traverser la colonne est par définition le temps mort de celle-ci ; le solvant parcourt donc la distance L pendant le temps t_M .

Soit $u = L / t_M$

$$t_M = L / u$$

Le débit correspond au volume de solvant circulant par unité de temps. Pendant le temps t_M le volume de solvant traversant la colonne est V_M .

$$D = V_M / t_M$$

Relation entre u et V_M :

$$D = (V_M / L) * u \qquad u = D * L / V_M$$

Calcul de V_M et t_M :

On connaît le débit et les caractéristiques de la colonne.

$$\varepsilon = V_M / V_{\text{Int}}$$

$$V_M = \varepsilon V_{\text{Int}}$$

$$V_{\text{Int}} = \frac{1}{4} \pi d_{\text{int}}^2 L$$

$$V_M = \frac{1}{4} \varepsilon \pi d_{\text{int}}^2 L$$

$$D = (V_M / L) * u$$

$$u = D * L / V_M$$

$$t_M = L / u = V_M / D$$

$$t_M = V_M / D$$

$$t_M = \frac{1}{4} \varepsilon \pi d_{\text{int}}^2 L / D$$

Facteur de rétention : k

(Ancienne appellation : facteur de capacité k', encore rencontrée)

En chromatographie, le soluté se partage entre la phase stationnaire et la phase mobile. On parle d'équilibre de partage ou de partition.

$S(\text{phase mobile}) = S(\text{phase stationnaire})$

Cet équilibre est régi par une constante de partage (ou de partition) K

$$K = C_S / C_M$$

C_S et C_M sont les concentrations du soluté S dans la phase mobile et dans la phase stationnaire.

On définit le facteur de rétention k par le rapport des quantités (ou des masses) de soluté entre phase mobile et phase stationnaire à l'équilibre :

$$k = m_S / m_M = n_S / n_M = C_S V_S / C_M V_M = K V_S / V_M$$

$$\mathbf{k = K V_S / V_M}$$

Pour une colonne donnée V_S et V_M sont des constantes et le facteur de rétention ne dépend donc que de la valeur de la constante de l'équilibre de partage K .

Il ne dépend en particulier ni du débit, ni de la longueur de la colonne.

$$k = K V_S / V_M$$

$$V_S = V_{Int} - V_M$$

$$k = K (V_{Int} - V_M) / V_M = K [(V_{Int} / V_M) - 1]$$

$$k = K [(V_{Int} / V_M) - 1] = K [1/\varepsilon - 1]$$

Comme V_{Int} et V_M varient de la même façon quand la longueur de la colonne change, ou quand le débit est modifié k ne dépend pas de ces deux facteurs.

En revanche, k dépend des autres conditions opératoires et en particulier de la composition de l'éluant et/ou de celle de la phase stationnaire qui modifient fortement la valeur de K si elles varient. De même la température fait varier K et k .

Le facteur de rétention k est le paramètre le plus important pour décrire le comportement d'une colonne chromatographique.

Détermination expérimentale du facteur de rétention k :

Nous admettrons que le rapport entre le volume de rétention V_R et le volume mort V_M est le même que celui qui existe entre le nombre de mole total de composé et le nombre de mole dissous dans la phase mobile (c'est à dire dans le volume mort) :

$$V_R / V_M = n_{\text{tot}} / n_M$$

En effet, la concentration dans la phase mobile peut être définie par le rapport entre le nombre de mole dissous dans la phase mobile et son volume.

$$C_m = n_M / V_M$$

Si on admet qu'au temps de rétention qui correspond à la concentration maximale du composé en sortie de **détecteur** tout le soluté est en phase mobile.

Cela revient à considérer que tout le soluté est sorti de la colonne et donc qu'il n'en reste plus en phase stationnaire.

On pose donc que $n_M = n_{\text{tot}}$ et que $n_S = 0$

Le volume de phase stationnaire écoulé est alors le volume de rétention du composé.

On a donc également $C_m = n_{\text{tot}} / V_R$

$$n_{\text{tot}} / V_R = n_M / V_M$$

$$n_{\text{tot}} V_M = n_M V_R$$

$$V_R / V_M = n_{\text{tot}} / n_M$$

$$V_R / V_M = n_{\text{tot}} / n_M.$$

$$V_R / V_M = (n_M + n_S) / n_M = 1 + (n_S / n_M) = 1 + k$$

$$V_R / V_M = 1 + k$$

$$k = (V_R / V_M) - 1$$

$$k = (V_R / V_M) - (V_M / V_M) = (V_R - V_M) / V_M$$

$$k = (V_R - V_M) / V_M$$

Soit si on parle en terme de temps au lieu des volumes
(par l'intermédiaire du débit supposé constant):

$$k = (t_R - t_M) / t_M = t_R' / t_M$$

$$k = t_R' / t_M$$

On pourra donc déterminer le facteur de rétention d'un composé quelconque si l'on connaît son temps de rétention et le temps mort de la colonne

Relation entre le volume d'élution V_R , Volume mort V_M et constante d'équilibre de partage (ou de partition) K :

$$V_R / V_M = 1 + k$$

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

$$k = K V_S / V_M$$

$$V_R = V_M (1 + K V_S / V_M)$$

$$V_R = V_M + K V_S$$

Activité N°9 : Détermination pratique des grandeurs de rétention à partir d'un chromatogramme

Facteur de séparation (ou de sélectivité) entre deux pics adjacents α :

Ce facteur de séparation α est parfois appelé facteur de sélectivité il mesure l'efficacité de la séparation entre deux composés adjacents sur le chromatogramme, c'est un des paramètres les plus importants de la chromatographie qui reste avant tout une technique de séparation des composés.

Par définition α est le rapport entre les facteurs de rétention k_2 et k_1 de deux composés adjacents.

$$\alpha = k_2 / k_1$$

$$k_2 = t_{R'2} / t_M$$

$$k_1 = t_{R'1} / t_M$$

$$\alpha = t_{R'2} / t_{R'1}$$

Par définition le pic 2 est le pic dont le temps de rétention est le plus élevé, en conséquence, le facteur de séparation ou de sélectivité α est toujours supérieur à l'unité. $\alpha > 1$

R : Facteur de résolution entre deux pics :

Pour traduire numériquement la qualité de la séparation entre deux composés on définit le facteur de résolution R de la manière suivante :

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

ou puisque : $\omega = 1,7 \delta$

$$R = 1,18 (t_{R2} - t_{R1}) / (\delta_1 + \delta_2)$$

ou encore puisque : $\omega = 4 \sigma$

$$R = 0,5 (t_{R2} - t_{R1}) / (\sigma_1 + \sigma_2)$$

C'est cette dernière définition utilisant l'écart type σ qui est la plus pratique d'utilisation.

Cette définition ne fait pas apparaître les paramètres chromatographiques N, k et α .

Pour les faire apparaître nous allons faire certaines hypothèses :

Hypothèse 1 :

Supposons que l'efficacité est la même pour les deux composés, ce qui est presque toujours vérifié pour deux composés proches (voir activité N°6).

$$R = \frac{1}{2} (t_{R2} - t_{R1}) / (\sigma_1 + \sigma_2)$$

$$N_1 = N_2 = N$$

$$N = t^2 / \sigma^2$$

$$\sigma_1 = t_1 / N^{1/2} \text{ et } \sigma_2 = t_2 / N^{1/2}$$

$$\sigma_1 + \sigma_2 = t_1 / N^{1/2} + t_2 / N^{1/2} = (1 / N^{1/2}) (t_1 + t_2)$$

$$1 / (\sigma_1 + \sigma_2) = N^{1/2} / (t_1 + t_2)$$

$$R = \frac{1}{2} (t_{R2} - t_{R1}) / (\sigma_1 + \sigma_2)$$

$$R = \frac{1}{2} N^{1/2} (t_{R2} - t_{R1}) / (t_{R2} + t_{R1})$$

Nous venons ainsi de faire apparaître l'efficacité N de la colonne.

Hypothèse 2 :

Si on suppose pour simplifier, en considérant deux pics très proches et donc de largeur sensiblement identique : $\omega_1 = \omega_2 = \omega$

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

$$R = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / 2 \omega$$

$$R = (t_{R2} - t_{R1}) / \omega$$

$$\text{Or : } t_{R2} - t_{R1} = t'_{R2} - t'_{R1}$$

$$\text{et } \alpha = t'_{R2} / t'_{R1}$$

$$\text{donc : } t'_{R1} = t'_{R2} / \alpha$$

$$\text{et } t'_{R2} - t'_{R1} = t'_{R2} - t'_{R2} / \alpha = t'_{R2} (1 - 1/\alpha) = t'_{R2} (\alpha - 1) / \alpha$$

$$R = (t'_{R2} / \omega) (\alpha - 1) / \alpha$$

Nous venons ainsi de faire apparaître la sélectivité α de la séparation

$$\text{Or } N_{\text{eff}} = 16 (t'_R / \omega)^2$$

Soit finalement

$$\text{soit : } (t'_R / \omega)^2 = N_{\text{eff}} / 16$$

$$\text{ou encore : } (t'_R / \omega) = \frac{1}{4} N_{\text{eff}}^{1/2}$$

$$R = \frac{1}{4} N_{\text{eff}}^{1/2} (\alpha - 1) / \alpha$$

Nous venons ainsi de faire apparaître la sélectivité α de la séparation et l'efficacité réelle N_{eff} de la colonne

Nous allons maintenant établir l'importante relation de Purnell qui relie la résolution aux trois grandeurs fondamentales que sont l'efficacité N , la sélectivité α et le facteur de rétention k .

$$R = \frac{1}{4} N^{1/2} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k_2}{1 + k_2} \right]$$

Nous avons établi la relation : $t'_{R2} - t'_{R1} = t'_{R2} (\alpha - 1) / \alpha$

mais $k_2 = t'_{R2} / t_M$
 soit : $t'_{R2} = k_2 t_M$

On a donc également : $t'_{R2} - t'_{R1} = k_2 t_M (\alpha - 1) / \alpha$

Nous avons également établi la relation : $R = (t_{R2} - t_{R1}) / \omega$

Soit : $R = (t_{R2} - t_{R1}) / \omega = (t'_{R2} - t'_{R1}) / \omega = \frac{1}{4} (t'_{R2} - t'_{R1}) / \sigma$

Remplaçons $t'_{R2} - t'_{R1}$ par $k_2 t_M (\alpha - 1) / \alpha$

$$R = \frac{1}{4} (k_2 t_M (\alpha - 1) / \alpha) / \sigma = \frac{1}{4} (k_2 (\alpha - 1) / \alpha) t_M / \sigma$$

$$R = \frac{1}{4} (k_2 (\alpha - 1) / \alpha) t_M / \sigma$$

$$R = \frac{1}{4} \left(k_2 (\alpha - 1) / \alpha \right) t_M / \sigma$$

Remplaçons σ par son expression en fonction de N et t_R

$$\sigma = t_{R2} / N^{1/2}$$

$$1 / \sigma = N^{1/2} / t_{R2}$$

$$t_M / \sigma = N^{1/2} t_M / t_{R2}$$

$$R = \frac{1}{4} \left(k_2 (\alpha - 1) / \alpha \right) N^{1/2} t_M / t_{R2}$$

Exprimons le terme t_M / t_{R2}

$$\text{On a } k_2 = (t_{R2} - t_M) / t_M$$

$$\text{soit } k_2 = (t_{R2} / t_M) - 1$$

$$\text{soit encore } 1 + k_2 = (t_{R2} / t_M)$$

$$\text{et donc : } (t_M / t_{R2}) = [1 / (1 + k_2)]$$

$$R = \frac{1}{4} \left(k_2 (\alpha - 1) / \alpha \right) N^{1/2} t_M / t_{R2}$$

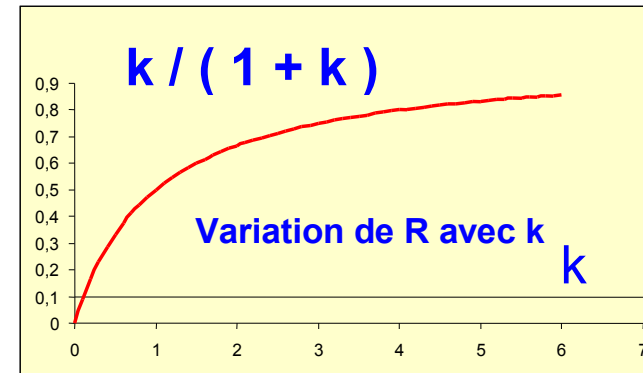
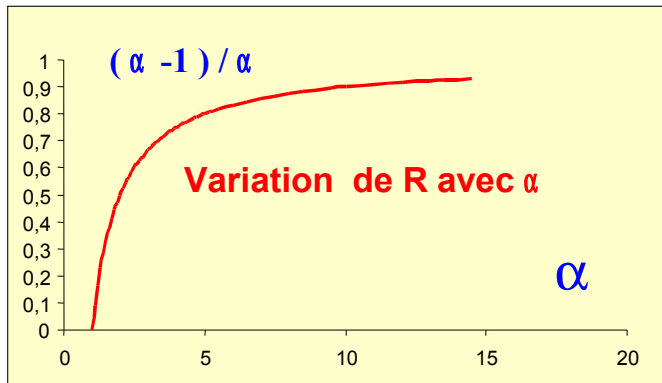
$$R = \frac{1}{4} \left(k_2 (\alpha - 1) / \alpha \right) N^{1/2} [1 / (1 + k_2)]$$

Qu'on réarrange en : $R = \frac{1}{4} N^{1/2} [(\alpha - 1) / \alpha] [k_2 / (1 + k_2)]$

On exprime ainsi R en fonction des trois grandeurs N , α et k , c'est la relation fondamentale de PURNEL

$$R = \frac{1}{4} N^{1/2} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k_2}{1 + k_2} \right]$$

Variation de la Résolution avec la Sélectivité α et le Facteur de rétention k



A priori, pour augmenter la résolution il est intéressant d'augmenter la sélectivité α et le facteur de rétention k

Mais on voit qu'il est inutile d'augmenter trop fortement les valeurs de α ou k car on tend rapidement vers un pallier et la résolution gagnée est faible devant l'allongement de la durée d'analyse.

Remarque : De part les hypothèses faites pour l'établir, l'approximation de Purnel sera d'autant mieux vérifiée que les deux pics seront proches

Activité N°10 : Effet de la résolution sur le chromatogramme

Influence du débit

Equation de Van Deemter- Knox

Dans tout ce qui précède, on n'a pas tenu compte de l'influence du débit de la phase mobile qu'on a supposé constant. Or il est évident que ce débit va modifier le chromatogramme et influencer la séparation des constituants. Au premier abord, on s'attend à ce que la séparation soit meilleure avec un débit plus faible.

Il existe une équation dite équation de Van Deemter (en C.P.G) ou une équation pratiquement équivalente dite de Knox (en chromatographie liquide) qui relie la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile u :

$$h.e.p.t = h(u) = A + B/u + C u$$

Attention aux unités utilisées, on exprime généralement :

u en **cm/s** et h en **cm** pour être cohérent :

Dans ces hypothèses :

A sera en **cm** ; B sera en **cm²/s** et C sera en **s**

Remarque : L'équation de Knox pour la chromatographie liquide est en réalité un peu plus complexe que celle de Van Deemter en phase gazeuse mais il y a finalement peu de différence et nous utiliserons donc celle de Van Deemter plus simple d'utilisation.

La courbe obtenue passe par un minimum dont on peut classiquement trouver les coordonnées par annulation de la dérivée.:

$$h'(u) = C - (B / u^2)$$

$$C - (B / u^2) = 0$$

$$C = (B / u^2)$$

$$u^2 = B / C \text{ et } u = (B/C)^{1/2}$$

$$\text{Soit : } u_{\text{opt}} = (B/C)^{1/2} \text{ et } h(u_{\text{opt}}) = h_{\text{min}} = A + (B \cdot C)^{1/2} + B / (B/C)^{1/2}$$

Dans la pratique on cherche à déterminer le minimum de la courbe qui correspond à la HEPT minimale soit au nombre maximal de plateau et donc à la séparation optimale. Pour cela on procède à plusieurs chromatographie d'un même composé avec le même éluant mais avec plusieurs débit différents. On mesure l'efficacité de la colonne pour ces divers débit et on trace la courbe correspondante.

On peut éventuellement déterminer également les trois paramètres A, B et C, on peut procéder par régressions linéaires multiples ou déterminer graphiquement A, B et C en sachant que la courbe tend vers la droite

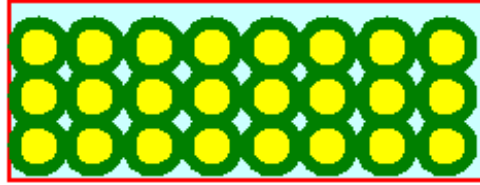
$h = A + C u$ quand u devient grand.

On peut ensuite trouver B par l'ordonnée du minimum de la courbe.

Remarque : Dans la pratique, la vitesse linéaire moyenne est proportionnelle au débit de l'éluant : $u = D \cdot L / V_M$

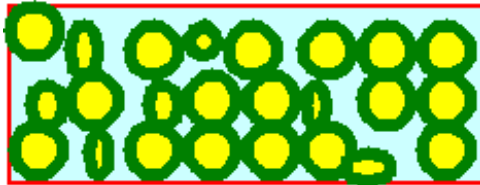
C'est souvent en fonction du débit qu'on trace la courbe.

Signification physique des termes A, B et C.



Bon remplissage bien régulier
Pas de chemins préférentiels :

A faible voire négligeable



Mauvais remplissage irrégulier
Création de chemins préférentiels :

A élevé = mauvaise séparation

A : terme de remplissage

Ce terme est en relation avec le profil d'écoulement de la phase mobile à travers la phase stationnaire. La taille des particules, leur répartition et la régularité du remplissage ou du tassement de la colonne font que la phase mobile circule plus ou moins facilement. Si des chemins préférentiels sont créés, la phase mobile circule librement et rapidement à l'intérieur de la phase stationnaire et les équilibres entre phase fixe et mobile ne se font plus correctement ce qui diminue l'efficacité de la colonne. Ce phénomène est appelé diffusion turbulente d'Eddy.

Remarque : Ce phénomène est parfois négligeable et on peut écrire une équation sans terme A appelée équation de Goley. C'est souvent le cas en chromatographie liquide ou pour les colonnes dites capillaire en C.P.G.

B : terme de diffusion dans la phase mobile

Ce terme est particulièrement important en C.P.G. Il est une conséquence du second principe de la thermodynamique qui veut que l'entropie (et donc le désordre) augmente spontanément. La séparation chromatographique est une "mise en ordre" et est donc opposée à cette augmentation de l'entropie. Les molécules ont toujours une tendance naturelle à occuper au maximum l'espace qui leur est offert et à se mélanger à nouveau entre elles. Cela est particulièrement vrai si le débit de la phase mobile est très faible, les molécules se mélangent alors plus vite qu'elles ne se séparent. C'est ce qui explique la diminution de l'efficacité pour les très faibles débits, ce qui pourrait paraître au premier abord paradoxal.

C : terme de transfert de masse

Le terme C, est dû à la résistance au transfert de masse du soluté entre les deux phases, il devient prépondérant lorsque le passage est trop rapide pour que les équilibres puissent s'établir correctement. Les solutés sont entraînés hors équilibre et les séparations ne se font plus correctement.

Evaluation à priori du débit optimal en chromatographie liquide :

Une formule empirique permet d'estimer simplement le débit optimal d'utilisation d'une colonne à partir du diamètre d_p des particules de la colonne, de sa porosité et de ses caractéristiques géométriques.

$$h_{\min} (\mu\text{m}) = 3 d_p (\mu\text{m})$$

$$u_{\text{opt}} (\text{cm.s}^{-1}) = 0,5 / d_p (\mu\text{m})$$

On en déduit le débit optimal d'utilisation de la colonne :

$$D_{\text{opt}} = u_{\text{opt}} * V_M / L$$

u_{opt} en cm.s^{-1}
 V_M en cm^3 ou mL
 L en cm
 D en $\text{cm}^3.\text{s}^{-1}$ (ou mL.s^{-1})

$$D_{\text{opt}} (\text{mL.min}^{-1}) = 60 * 0,5 / d_p (\mu\text{m}) * V_M (\text{mL}) / L(\text{cm})$$

$$D_{\text{opt}} (\text{mL.min}^{-1}) = 30 / d_p (\mu\text{m}) * V_M (\text{mL}) / L(\text{cm})$$

On peut aussi déterminer son efficacité attendue.

$$N_{\text{attendue}} = L / h_{\text{min}} \text{ (avec } L \text{ et } h_{\text{min}} \text{ exprimées avec la même unité)}$$

$$N_{\text{attendue}} = L / (3 d_p)$$

(avec L et d_p exprimées avec la même unité)

Cette détermination a priori de N ne donne qu'une valeur approximative mais permet de connaître l'ordre de grandeur de N.

L'efficacité augmente quand la taille des particules de phase stationnaire diminue.

On est néanmoins rapidement limité car des particules trop petites présentent l'inconvénient majeur de colmater très facilement la colonne. Le solvant a beaucoup de mal à circuler et on est conduit à utiliser des pressions trop élevées.

Les colonnes standard en H.P.L.C contiennent des particules d'environ 5 μm de diamètre.

Activité N° 11 : Courbe de Van Deemter – Débit optimal de séparation

Si on fait l'hypothèse simplificatrice que le terme A est nul on peut déterminer facilement B et C et donc déterminer N pour un débit quelconque.

$$h(u) = A + B / u + C u \quad \text{Se simplifie en : } h(u) = B / u + C u$$

$$\text{Soit : } h(u_{\text{opt}}) = h_{\text{min}} = B / u_{\text{opt}} + C u_{\text{opt}}$$

$$\text{Nous savons que : } u_{\text{opt}} = (B/C)^{0.5}$$

$$h_{\text{opt}} = [B / (B \cdot C)^{0.5}] + [C * (B/C)^{0.5}]$$

Cette expression apparemment complexe se simplifie en fait en : $h_{\text{opt}} = 2 (B C)^{1/2}$

Exprimons B en fonction de C et u_{opt}

$$u_{\text{opt}} = (B/C)^{0.5} \text{ soit } B / C = u_{\text{opt}}^2 \text{ soit finalement : } \boxed{B = C u_{\text{opt}}^2}$$

Remplaçons B dans l'expression de h_{opt} :

$$h_{\text{opt}} = 2 (B C)^{1/2} = 2 (C u_{\text{opt}}^2 C)^{1/2} = 2 C u_{\text{opt}}$$

Soit l'expression de C :

$$\boxed{C = 1/2 * h_{\text{opt}} / u_{\text{opt}}}$$

La formule empirique permet de trouver u_{opt}

$$u_{opt} \text{ (cm.s}^{-1}\text{)} = 0,5 / d_p \text{ (}\mu\text{m)}$$

La formule empirique permet de trouver h_{opt}

$$h_{opt} \text{ (}\mu\text{m)} = 3 d_p \text{ (}\mu\text{m)}$$

Pour rester cohérent au niveau des unités nous exprimerons h_{opt} en cm et u_{opt} en cm/s

L'unité choisie pour d_p reste le μm

$$h_{opt} \text{ (cm)} = 10^{-4} * h_{opt} \text{ (}\mu\text{m)} = 3 \cdot 10^{-4} * d_p \text{ (}\mu\text{m)}$$

$$C = \frac{1}{2} * h_{opt} / u_{opt}$$

$$C = \frac{1}{2} * 3 \cdot 10^{-4} * d_p / (0,5 * d_p) = 3 \cdot 10^{-4} d_p^2$$

$$C = 3 \cdot 10^{-4} d_p^2$$

avec C en s et d_p exprimé en μm

$$B = C u_{opt}^2$$

$$u_{opt}^2 = 0,25 / d_p^2 \text{ et } C = 3 \cdot 10^{-4} d_p^2$$

$$B = 7,5 \cdot 10^{-5}$$

avec B en cm^2/s

Enfin on peut donc exprimer h et N en fonction de u

$$h.e.p.t = h(u) = A + B/u + C u$$

$$A = 0 \text{ cm}$$

$$B = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$C = 3 \cdot 10^{-4} d_p^2 \text{ s}$$

$$h(u) = 7,5 \cdot 10^{-5} / u + 3 \cdot 10^{-4} * d_p^2 * u$$

$$N(u) = L / h(u) = L / (7,5 \cdot 10^{-5} / u + 3 \cdot 10^{-4} * d_p^2 * u)$$

Avec : L et h en cm, u en cm/s et d_p en μm

On pourra exprimer également h et N en fonction du débit grâce à la relation $u = D * L / V_M$

Activité N°12 : Récapitulation générale – Réalisation d'un simulateur de chromatogramme sur EXCEL ou sur calculatrice graphique :

[simulchro.xls](#)

[simulchro_a_faire.xls](#)

Influence du débit sur les temps de rétention

Les temps de rétention des solutés dépendent fortement du débit de la phase mobile.

Plus le débit sera élevé, et plus les temps de rétentions seront réduits. et donc la durée de l'analyse sera diminuée.

On pourra donc pour gagner sur le temps d'analyse augmenter le débit.

On ne peut toutefois pas l'augmenter trop car cela présente plusieurs inconvénients :

- 1) On ne doit pas trop s'éloigner du débit optimal pour que l'efficacité de la colonne reste correcte.
- 2) Une augmentation du débit entraîne également en C.L.H.P une augmentation de la pression à imposer et on sera donc limité par la résistance des colonnes et du matériel en général qui ne peuvent supporter des pressions trop importantes.
- 3) Une augmentation du débit entraîne également des inconvénients économiques :
 - une plus grande consommation de l'éluant.
 - une usure plus rapide du matériel

Si on porte le temps de rétention d'un soluté en fonction de l'inverse du débit, on obtient une droite de pente $p = V_M + K V_S$

Nous avons établi la relation : $V_R = V_M + K V_S$ Or : $V_R = t_R * D$

Soit : $t_R * D = V_M + K V_S$ **et donc :**

$$t_R = (1/D) * (V_M + K V_S)$$