

Chapitre I

Méthodes Chromatographiques



Méthodes Chromatographiques

I. Généralités sur la chromatographie

I. 1. Définition

La chromatographie est une technique de séparation dans laquelle, les constituants d'un mélange sont entraînés par un courant de phase mobile, qui peut être liquide, gaz ou fluide supercritique, le long d'une phase stationnaire, qui peut être du papier, de la gélatine, de la silice, un polymère, de la silice greffée etc. Chaque substance se déplace à une vitesse donnée, dépendant de ses caractéristiques (polaire, non polaire, ionique, etc...) et de celles des deux phases.

Intéressons nous maintenant à savoir comment est née la chromatographie, à travers un peu d'histoire :

I. 2. Historique

1906 : le botaniste russe Mikhail Semenovich Tswett décrit la purification des pigments végétaux d'une feuille d'épinard. Il faisait écouler des solutions contenant ces substances dans une colonne remplie de carbonate de calcium finement divisé. Les pigments étaient entraînés avec de l'éther de pétrole (mélange de pentane et d'hexane). Les espèces ainsi séparées se manifestaient sous forme de bandes colorées dans la colonne ce qui explique l'origine du nom de la méthode (En grec, chroma signifie « couleur » et graphein, « écrire » enregistrement graphique des couleurs).

1931 : Khun et Lederer séparent à une échelle préparative les carotènes et des xanthophylles.

1938 : Reichstein introduit la chromatographie liquide.

1941 : Martin et Synge introduisent la chromatographie de partage sur gel de silice, et développent la pratique et la théorie de la chromatographie, ils obtiennent le prix Nobel en 1952.

1944 : Consden, Gordon et Martin inventent la chromatographie de partage sur papier, méthode très ingénieuse, permettant d'analyser non plus quelques milligrammes, mais quelques grammes d'acides aminés, de sucres, etc.

1940-1947 : Wilson, Devault, Weiss, Glückauf, Martin, Synge et d'autres développent des théories détaillées de la chromatographie.

1952 : mise au point de la chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

1968 : mise au point de la chromatographie Liquide Haute Performance CLHP ou HPLC.

I. 3. Principe de la chromatographie

Le principe de la chromatographie repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire et la phase mobile.

- La phase stationnaire est une phase qui reste en place, soit dans une colonne, ou fixée sur un support.
- La phase mobile est une phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire. L'entrainement à des vitesses différentes des composés présents dans la phase mobile conduit à leur séparation.
- L'élution est un processus au cours duquel les analytes sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile.

La séparation est fondée sur l'entrainement différentiel des composants du mélange. Ces derniers traversent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés principaux (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...).

I. 4. Classification des techniques chromatographiques

Sous le nom de chromatographie, on regroupe un très grand nombre de techniques différentes qui, peuvent se classer en 3 catégories selon :

I. 4. 1. La technologie mise en œuvre

- Chromatographie sur colonne
- Chromatographie de surface: sur papier ou sur couche mince (CCM)

I. 4. 2. La nature des phases

-La nature de la phase mobile on distingue:

- la chromatographie en phase liquide (CPL)
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- la chromatographie en phase supercritique (CPS)

- Selon la nature de la phase stationnaire on distingue:

- La chromatographie gaz / solide (CGS)
- La chromatographie gaz / liquide (CGL)
- La chromatographie liquide / solide (CLS)
- La chromatographie liquide / liquide (CLL)

I. 4. 3. Classification selon le mécanisme de rétention

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les substances à séparer. On distingue : la chromatographie d'adsorption, de partage, d'exclusion, d'échange d'ions et la chromatographie d'affinité.

I. 5. Choix de la technique

Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes. Le choix de l'une ou l'autre dépend de deux facteurs:

1. la nature du soluté : solide, liquide volatil, liquide peu volatil, gaz, macromolécule, espèce organique, ionique, polaire...
2. le but de l'analyse : purification de produits, contrôle de pureté, identification, suivi d'une réaction en continu pour optimiser des paramètres, ...

II. Grandeurs fondamentales et définitions

II. 1. Le chromatogramme

Le chromatogramme est un diagramme à deux dimensions présenté sur un écran ou sur papier. Il montre l'évolution d'un paramètre qui dépend de la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne en fonction du temps (figure I.1). Le temps (ou le volume d'élution) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée.

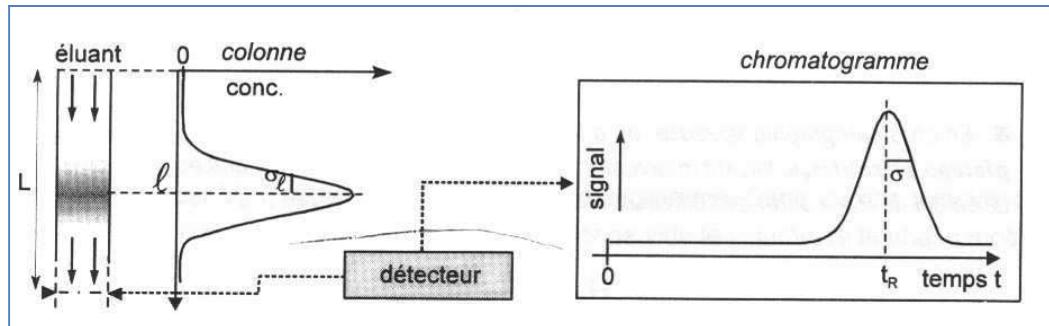


Figure I. 1 : représentation d'un chromatogramme

II. 2. Notion de temps

- Temps de rétention (t_r) : Le temps de rétention (t_r) représente le temps écoulé par un constituant, entre le moment de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié (Figure I.2).

■ **Temps mort (t_m)** : Le temps mort (t_m) est le temps mis par un soluté non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).

Remarque : La mesure du temps mort (t_m) peut se faire en injectant un composé dont on est sûr qu'il n'est pas retenu sur la colonne dans les conditions choisies.

■ **Temps de rétention réduit ($t_{r'}$)** : Le temps de rétention réduit est la différence entre le temps de rétention et le temps mort: $t_{r'} = t_r - t_m$

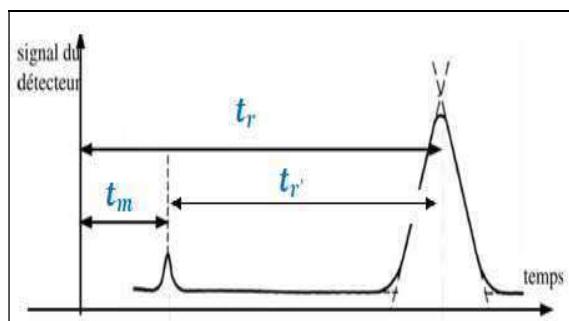


Figure I.2: courbe d'élution (ou chromatogramme)

II. 3. Notion de volume

■ **Volume d'élution ou volume de rétention (V_r)** : Le volume de rétention (V_r) de chaque soluté représente le volume de phase mobile indispensable pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Sur le chromatogramme c'est le volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre le moment de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si D est le débit alors :

$$V_r = t_r \times D$$

■ **Le volume mort V_m** : volume de phase mobile indispensable à l'élution d'un composé non retenu par la colonne.

$$V_m = t_m \times D$$

■ **Le volume de rétention réduit** : c'est la différence entre volume de rétention et volume mort.

$$V_{r'} = V_r - V_m$$

■ **Volume d'un pic (V_{pic})** : Il correspond au volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne. Il vaut par définition :

$$V_{pic} = \omega \cdot D \quad (\omega : correspond à la largeur du pic à la base)$$

II. 4. Facteur de rétention

Le facteur de rétention (ou de capacité) K' est le rapport de la quantité d'un même soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K'_A = m_S/m_M = C_S \cdot V_S / C_M \cdot V_M$$

V_S : volume de la phase stationnaire

V_M : volume de la phase mobile ou volume mort

K' est un paramètre très important en chromatographie. 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. Une valeur de K' élevée indique que le composé est fortement retenu par la colonne. Idéalement $1 < K' < 10$ pour les différents solutés d'un mélange. K' peut être déterminé expérimentalement par l'équation suivante :

$$K' = (t_r - t_m) / t_m = t_r' / t_m$$

II. 5. Notion d'efficacité

II. 5. 1. Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

En 1941, Martin et Synge ont considéré la colonne de chromatographie comme une colonne de distillation en N petits disques cylindriques successifs (Figure I. 3). La phase mobile progresse non pas de façon continue, mais par sauts successifs d'un plateau théorique à l'autre. Au niveau de chaque plateau, l'équilibre est réalisé entre les deux phases.

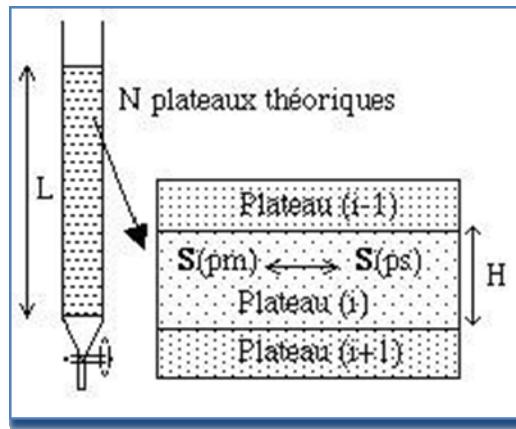


Figure I.3. Model des plateaux théoriques

L'efficacité est mesurée par le nombre de plateaux théorique N . Les pics chromatographiques ont une allure gaussienne. Les caractéristiques géométriques de la

courbe de Gauss (Figure I. 4) permettent de calculer, pour un soluté donné, N à partir du chromatogramme.

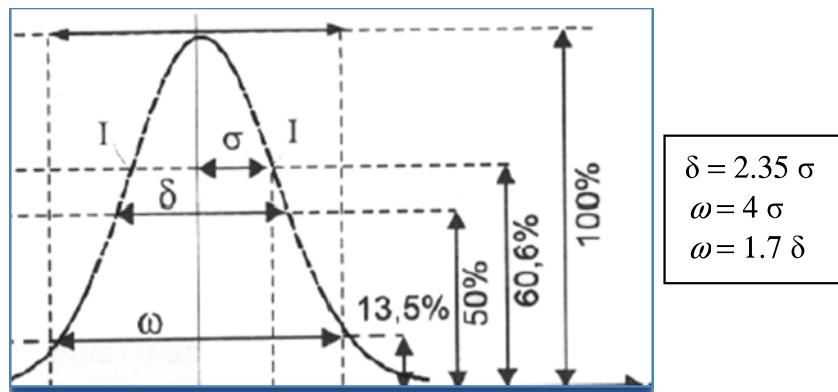


Figure I.4: Caractéristiques d'un pic idéal chromatographique

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace.

II. 5. 2. Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs N_{eff})

Lorsqu'on veut comparer les performances de deux colonnes de conception différentes, il est préférable de remplacer (t_r) par le temps réduit (t'_R) qui ne tient pas compte du temps mort (t_m) passé pour tout composé dans la phase mobile. Les expressions deviennent :

$$N_{eff} = 5,54 \left(\frac{t'_R}{\delta} \right)^2$$

$$N_{eff} = 16 \left(\frac{t'_R}{\omega} \right)^2$$

Ces grandeurs corrigées ne sont utiles à considérer que si le temps mort est grand par rapport au temps de rétention du composé. Ceci est notamment le cas en CPG lorsqu'on voulait comparer les performances d'une colonne capillaire et d'une colonne remplie.

II. 5. 3. Hauteur équivalente à un plateau théorique H

Connaissant la longueur L de la colonne et le nombre de plateaux théoriques (N) on définit une Hauteur Équivalente à un Plateau Théorique (HEPT ou H).

$$\boxed{HEPT=L/N}$$

La HEPT permet de comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs. Elle est fonction de différents paramètres qui eux-mêmes sont susceptibles de varier avec la vitesse de la phase mobile. En HPLC les HEPT sont comprises entre 0,001 et 1 mm. L'efficacité des colonnes chromatographiques augmente si le nombre de plateaux théoriques augmente ou si la hauteur équivalente à un plateau théorique diminue à longueur constante.

II. 6. Qualité de la séparation

II. 6. 1. Sélectivité (α)

Le facteur de sélectivité caractérise la distance qui sépare les sommets de deux pics. Ce facteur est égal au rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser la séparation. Il s'exprime par :

$$\alpha = (t_{r2} - t_m) / (t_{r1} - t_m) = k_2' / k_1' \quad (\text{Avec } k_2' > k_1')$$

k_2' : facteur de capacité du composé 2 ; k_1' : facteur de capacité du composé 1

La sélectivité doit être supérieure à 1.

Un exemple de calcul de la sélectivité est représenté dans la figure I.5.

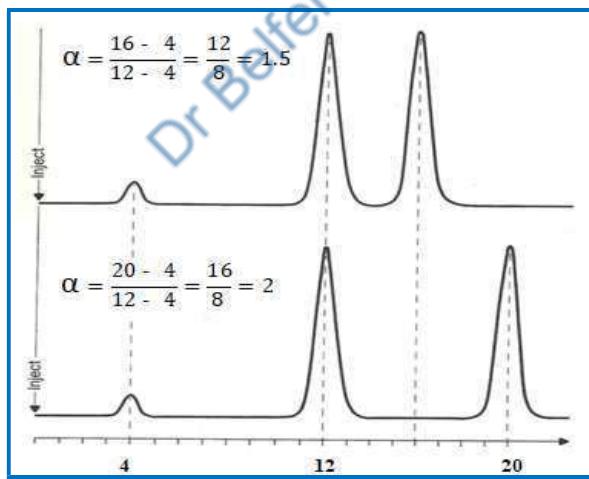


Figure I.5 : exemple de calcul de la sélectivité

II. 6. 2. Résolution

La résolution est la grandeur qui caractérise l'aptitude d'un système chromatographique (colonne, solutés, solvants) à séparer deux solutés. Le but de la chromatographie est d'obtenir la meilleure résolution dans le temps le plus court.

Si dans certaines conditions, deux constituants sortent à des temps proches, leurs pics risquent de se chevaucher. En optimisant les conditions analytiques, il est possible d'améliorer l'allure du chromatogramme. Le paramètre de résolution R quantifie la qualité

de cette séparation. Bien qu'on la mesure, en général, sur deux pics contigus, elle peut être calculée sur n'importe quel couple de pics.

$$R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_2 + \omega_1)} = 2 \frac{(t'_{R2} - t'_{R1})}{(\omega_2 + \omega_1)}$$

$R < 1$: mauvaise résolution

$1 < R < 1.4$: résolution acceptable

$1.4 < R < 1.6$: résolution optimale

$R > 1.6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé.

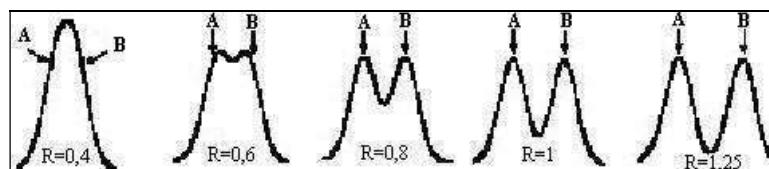


Figure I.6 : qualité de la séparation de deux pics d'intensité égale

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation et pour l'optimiser, il est parfois utile d'exprimer cette résolution en fonction de la sélectivité et de l'efficacité du dernier des deux pics étudiés.

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_2 + \omega_1} = \frac{t'_{R2} - t'_{R1}}{\omega_2 + \omega_1}$$

II. 7. Notion de pression

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement. En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars. La perte de charge qui est la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne est donnée par *la loi de Darcy* :

$$\Delta P = \frac{\Phi \cdot \eta \cdot L}{D^2} \cdot u$$

Φ : facteur de résistance à l'écoulement (sans dimension).

D : diamètre moyen des particules (m).

η : viscosité (Pa.s).

L : longueur de la colonne (m).

u: vitesse de la phase mobile ($m.s^{-1}$).

II. 7. 1. Théorie cinétique

La théorie des plateaux a permis d'arriver à un certain nombre de conclusions expérimentalement vérifiées, mais elle néglige le fait que la chromatographie est un phénomène dynamique résultant du passage continu de la phase mobile sur la phase stationnaire. Les conditions dans lesquelles s'effectuent ces passages ne sont pas sans importance sur le phénomène chromatographique comme on peut le constater lorsque l'on modifie par exemple le débit de la phase mobile. On observe en effet, un élargissement ou un rétrécissement des pics que la théorie des plateaux ne peut pas exprimer.

La théorie cinétique due à Giddings lie le nombre de plateaux H (HEPT) d'une colonne à la vitesse d'écoulement de la phase mobile u dans la colonne (figure I.7). Cette théorie cinétique est représentée par l'équation de **Van Deemter** :

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

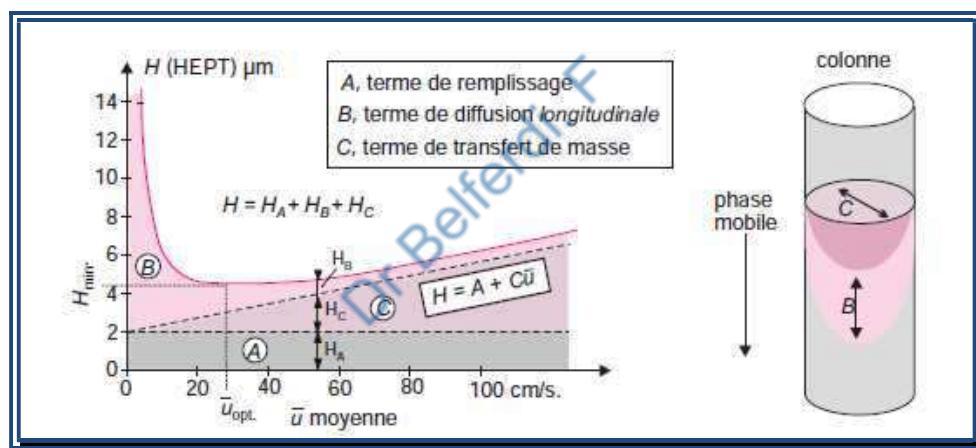


Figure I.7 : Allure de la courbe de Van Deemter

Les trois coefficients numériques expérimentaux A , B et C sont reliés à divers paramètres physico-chimiques, à la colonne et aux conditions opératoires. Si on choisit d'exprimer H en cm, A sera en cm, B en cm^2/s et C en s (la vitesse étant en cm/s). La courbe représentative de cette fonction est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum (H_{min}) pour :

$$u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

- u : vitesse moyenne de la phase mobile (gaz vecteur).

- **A** : diffusion turbulente due à l'écoulement irrégulier de la phase mobile à travers la phase stationnaire (particules plus ou moins régulières)

$$A = 2\lambda d_p$$

λ : paramètre d'irrégularité du remplissage

d_p : diamètre des particules

- **B** : diffusion longitudinale, rend compte de la diffusion des molécules dans la direction de l'écoulement, elle est d'autant plus importante que la vitesse est faible

$$B = 2 \cdot \gamma \cdot D_m$$

D_m coefficient de diffusion dans la phase mobile ; γ facteur de tortuosité

- **C** : transfert de masse des molécules de soluté entre la phase stationnaire C_s et la phase mobile C_m

$$C = C_s + C_m$$

En général :

- Toutes les molécules ne sont pas entraînées à la même vitesse.
- Le contact entre phase mobile et phase stationnaire ne s'effectue pas partout de manière identique.
- Les molécules de solutés dans la phase stationnaire sont situées à des distances variables de la phase mobile.

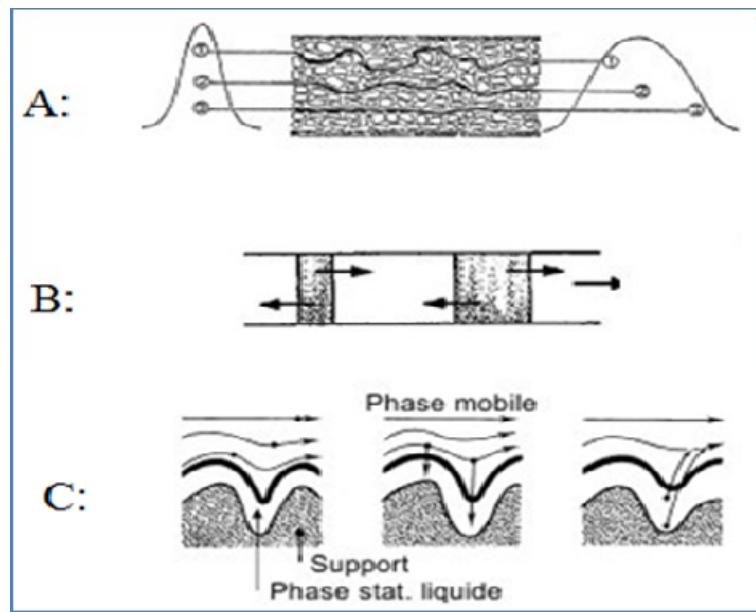


Figure I.8 : Equation de Van Deemter

III. La chromatographie liquide

La chromatographie liquide est une technique de séparation où la phase mobile est un liquide, souvent constituée d'un mélange de solvant, et la phase stationnaire est un solide. C'est forme la plus anciennement connue en tant que méthode préparative de séparation. Cette catégorie très répandue peut être subdivisée d'après le phénomène mis en jeu :

- **La chromatographie liquide/solide (ou d'adsorption)** : elle est basée sur la répartition des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.
- **Chromatographie liquide/liquide ou de partage (CLL)** : La phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un matériau inerte et poreux qui n'a qu'un rôle de support. L'imprégnation, le procédé le plus ancien pour immobiliser un liquide, est une voie maintenant abandonnée, par suite d'un risque important de lessivage de la colonne.
- **Chromatographie liquide/phase gréffée** : basée sur les différences de solubilité des molécules entre la phase stationnaire (liquide) et la phase mobile. Les phases stationnaires sont généralement des polymères liquides qui sont greffés sur un matériau inerte poreux qui n'a qu'un rôle de support. La séparation repose sur le *coefficent de partage K* du soluté entre les deux phases, un phénomène comparable à l'extraction d'une phase aqueuse avec un solvant dans une ampoule à décanter.
- **Chromatographie ionique** : La phase stationnaire solide comporte en surface des sites ioniques et la phase mobile est une solution-tampon aqueuse. La séparation met en jeu des échanges entre les ions de l'échantillon avec ceux de la phase stationnaire. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique.
- **Chromatographie d'exclusion** : La phase stationnaire est un matériau comportant des pores dont les dimensions sont choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. Les molécules sont séparées en fonction de leur taille et leur masse moléculaire.

III. 1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM), également connue sous le nom de chromatographie planaire, est une technique très utile et simple à mettre en œuvre, elle s'effectue généralement sur une fine couche de silice (phase stationnaire) déposée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire (figure I.9)



Figure I.9 : plaques CCM

III. 1. 1. Principe de la technique

Le mélange à étudier est déposé sur la plaque CCM à l'aide d'un capillaire à environ 1 cm du bord puis, placé dans une cuve contenant l'éluant.

Les substances migrent sur la plaque de silice par capillarité à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant et entraîne les composés du mélange étudié. Si les vitesses de migration des composés sont différentes, ils seront séparés.

La plaque de chromatographie est ensuite lue directement si les composés sont visibles, ou placé sous une lumière UV. Ils peuvent également être révélés avec un révélateur chimique tel que l'iode (c'est le premier révélateur à tester, car il est non destructif et il permet de révéler des doubles liaisons et les halogénures). De nombreux autres existent comme : KMnO_4 , d'acide sulfurique acide phosphomolybdique, vanilline, ninhydrine...

III. 1. 2. Description d'une analyse par CCM selon l'ordre chronologique.

1. Préparation de la cuve chromatographique.

- ▣ Introduire l'éluant (exemple : 8 mL Hexane + 2 mL Acétate d'éthyle) dans la cuve
- ▣ Ajuster le niveau à environ 0,5 cm du fond de la cuve.
- ▣ Fermer le récipient (la cuve doit être saturée de vapeur de solvant)

2. Choix de l'éluant

Il ya deux facteurs qui interviennent lors du choix de l'éluant :

- **la solubilité**: on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.
- **la polarité** : la polarité de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre :
Moins un composé est polaire, moins il s'accroche à l'adsorbant, plus il migre avec l'éluant, ce qui nécessite l'utilisation d'un éluant peu polaire. Plus un composé est polaire, plus il s'accroche à l'adsorbant, moins il migre avec l'éluant, et dans ce cas, on doit choisir un éluant polaire.

Tableau 1 : force éluante de quelques solvants.

Solvant	force éluante	Solvant	force éluante
Ether de pétrole	0.01	Acétone	0.56
Hexane	0.01	Dioxane	0.56
Cyclohexane	0.04	Butanol	0.56
Tétrachlorure de carbone	0.18	Acétate d'éthyle	0.58
Ether isopropylique	0.28	Acétonitrile	0.65
Toluène	0.29	Pyridine	0.71
Benzène	0.32	Diméthylsulfoxyde	0.75
Ether éthylique	0.38	Isopropanol	0.82
Chloroforme	0.40	Ethanol	0.88
Chlorure de méthylène	0.42	Méthanol	0.95
Dichloro éthane	0.49	Eau	> 0.95
		Acide acétique	> 0.95

3. Dépôt de l'échantillon sur la plaque.

- ➡ Dissoudre l'échantillon dans un solvant adéquat (Et_2O , CH_2Cl_2 , AcOEt ...), qui n'est pas forcément le même que l'éluant.
- ➡ Poser une goutte (ou deux) de la solution en un point situé à 1 cm de l'extrémité inférieure de la plaque; le diamètre de la tache doit être approximativement 2 mm pour la disposition de plusieurs produits (On peut spotter 2 à 3 fois si l'échantillon est très dilué).
- ➡ Sécher à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir ; éventuellement faire de nouvelles applications.

4. Développement du chromatogramme

- ➡ Mettre la plaque dans la cuve en position verticale en veillant à ce que la ligne soit au-dessus du liquide.
- ➡ Refermer le récipient qui ne doit plus être déplacé.
- ➡ Faire éluer jusqu'à ~1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, retirer la plaque et tracer un trait pour marquer le front de solvant. (le trait peut être tracé à l'avance et servir de repère pour arrêter l'élution).

5. Révélation et calcul de R_f

- ➡ Sécher la plaque à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir
- ➡ Révéler les taches sous une lampe U V (ou autre révélateur)
- ➡ Cercler les taches et pointer leur centre.
- ➡ Calculer les R_f

6. Résultats et interprétation d'une CCM

Dans une chromatographie sur couche mince, les composés apparaissent sous forme de taches rondes ou ovales, ou parfois sous forme des traînées si l'échantillon déposé était trop concentré.

Pour une phase stationnaire et une phase mobile données, chaque composé est caractérisé par son rapport frontal (R_f) calculé par l'expression suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par l'éluant}}$$

La distance parcourue par le composé (x) est calculée à partir du niveau de déposition jusqu'au centre de la tache, tandis que la distance parcourue par l'éluant (x_0) est calculée à partir du niveau de déposition de l'échantillon jusqu'au front de l'éluant, marqué à la fin de l'élution (Figure I.10). Le R_f est un nombre sans unités qui varie entre 0 et 1; il est rapporté à deux décimales près (Exemple : $R_f = 0.73$).

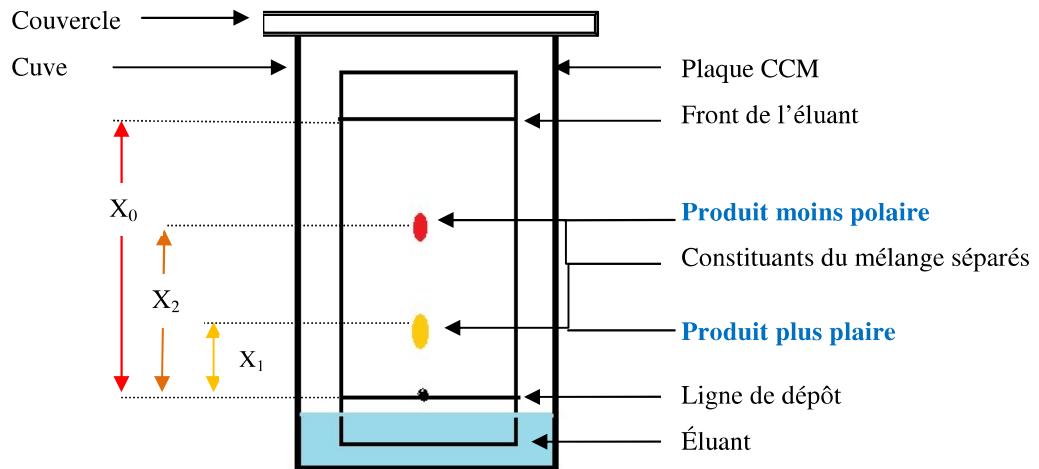


Figure 1. 10 : Plaque CCM

On définit l'efficacité N , la résolution R et le H de la plaque CCM pour un composé dont la distance de migration est x et le diamètre du spot w par les relations suivantes :



III. 1. 3. Applications de la CCM

- ▣ Vérifier la pureté d'un produit, quelques microgrammes suffisent
- ▣ Suivre l'avancement d'une réaction
- ▣ Vérifier l'efficacité d'une extraction liquide-liquide
- ▣ Déterminer l'éluant pour la chromatographie éclair sur gel de silice

III. 2. Chromatographie sur colonne

Cette chromatographie est basée sur le même principe que la CCM, sauf que la silice est placée dans une colonne et non sur une plaque. Le but est toutefois différent:

La chromatographie sur colonne sert à séparer des produits, et à purifier un produit de réaction. C'est la méthode standard de purification dans un laboratoire de chimie organique. Elle permet de purifier 50 mg à environ 20 g en laboratoire, et jusqu'à 1 kg en industrie. La quantité de la phase stationnaire (gel de silice) est en fonction de la quantité de produit à purifier, la hauteur et le diamètre de la colonne (tableau 2).

Tableau 2: masse du produit à purifier en fonction quantité du gel de silice et le diamètre de la colonne

Massé du produit	Massé de silice	Diamètre de la colonne	Hauteur de silice obtenue
15-500 mg	15 g	30 mm	45 mm
500 mg – 3 g	30 mg	40 mm	50 mm
2 – 15 g	100 g	70 mm	55 mm

Ils existent deux types de chromatographie :

- **Chromatographie par gravité:** elle utilise des particules de silice de 70 à 200 μm et le solvant s'écoule au goutte-à-goutte. Cette technique demande une plus grande quantité de silice et de solvant.
- **Chromatographie éclair (flash):** elle utilise des particules de silice de 35 à 70 μm et le solvant s'écoule sous pression d'air comprimé.

III. 2. 1. Description d'une analyse par chromatographie sur colonne selon l'ordre chronologique

1. Choix de l'éluant

Il faut d'abord, faire les premiers tests sur CCM avec différents éluants et cela pour choisir l'éluant le plus approprié (qui donne une meilleure séparation), tout en recherchant un $R_f \sim 0.3$ pour le produit le moins polaire. La polarité de l'éluant peut rester la même tout au long de la chromatographie (élution isocratique) ou aller en augmentant (gradient de solvant).

2. Remplissage de la colonne

C'est l'étape clé pour la réussite d'une séparation. Malheureusement, c'est également la plus délicate car le remplissage doit être le plus homogène possible et exempt de bulle d'air. Il existe deux modes de remplissage :

2.1. Remplissage par voie humide.

- Dans un bécher, on prépare un mélange homogène de l'adsorbant et du moins polaire des solvants en ajoutant par petites quantités l'adsorbant dans le solvant pour obtenir une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement.

- A l'aide d'un entonnoir, on verse suffisamment de bouillie dans la colonne pour que l'adsorbant qui se dépose progressivement forme une couche d'environ 2 cm.
- On tapote les parois de la colonne pour faciliter le tassement de l'adsorbant.
- On ouvre le robinet pour que le solvant s'écoule lentement et on continue l'addition de la bouillie.
- Quand tout l'adsorbant est introduit, on laisse décanter jusqu'à ce que le liquide qui surnage soit limpide.

Remarque : Durant l'opération, on veillera à ce que le niveau de solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant.

2.2. Remplissage par voie sèche.

- A l'aide d'un entonnoir, on remplit la colonne au deux tiers par le moins polaire des deux solvants.
- l'adsorbant en poudre est ajouté ensuite, en portions successives dans la colonne
- On tapote les parois de la colonne pour obtenir un tassement maximal.
- Quand la première portion forme une couche d'environ 2 cm, on ouvre le robinet pour faire couler lentement le solvant.
- On termine comme précédemment.

3. Dépôt du mélange à séparer.

L'échantillon liquide est déposé tel quel, tandis que l'échantillon solide est dissout dans un minimum du moins polaire des deux solvants.

Avant de réaliser le dépôt, on ajuste d'abord le niveau du solvant pour qu'il soit juste au-dessus de la surface supérieure de l'adsorbant. Ensuite, robinet fermé, à l'aide d'une pipette pasteur on coule l'échantillon au sommet de la colonne en essayant de le distribuer de la façon la plus homogène possible sur les parois de la colonne et sans la déformer. On ouvre le robinet un petit instant pour que l'échantillon pénètre dans la colonne et soit adsorbé en une zone cylindrique de faible épaisseur au sommet de la colonne.

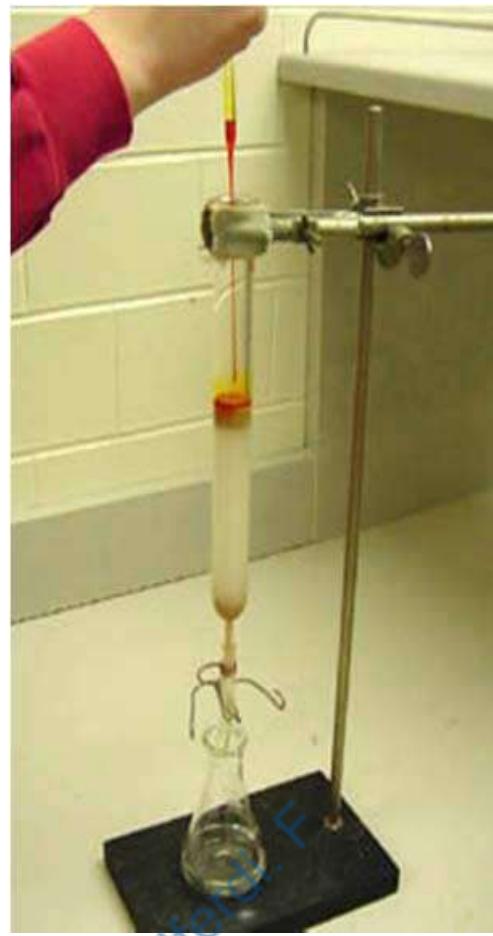


Figure I.11: colonne chromatographique

4. Alimentation de la colonne en éluant.

La colonne peut être alimentée en continu à l'aide d'une ampoule à décanter ou bien en ajoutant manuellement l'éluant. Le débit de l'alimentation est réglé de façon qu'il soit le même que celui de l'écoulement au bas de la colonne. Il ne faut jamais attendre que la colonne soit presque à sec pour la réalimenter en éluant, parce qu'il ya un risque de fissures apparaissant dans la colonne et l'élution se transformeraient en simple ruissellement. L'adsorbant devra toujours être surmonté d'au moins 2 cm de l'éluant.

5. Récupération et analyse des fractions.

Les fractions sont récupérées dans des tubes numérotés, puis analysées par CCM (Figure I.12). Les fractions de même composition seront rassemblées, puis concentrées à l'évaporateur rotatif.

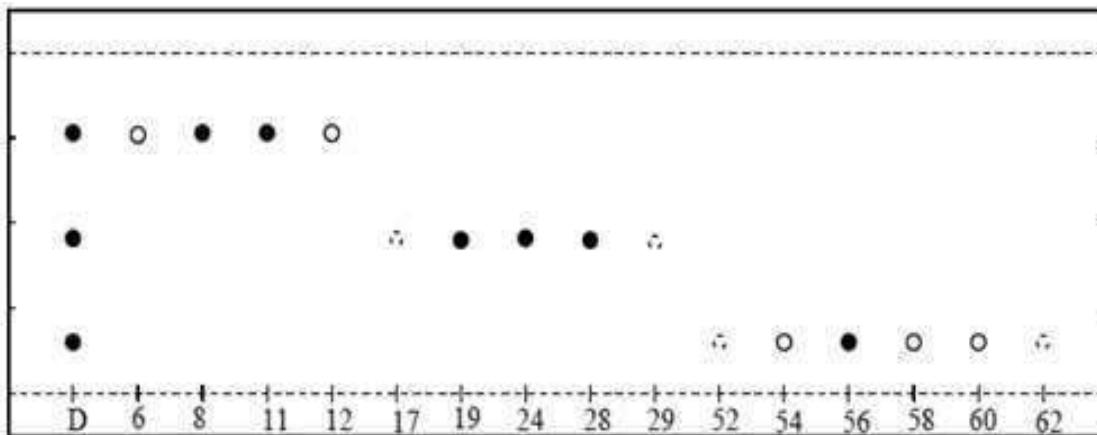


Figure I.12: analyse des fractions par CCM

Les paramètres influençant la séparation sont :

- Le diamètre et la hauteur de la colonne
- La quantité de la phase stationnaire et sa granulométrie
- Le débit de l'éluant et sa polarité

III. 3. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

III. 3. 1. Introduction

La chromatographie liquide de haute performance (HPLC) est devenue une méthode de séparation analytique très polyvalente et puissante au cours des années. C'est une forme avancée de la chromatographie liquide qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier. Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en biochimie, ainsi qu'en chimie analytique. A l'origine le P de H.P.L.C correspondait au mot Pression, la grande efficacité de la technique fait que le P désigne actuellement le mot Performance.

La HPLC a le même principe fondamental que la chromatographie. La seule différence est que la vitesse et la sensibilité de la HPLC est beaucoup plus élevée à cause de l'application d'une haute pression.

L'importance de pression appliquée dépend de plusieurs facteurs tels que la longueur et le diamètre de la colonne, le débit, la taille des particules pendant la phase stationnaire, et la composition de phase mobile.

III. 3. 2. Principe de la technique et appareillage

■ **Réservoir** : Un appareil de HPLC comprend un ou plusieurs réservoirs, en verre ou en acier inoxydable résistants à la corrosion et contenant chacun au moins 500 mL de solvant. L'élution peut se faire avec un seul solvant de composition constante ou à l'aide d'un mélange de deux solvants de polarités différentes en proportions variables. Le rapport des volumes des deux solvants qu'on mélange est modifié de manière continue ou discontinue, selon un programme préétabli. La programmation de solvant est destinée à améliorer l'efficacité de la séparation.

■ **Pompe** : Elle délivre en continu la phase mobile. La pompe est équipée d'un système de gradient permettant de réaliser une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

Le système de pompage doit atteindre des pressions élevées: ~200 bars (20 000kPa) ou plus. Il existe deux types de pompes:

Pompes à seringue ou à déplacement : Le solvant est poussé par un piston qui se déplace à vitesse constante dans une chambre cylindrique de type seringue, à volume constant. De fortes pressions peuvent être atteintes et la programmation d'un gradient d'élution peut se faire facilement.

Pompes alternatives : Le solvant est pompé par le mouvement de va et vient d'un piston. Environ 10-400 μ L de phase mobile sont déplacés à chaque mouvement. Les pressions atteintes peuvent être élevées (jusqu'à ~700 bars).

■ **Système d'injecteur**: L'échantillon est injecté dans la colonne par un injecteur qui est capable de traiter des volumes témoin de l'ordre de 0.1-100 mL sous des hautes pressions de jusqu'à 600 bars.

■ **Colonne**: Une colonne est un tube construit d'un matériau inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm.



Figure I.13: colonne HPLC

■ **Détecteur** : Le détecteur dans un système de HPLC est situé à l'extrémité de la colonne. Différents types de détecteurs sont employés tels que, les détecteurs de fluorescence, masse-spectrométriques, UV-spectroscopiques, et électrochimiques.

■ **Systèmes de collecte des informations** : Le signe du détecteur est reçu par les enregistreurs qui sont utilisés pour traiter, enregistrer, et reproduire des caractéristiques chromatographiques. La caractéristique est interprétée et intégrée par un ordinateur qui produit un chromatographe convivial.

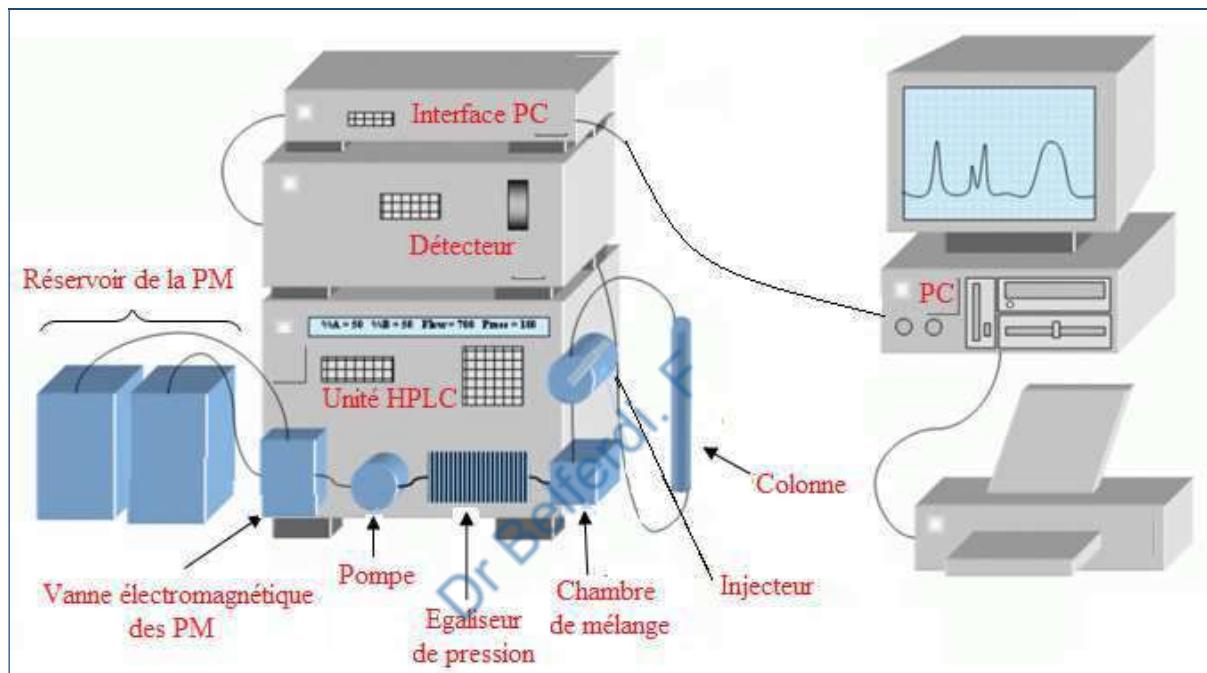


Figure I.14 : Schéma d'un appareil HPLC

■ **La phase stationnaire** : il existe deux types différents :

■ **La phase normale**

La phase normale est constituée de gel de silice (figure I. 15). Ce matériau est très polaire, ce qui nécessite d'utiliser un éluant non polaire.

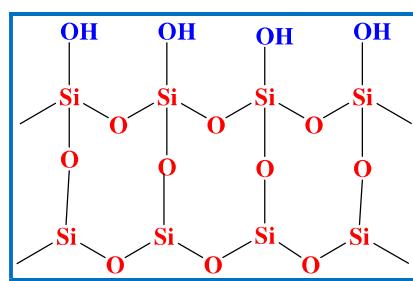


Figure I.15: structure du gel de silice

En général, les gels de silice sont stables dans une grande gamme de pH mais, ils ne supportent pas des pH trop extrêmes. Il y a des risques de dissolution pour des pH trop acides ou trop basiques, on se limite donc à la gamme $2 < \text{pH} < 12$. Des gels spéciaux existent pour une utilisation à pH extrêmes.

■ La phase inverse

La phase stationnaire est peu polaire ou apolaire, elle est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (Figure I.16).

Cette phase nécessite donc un éluant polaire. Dans ce cas, les composants polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement les solutés peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement.

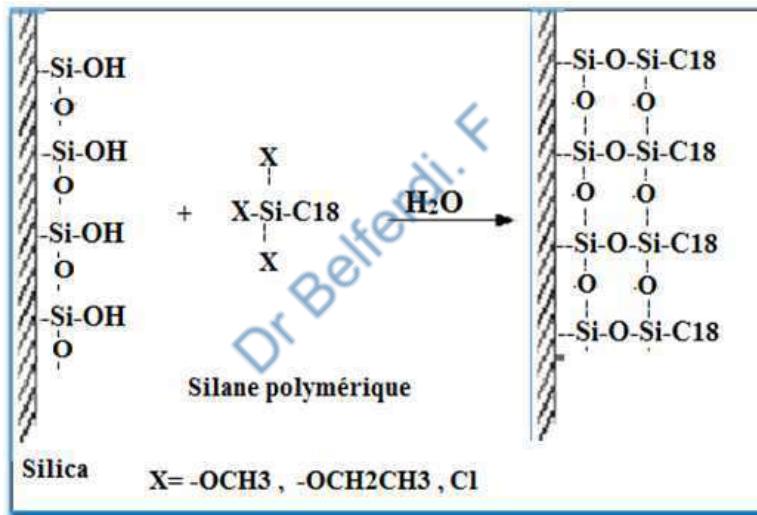


Figure I.16: silice greffée

■ La phase mobile

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale.
- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse.

III. 4. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

III. 4. 1. Introduction

Le concept de Chromatographie en phase gazeuse a été introduit par Archer Martin et Richard Synge en 1941 (Nobel Chimie en 1952 pour le développement de la chromatographie de partage liquide liquide). Elle constitue la méthode la plus puissante et la plus fine pour séparer, identifier et quantifier les composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est une chromatographie dont la phase mobile est un gaz et la séparation exige des quantités de l'ordre de mg seulement, parfois même de μg .

Il existe deux types de chromatographies en phase gazeuse (CPG) :

- **Chromatographie gaz-solide (CGS):** C'est une chromatographie d'adsorption, peu utilisée, elle est utilisée dans l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.
- **Chromatographie gaz-liquide (CGL):** basé sur le partage des constituants à séparer entre une phase gazeuse mobile inerte appelé gaz vecteur et une phase stationnaire liquide immobilisée sur un support solide par imprégnation ou par greffage. Cette dernière est très utilisée dans de nombreux domaines.

III. 4. 2. Principe de la technique et appareillage

L'échantillon (un liquide volatil) est introduit en tête de colonne à l'état de gaz à l'aide d'une microseringue qui va traverser une pastille en caoutchouc, appelée septum, pour se retrouver dans une petite chambre en amont de la colonne appelée injecteur. L'injecteur est traversé par le gaz vecteur et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Les quantités injectées peuvent varier de 0.2 à 5.0 μl . La température de la chambre d'injection est donc, par principe, toujours supérieure à celle de la colonne.

Les constituants gazeux ou volatils de l'échantillon vont ensuite être emportés par un gaz porteur (phase mobile) qui va les amener dans la phase stationnaire (la colonne) pour qu'ils y soient séparés. Plus un constituant possède d'affinité avec la phase stationnaire, plus il prendra de temps pour sortir de la colonne. A la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur.

Si l'échantillon contient, en plus des composés volatils à analyser, des composés totalement non volatilisables aux températures de l'analyse, ceux-ci vont se déposer et encrasser la tête de colonne. La colonne va perdre peu à peu ses performances, il faudra en changer ou la nettoyer).

L'appareil de la chromatographie en phase gazeuse comprend trois parties essentielles : injecteur, colonne et détecteur à travers lesquels un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer (figure I.17).

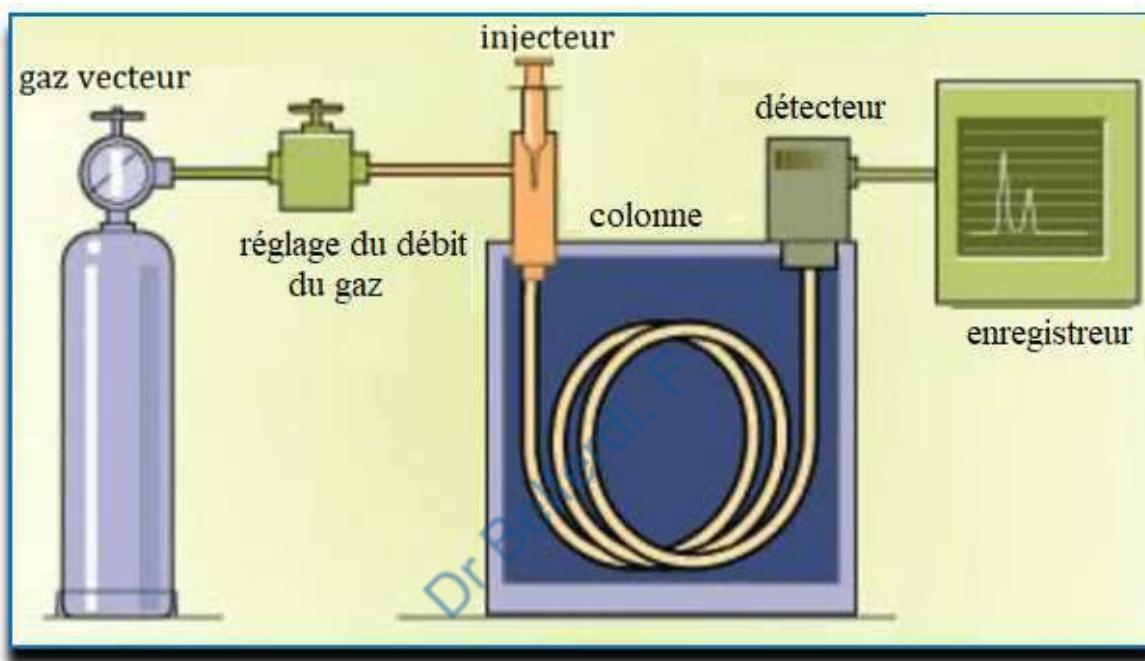


Figure I.17 : Schéma d'un appareil de chromatographie gaz

III. 4. 2. 1. Phase mobile (ou gaz vecteur)

L'élution est assurée par un flux de gaz inerte appelé gaz vecteur ou porteur. Ce dernier doit être pur, inerte (il ne doit pas réagir avec les constituants du mélange à séparer) et le moins miscible possible avec la phase stationnaire.

L'hélium est le gaz porteur le plus courant, bien que l'on utilise aussi l'argon, l'azote et l'hydrogène. Le choix du gaz vecteur est conditionné par l'efficacité de la séparation et la sensibilité du détecteur.

III. 4. 2. 2. Injecteur

Son rôle est d'introduire un liquide qui doit être vaporisé instantanément avant d'être transféré dans la colonne. Sa température doit être supérieure d'environ 20°C à la température du produit le moins volatil.

III. 4. 2. 3. Colonne

La colonne est l'organe principal, elle est placée dans un four pour maintenir une température suffisante afin de garder les solutés en phase gazeuse pendant l'analyse.

Elle est constituée d'un tube généralement métallique de diamètre intérieur de l'ordre du millimètre. Ce tube contient la phase stationnaire composée d'un liquide adsorbant fixé sur un solide inerte. On distingue les colonnes remplies (à garnissage), les colonnes capillaires et les colonnes semi-capillaires (figure 18-19)

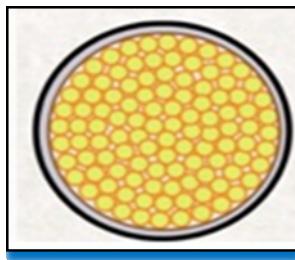


Figure I.18 : colonnes remplies

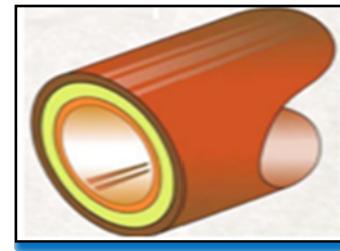


Figure I.19 colonne capillaire

• Colonne remplie (à garnissage):

Au début des années 50, toutes les analyses chromatographiques s'effectuaient sur des colonnes remplies. Aujourd'hui, les colonnes remplies sont en voie d'abandon au profit des colonnes capillaires beaucoup plus performantes. Les colonnes remplies sont des tubes en verre, en métal (acier inoxydable, cuivre ou aluminium) de 1 à 3 mètres de longueur et de 2 à 4 mm de diamètre intérieur. Les colonnes remplies sont enroulées en spirales d'environ 15 cm de diamètre. Ces colonnes supportent des débits de gaz vecteur variant de 10 à 40 ml min⁻¹. Chaque colonne est remplie du support granuleux désiré :

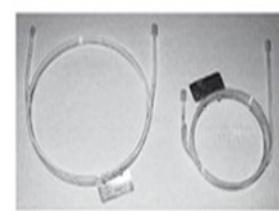
- en CPG d'adsorption, on utilise la silice.
- en CPG liquide on utilise le polyéthylène glycol.



Colonne en Cuivre (2m x 6,4 mm)



Colonne en Aluminium (6m x 1cm)



Colonne en Verre (2m x 0,25)

Figure I.20: colonnes à remplissage

● Colonne capillaire (ou colonne tubulaire ouverte)

Les colonnes capillaires sont, comme leur nom l'indique, des colonnes de très faible diamètre interne qui varie de 0,1 à 0,35 mm et de longueur de 15 à 100 m (Figure I.21). Elles permettent des séparations sur des quantités très faibles d'échantillon (inférieur à $1\mu\text{g}$).

Elles se présentent sous forme de tubes vides (enroulement spiral) à l'intérieur desquels la phase stationnaire est déposée sur la paroi interne sous forme d'un film régulier.

Les colonnes capillaires sont préparées à partir de la silice fondu très pure. Leurs parois sont renforcées par une gaine extérieure en polyimide (polymère mécaniquement et chimiquement protecteur $T_{\text{max}} = 370^{\circ}\text{C}$).

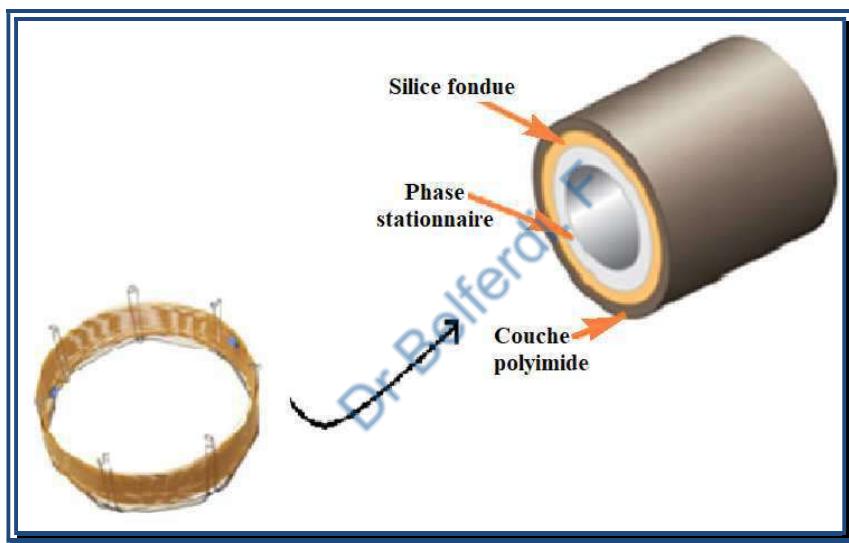


Figure I.21: colonne capillaire

● Les colonnes semi-capillaires

Ces colonnes semi-capillaires sont apparues plus récemment (vers 1983). Elles sont l'intermédiaire entre la colonne remplie et la colonne capillaire. Elles sont constituées d'un tube de 0,53 mm de diamètre interne et de 5 à 50 m de longueur. Les colonnes-semi capillaires sont préparées suivant la même technologie que les colonnes capillaires avec un diamètre intérieur plus élevé.

La résolution de ces colonnes est plus faible que celle des colonnes capillaires (plus le diamètre est petit meilleure est la résolution) mais elle est nettement supérieure à celle d'une colonne remplie.

III. 4. 2. 4. Four

La colonne est placée dans un four qui permet une programmation de température ajustable de 20°C (-100°C pour certains systèmes) à 450°C et qui est également équipé d'un système de refroidissement rapide.

Dans certaines analyses on travaille en technique isotherme : la température du four (et donc de la colonne) est la même pendant toute l'analyse. Pour des analyses complexes, pour des échantillons comportant des analytes aux températures d'ébullition très différentes, il n'est pas possible d'obtenir une séparation convenable en technique isotherme, on travaille alors en gradient de température.

III. 4. 2. 4. 1. Programmation de la température en CPG

Les températures utilisables en pratique dépendent des domaines de stabilité en température de la colonne utilisée, et de ceux des composés analysés. Plus la température du four est élevée, plus les analytes se déplacent rapidement dans la colonne, mais moins ils interagissent avec la phase stationnaire, et donc moins séparés. Plus la température du four est basse, meilleure est la séparation des analytes mais plus longue est l'analyse.

Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré. D'une manière générale, une méthode isotherme tend à donner des pics larges pour les espèces les plus retenues, et donc une mauvaise séparation. Ce phénomène est dû à la diffusion c'est-à-dire plus une espèce chimique circule longuement dans la colonne, plus elle a le temps de diffuser, élargissant ainsi le pic, et donc diminuant la hauteur des pics.

Un exemple sur la différence entre une séparation isotherme, et en gradient de température est illustré dans la **figure I.22**.

La figure (I.22) reproduit trois chromatogrammes d'un même échantillon réalisés dans des conditions différentes :

- Chromatogramme (a) avec une méthode isotherme à 45°C : les produits légers sont séparés. Par contre les produits lourds (à haut point d'ébullition) traînent sur la colonne, ils apparaissent sous forme de pics très larges et leur séparation est trop longue.
- Chromatogramme (b) avec une méthode isotherme à 145°C : les produits légers sont élués ensemble (T trop élevée) et ne sont pas séparés, les produits lourds ont des pics larges.
- Chromatogramme (c): avec une méthode utilisant un gradient de température de 30 °C à 180 °C sur 30 minutes : les pics sont bien résolus, également espacés.

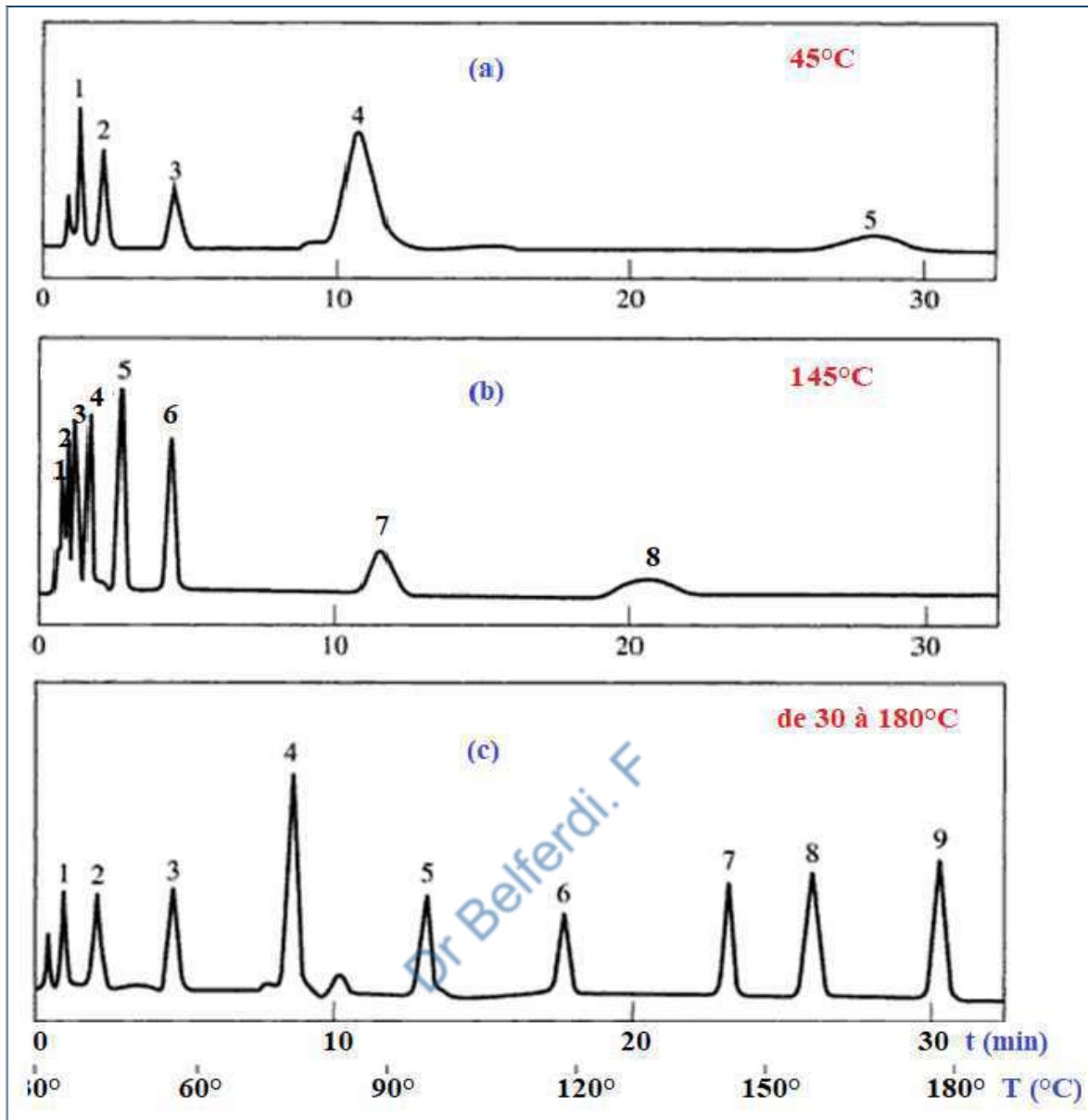


Figure I.22 : effet de la température sur la séparation dans la CPG

III. 4. 2. 5. DéTECTEUR

Il permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne. On peut disposer :

- D'un spectromètre de masse : c'est l'un des détecteurs les plus puissants pour la chromatographie gazeuse. On appelle GC-MS (Gaz Chromatography-Mass Spectroscopy) la combinaison de la chromatographie gazeuse et de la spectrométrie de masse.
- D'un détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) : c'est le détecteur le plus répandu aux débuts de la chromatographie en phase gazeuse mais, il est très peu utilisé de nos jours.

- D'un détecteur à ionisation de flamme (FID) : c'est le plus utilisé en CPG.
- Des détecteurs spécifiques : comme le détecteur thermo-ionique spécifique des composés azotés et phosphorés, celui à capture d'électrons (DCE) particulièrement sensible aux composés halogénés, celui à photométrie de flamme spécifique des composés contenant du soufre et du phosphore et le détecteur à photoionisation (PID) pour des composés aromatiques.

III. 4. 2. 6. Phase stationnaire

Pour les colonnes remplies, la technique d'imprégnation, de mise en œuvre très simple, permet de choisir de nombreux composés organiques peu volatils à usage de phases stationnaires mais, pour les colonnes capillaires, les contraintes de fabrication imposent un choix beaucoup plus limité. Les phases actuelles correspondent à deux principaux types de composés : les *polysiloxanes* et les *polyéthylèneglycols*, chaque catégorie pouvant faire l'objet de modifications structurales mineures.

- **Polysiloxanes** : Les polysiloxanes (connus sous le nom d'huiles et gommes silicones) correspondent à la répétition d'un motif de base comportant deux chaînes carbonées par atome de silicium (figure I.23). Grâce à leur gamme de température très étendue (-50°C à 325°C), ce sont, pour les colonnes capillaires, les phases les plus utilisées.

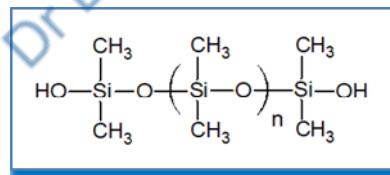


Figure I.23: structure des polysiloxanes

- **Polyéthylèneglycols (PEG)** : Polyéthylèneglycols sont des polyéthers linéaires de masse molaire inférieure à 20 000 g·mol⁻¹ fabriqués à partir de monomères d'éthylène glycol, comme exemple la **Carbowax®** est une colonne capillaire comportant un film polaire de polyéthylène glycol greffé en surface, film qui constitue la phase stationnaire.

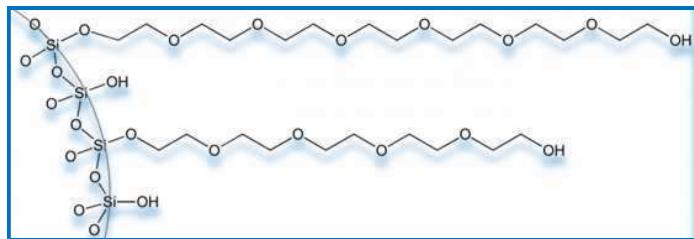


Figure I.24 : Illustration des phases stationnaires polaire Carbowax®