

3.Chromatographie sur couche mince

3.1.Définition

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. La figure 2.1 représente les principaux éléments d'une séparation CCM.

3.2. Appareillage

La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre de forme variable ; fermé par un couvercle étanche.

La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixé sur une plaque de verre ou une feuille de matière plastique ou d'aluminium à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté, l'amidon ou polymère organique.

L'échantillon : environ 1 μ l de solution diluée (2 à 5% de mélange à analyser) déposé en un point repère au-dessus de la surface de l'éluant.

L'éluant : un solvant pur ou un mélange, il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

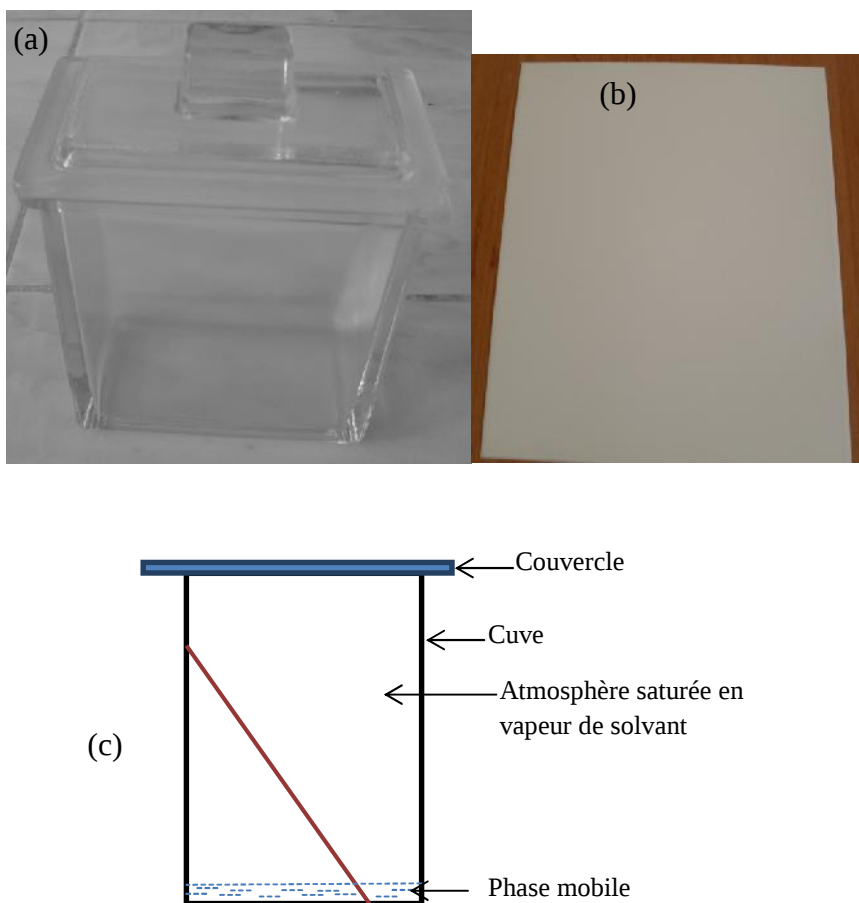


Fig.3.1 (a) Cuve chromatographique (b) Plaque CCM
(c) Schéma d'un montage CCM

3.3. Adsorbants

Les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine et la cellulose. Ils sont utilisés dans une granulométrie plus grande en chromatographie sur colonne. La taille des grains, leur surface spécifique, le volume des pores, leur diamètre et la répartition granulométrique définissent les propriétés des matériaux utilisés. Pour la nano-CCM, la taille des particules est de l'ordre de $4\ \mu\text{m}$ et celle des pores de $6\ \text{nm}$.

3.4.L'éluant

L'éluant peut être composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants ; il ne doit pas être ni trop polaire (entraînant les composants) ni trop apolaire (empêchant leur migration). Les solvants sont caractérisés par leur différence de polarité et leur non miscibilité.

A l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée de l'autre d'environ 1 cm. L'éluant qui aura entraîné le soluté à une distance proche de la moitié de la plaque sera considéré comme bon éluant.

Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'éluant et le soluté.

✚ **La solubilité** : on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.

✚ **La polarité** de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre

3.5. Dépôt de l'échantillon

De faible quantité de l'échantillon dissous dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant. On trace sur la plaque à 1 cm du bord inférieur un très fin trait au crayon de papier qui servira à repérer les dépôts ; on veillera surtout à ne pas abîmer la surface de la plaque. L'échantillon est déposé ensuite à l'aide de micropipette ou de tube capillaire en un point sur le trait. Les produits non volatils sont aisément analysables ; les composants de l'échantillon sont volatils : aldéhydes, cétones aliphatiques ou aromatiques, acides monocarboxyliques, amines primaires ou secondaires ; nécessaire de les chromatographies sous forme de sels.

3.6. Développement de la plaque

La plaque préparée est introduite en position verticale dans la cuve et l'éluant qui enrecouvre le fond monte par capillarité, entraînant à des vitesses différentes les

constituants à séparer. Lorsque le niveau atteint par le solvant est d'environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve.

On peut utiliser une chromatographie bidimensionnelle dans le cas où le mélange contient des solutés de polarités voisines : sur le même support, on réalise une première chromatographie à l'aide d'un système de solvants, puis une deuxième à l'aide d'un second système de solvants, dans une direction perpendiculaire à la première.

3.7. Révélation

Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes :

- ✚ A l'œil nu : si le produit est coloré
- ✚ Radiation UV : en exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés apparaissent sous formes de tache brillantes.
- ✚ Fluorescence: si un indicateur de fluorescence est incorporé à l'adsorbant ; la plaque entière devient fluorescente lorsqu'elle est soumise à radiation UV. Les composés sont révélés sous forme de taches sombres.
- ✚ Iode : l'iode réagit avec un grand nombre de composé organique en formant des complexes jaunes. La révélation est réalisée en mettant la plaque, préalablement séchée en présence de quelques cristaux d'iode dans un récipient; fermé ensuite pour saturer de vapeur.
- ✚ Atomisation : elle consiste à pulvériser un réactif sur la plaque ; ce qui entraîne une destruction ou une altération permanente des composés.

3.8. Paramètre de séparation

Chaque substance est caractérisée par sa mobilité appelée rapport frontal (Fig. 2.3).

Le rapport frontal ou rétention frontale (R_f) de chaque composé est défini par le rapport :

$$R_f = x/y = v \quad e \quad 0 e 1$$

x : distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache)

y : distance parcourue par le front de solvant

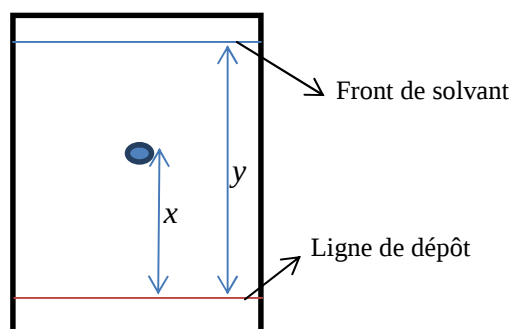


Fig.2.3. Plaque CCM : calcul du rapport frontal

Le R_f d'une substance est une constante et constitue une des caractéristiques physiques. On peut donc se servir de cette valeur pour identifier une substance inconnue. Lorsque la polarité de l'éluant augmente, le R_f augmente.

3.9. Efficacité d'une plaque CCM

L'efficacité N d'une plaque CCM et la hauteur H de plateau théorique pour un composé est donné par les relations :

$$N = 16 \frac{x^2}{w^2} \text{ et } H = \frac{x}{N}$$

La résolution est exprimée par la relation: $R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_2 + w_1}$

w est le diamètre de spot

Le facteur de rétention k' d'un composé est relié aux distances de migration sur la plaque.

$$k' = \frac{1}{R_f} - 1$$

Applications

La CCM présente plusieurs applications ; elle permet le contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique, le suivi de la réaction chimique ou d'un fractionnement chromatographique sur colonne et la recherche du meilleur solvant, avant d'entamer une séparation sur colonne classique. Elle permet également la purification de petites quantités de produit (jusqu'à 100 mg). La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant.

Le succès de ce mode de chromatographie est dû notamment à la facilité de sa mise en œuvre et à la possibilité de son emploi dans le domaine analytique que dans le domaine préparatif.

Exercices

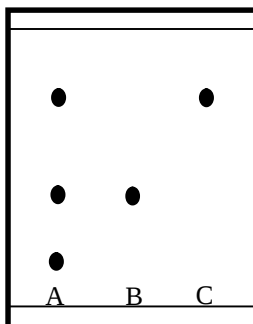
Exercice 3.1

Un échantillon contenant deux composés A et B est séparé par CCM. Au bout de 15 min de développement, le front du solvant est à 8,3cm du départ, le composé A à 7,5cm et le composé B à 2,3cm. Calculer le R_f des deux composés.

Exercice 3.2

On réalise la chromatographie de trois encres. Une encre noire, notée A, une encre verte, notée B et une encre bleue, notée C. Le chromatogramme obtenu est donné ci-dessous.

1. En analysant le chromatogramme que pouvez-vous dire sur les encres testées?
2. Déterminer le rapport frontal de la tache correspondant à l'encre C.



Exercice 3.3

Un échantillon contient deux composés *A* et *B* séparé par CCM sur de la silice. Après migration, la révélation conduit à deux taches. La migration du front de solvant dans cette expérience est de 6 cm. Calculer :

- Calculer R_f , N et H pour chacun des composés.
- Calculer le facteur de résolution entre les deux composés *A* et *B*.

Sachant que : $x_A = 31$ mm et $w_A = 1,5$ mm

$x_B = 26$ mm et $w_B = 2,2$ mm

Exercice 3.4

On a réalisé la chromatographie de deux échantillons et d'une référence. L'exploitation du chromatogramme a fourni les résultats suivants : - Front du solvant $H = 8,0$ cm - échantillon *A* : deux taches situées à 3,0 cm et 4,0 cm de la ligne de base - échantillon *B* une tache située à 5,0 cm de la ligne de base - référence le menthol *M* : $R_f = 0,5$

- La chromatographie a-t-elle mis en évidence des espèces chimiques pures
- Les échantillons *A* et *B* renferme-t-il du menthol ?

Chapitre IV

Chromatographie en phase gazeuse

I. Définition

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation applicable aux composés gazeux ou susceptible d'être volatilisé par élévation de température sans décomposition (dont la masse moléculaire $MM < 300$) ; les constituants peuvent différer par leur nature et leur volatilité. La séparation exige des quantités de l'ordre de mg seulement ; parfois même de μg .

On distingue selon la phase stationnaire:

- 🚦 Chromatographie de partage : La chromatographie gaz-liquide : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.
- 🚦 Chromatographie d'adsorption : La chromatographie gaz-solide : la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.

II. Principe de la technique et appareillage

En CPG la phase mobile est un gaz, ce fluide traverse une colonne renfermant des granulés poreux qui constitue la phase stationnaire. Lorsque un échantillon à analyser est injecté et vaporisé ; ces constituants sont entraînés à des vitesses inégales par la phase mobile, à la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur. L'appareillage employé pour effectuer la séparation est un chromatographe dont la figure 1 présente schématiquement les principaux éléments.

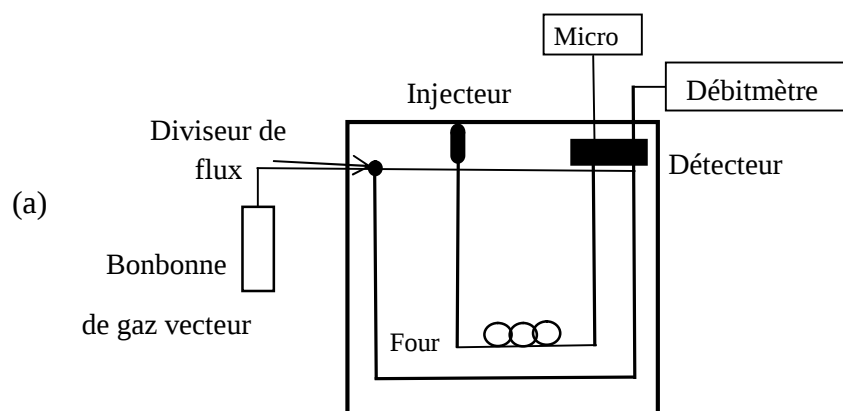


Fig.1 (a)et (b) schéma et photo d'un appareil de chromatographie gaz

II.1. Gaz vecteur

L'élution est assurée par un flux de gaz inerte appelé gaz vecteur ou porteur (phase mobile). Le gaz vecteur 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.

✚ Catharomètre : N_2 , H_2 , He

✚ Capture d'électron : N_2 ou H_2

✚ ionisation de flamme : N_2

Il n'y a pas d'interaction entre le soluté et la phase mobile en CPG.

II.2. Injecteur

Le système d'injection permet l'introduction de l'échantillon dans le chromatographe, par l'intermédiaire d'une micro-seringue dont la capacité varie habituellement de 1 à 10 μ L. Le système d'injection joue plusieurs rôles, que l'échantillon se trouve sous forme solide, liquide ou gazeux:

✚ Rôle d'interface qui permet d'introduire l'échantillon dans le chromatographe

✚ Rôle de système de vaporisation (dans le cas d'un échantillon liquide ou solide)

✚ Rôle d'organe de transfert dans la colonne chromatographique.

Il y a plusieurs modes d'injections

1. *Injection par vaporisation directe*

L'introduction du mélange se fait par l'intermédiaire d'une microseringue dont le volume varie généralement de 1 à 10 μ L et dont l'aiguille a un diamètre de l'ordre de 0,15 mm à travers un diaphragme, ou septum, en élastomère dans une chambre à vaporisation instantanée située au sommet de la colonne. La chambre d'injection est habituellement

maintenue à environ 50°C au-dessus du point d'ébullition du constituant le moins volatil de l'échantillon. Ce système est conçu pour les colonnes remplies.

2. Injection « split/splitless »

Les systèmes d'injection pour colonnes capillaires sont:

-  les diviseurs d'entrée ou splitter (split)
-  le splitless

Il s'agit d'injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, avec ou sans division (encore appelés split ou splitless).

En mode split, le gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation ; une vanne de fuite sépare le courant gazeux en deux parties dont la plus petite est la seule à pénétrer dans la colonne. Seulement 1% de l'échantillon injecté passe réellement sur la colonne. L'autre partie (99%) s'échappe par un système de fuite. Ce mode est utilisé dans le cas des colonnes capillaires à faible débit.

L'inconvénient de ce mode d'injection est l'évaporation sélective des composés les plus volatils avec modification de la composition réelle de l'échantillon injecté.

Le mode splitless la solution injectée est volatilisé puis entraîné dans les premières spires de la colonne capillaire où elle se condense. L'injecteur est ensuite balayé par le gaz vecteur qui élimine l'excès de solvant. Ce procédé est réservé aux échantillons très dilués.

II.3. Four

Le four est une enceinte thermostatée dans laquelle se trouve la colonne possédant un système de ventilation. Au lieu de maintenir la température constante on peut l'astreindre à suivre une loi de variation donnée, généralement linéaire, pour obtenir une chromatographie à température programmée.

II.4. Colonne

On distingue trois types de colonnes.

a) Colonne remplie (à garnissage)

Existant depuis les débuts de la CPG, elles sont faites avec des tubes spiralés le plus souvent en acier ou plus rarement en verre, de diamètre intérieur de 2 à 6 mm, ont une longueur comprise entre 1 et 3 m et sont enroulées sous forme hélicoïdale. Elles sont remplies d'un support poreux, inerte et stable à température élevée, imprégné de 5 à 20% de phase stationnaire (Fig.3 et 4).

Le support le plus utilisé est la terre de diatomées (silicates fossiles).

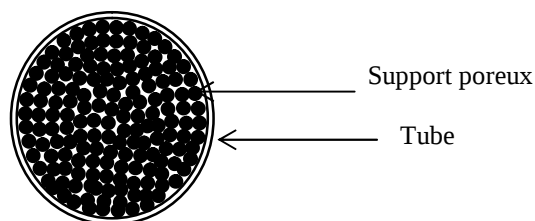


Fig.3 Colonnes remplies

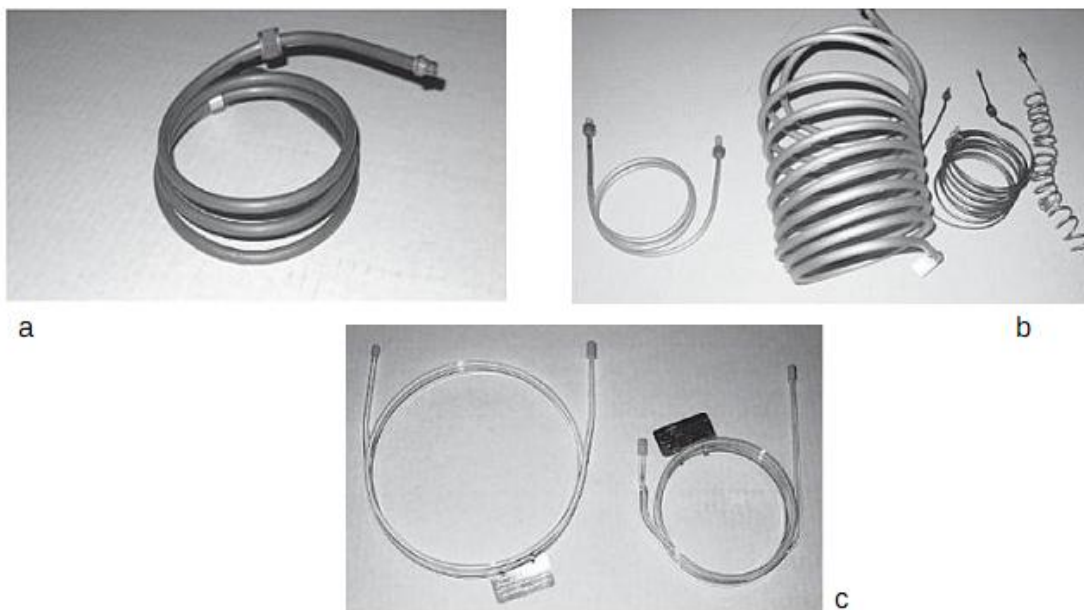


Fig.4 Photo colonnes remplies a) Cuivre 2m x 6,4 mm;
b) Aluminium 6m x 1cm c) Verre 2m x 0,25d.e

b) Colonne capillaire

Les colonnes capillaires ont un diamètre interne variant entre 0,05 et 0,35 mm et une longueur comprise entre 10 et 50 m enroulés en spirale. Elles sont revêtues d'une couche de polymère ou d'un film d'aluminium et sont enroulées sur un support métallique cylindrique léger, en forme de cage. Il n'y a alors pas de remplissage: la phase stationnaire ou l'adsorbant est déposée ou greffée sur la paroi interne de la colonne (sur la figure 5 on observe la phase stationnaire déposée sur le métal). La faible quantité de phase stationnaire permet des analyses rapides mais impose l'injection d'une quantité très faible d'échantillon $< 1\mu\text{g}$.

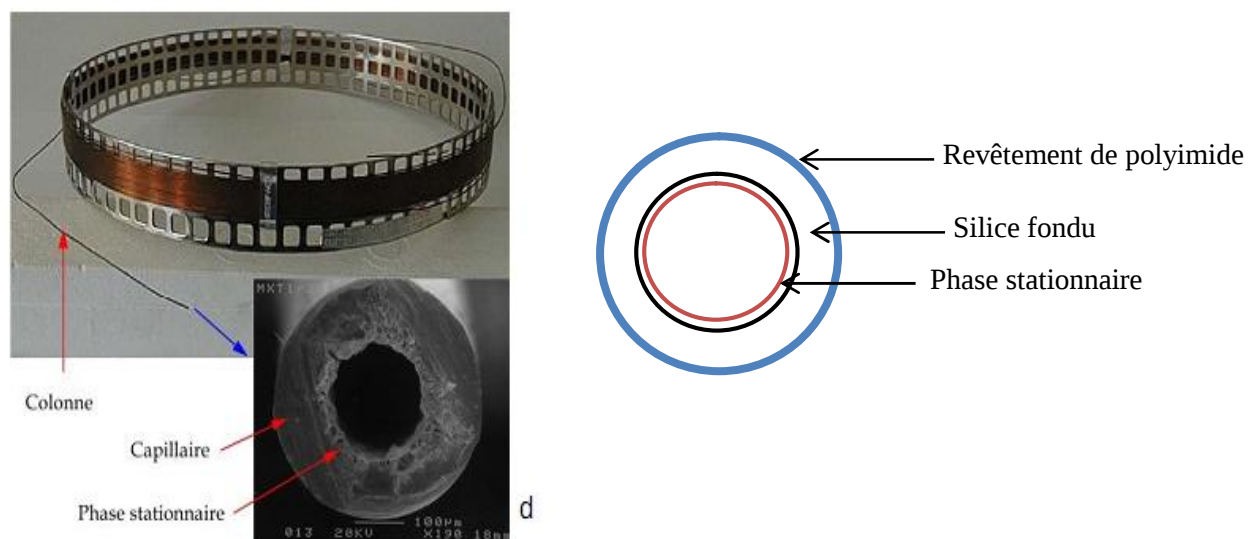


Fig.5 photo, schéma d'une colonne capillaire et microphotographie électronique à balayage de son extrémité

c) Colonne semi-capillaire

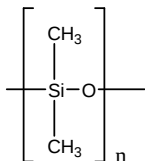
Elles sont constituées d'un tube de silice de 0,53 mm de diamètre interne et ont une longueur variant de 5 à 50 m. Elles remplacent, à l'heure actuelle, les colonnes à remplissage sur les chromatographes anciens, tout en conservant les mêmes injecteurs et détecteurs. Elle supporte l'injection d'une quantité plus grande d'échantillon qu'une colonne capillaire mais la résolution est moins bonne (plus le diamètre d'une colonne est faible, meilleure est la résolution). La colonne, enroulée sous forme hélicoïdale, est reliée à l'injecteur à l'une de ses

extrémités et au détecteur à l'autre.

II.5. Phase stationnaire

Les phases stationnaires les plus courantes, classées par ordre de polarité croissante et leurs noms commerciaux sont :

🚦 Phases apolaires 100% méthyle silicone



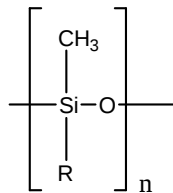
SE-30 (30 à 350°C) n=15000-35000

OV-1 (100 à 350°C) n=40000-50000

OV-101 (0 à 350°C) n= 400

Le SE-30, l'OV-1 et OV-101, diméthyle siloxanes, se différencient par leur nombre de groupement diméthylesilyle. L'OV-101 en possédant moins, a une température d'utilisation la plus basse.

🚦 Méthyl-phényl ou compositions diverses



Avec R = phényl, vinyl, cyanopropyl, cyanoéthyl

SE-52, OV-73 respectivement 5% et 5% phényl

SE-54, OV-73 5% phényl, 1% vinyl

OV-1701 7% phényl, 7% cyanopropyl

Le pourcentage donne dans chaque cas la fraction de groupements méthyle remplacés par le groupement indiqué sur le squelette polysiloxanes. Pour le SE-52 le 5%

polydiméthylphénylsiloxane a un cycle phényle lié à 5% des atomes de silicium du polymère.

Phases peu polaires

L'OV-7 et l'OV-17 méthylephényle silicone, sont de polarité moyenne

OV-7 20% phényle, 80% vinyl

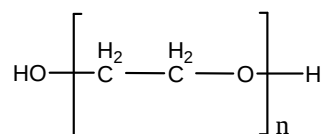
OV-17 50% phényle, 50% vinyl

Phases polaires

Ce sont des dérivés de glycols, utilisés pour séparer les molécules de forte polarité

OV-275 (50 à 225°C), 100% cyanopropyl silicone

Les polyéthylènes glycols (Carbowax 20M)



Polyéthylène glycol

Exemple

Un mélange d'heptane, propanol-1 et pentanol sont élués dans cet ordre lorsqu'on utilise une phase stationnaire polaire telle que le Carbowax. Cet ordre est inversé quand on utilise une phase stationnaire non polaire telle que le polydiméthylsiloxane.

1. Phase stationnaire polaire

Substance	Propanol-1	Pentanol	Heptane
Point d'ébullition	97	137	98
Ordre de sortie	2	3	1

2. Phase stationnaire apolaire

Substance	Propanol-1	Pentanol	Heptane
Point d'ébullition	98	126	97
Ordre de sortie	2	1	3

II.6. Les systèmes de détecteurs

- Quelques définitions

Limite de détection (LD) : est la quantité de soluté requise pour avoir un rapport signal bruit au moins égal à 3.

Limite de quantification (LQ) : est la quantité de soluté requise pour avoir un rapport signal bruit au moins égal à 10.

Domaine de linéarité (LL) : domaine dans lequel la réponse du détecteur est directement proportionnelle à la concentration.

Sensibilité : capacité d'un détecteur à répondre à de faibles variations de concentration ou de masse.

- Caractéristiques d'un détecteur idéal

Bonne sensibilité la sensibilité des détecteurs actuels sont comprises entre (10^{-8} et 10^{-15} g soluté/s).

Bonne stabilité et reproductibilité.

Réponse linéaire sur plusieurs décades de concentrations.

Domaine de température de fonctionnement compris entre la température ambiante et au moins 400°C.

Une préservation de l'intégrité de l'échantillon

II.6.1 Détecteur à conductivité thermique (DCT) ou catharomètre

Le DCT est le détecteur le plus répandu aux débuts de la chromatographie en phase gazeuse, c'est un appareil à réponse universelle, mais relativement peu sensible. Il est fondé sur une comparaison continue entre le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur pur et le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur chargé des molécules de soluté. Ces flux de chaleurs sont produits par des thermistances, parcourues par un courant continu de tension fixe, dans une enceinte thermostatée avec précision. Les thermistances sont montées en pont de Wheastone et celui-ci permet de suivre l'évolution du courant en fonction de la variation des résistances consécutive aux variations de température autour des filaments. Un galvanomètre ou un potentiomètre enregistreur suivent le courant dans le pont. Le catharomètre présente l'avantage de ne pas détruire les substances analysée. Mais son principal inconvénient provient de sa faible sensibilité (de l'ordre du microgramme).

II.6.2. Détecteur à ionisation de flamme (DIF)

C'est le détecteur le plus utilisé en CPG, il est spécifique aux composés carbonés sauf HCHO et HCOOH . La phase mobile pénètre dans un petit brûleur dont la flamme est alimentée par un mélange d' H_2 et d'air. La combustion des composés organiques élués produit des ions et des électrons qui sont collectés au moyen de deux électrodes. Le courant très faible qui en résulte est transformé en une tension qui est enregistrée, le passage du courant indique la présence d'un soluté. L'aire du pic obtenu est proportionnelle à la masse et non à la concentration. L'avantage de ce détecteur est que les variations de débit de la phase mobile ont peu d'influence sur la réponse et il présente l'inconvénient de détruire l'échantillon au cours de l'étape de combustion.

II.6.3. La spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse est 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. Un spectromètre de masse mesure le rapport masse sur charge (m/z) des ions qui ont été produits à partir de l'échantillon par une source d'ionisation qui est assez énergétique pour briser des liaisons

chimiques dans les molécules de l'échantillon et forme beaucoup de fragments ; qui sont très utiles pour identifier l'espèce moléculaire qui entre dans le spectromètre de masse à partir du spectre de fragmentation ou par comparaison avec bibliothèque de spectre (Fig.2).

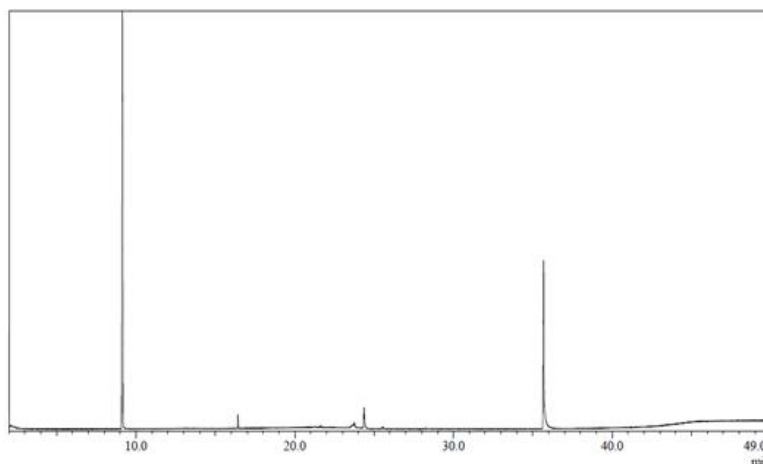


Fig.2 Chromatogramme GC-MS d'un mélange contenant plusieurs produits

II.6.4. Autres détecteurs

Il existe d'autres types de détecteurs, comme le détecteur thermoionique spécifique des composés azotés et phosphorés, celui à capture d'électrons (DCE) particulièrement sensible aux composés halogénés et celui à photométrie de flamme spécifique des composés contenant du soufre et du phosphore (excitation des éléments par de la lumière à λ caractéristiques ; détecteur qui émet respectivement à 526 nm pour P et 394 nm pour S).

II.7. Optimisation de séparation

Plusieurs facteurs influencent la séparation d'un mélange analysé par CPG :

II.7.1. La température

Généralement, les composés les plus volatils sont les plus rapidement entraînés ; du fait leur tension de vapeur plus élevée. Cependant, si la température de la colonne est trop élevée,

l'équilibre des composants ne peut s'établir dans chaque phase et les pics apparaissent presque tous en même temps. D'autre part, si la température est trop basse ; la vitesse est lente et la diffusion importante et le temps de rétention devient trop long. Lorsque l'écart entre les points d'ébullition des constituants du mélange à séparer est grand, il est souvent préférable d'augmenter la température du four.

II.7.2. Le débit du gaz vecteur

Le débit du gaz vecteur doit laisser le temps pour que les constituants du mélange puissent s'équilibrer entre les deux phases mobile et stationnaire. Si le débit est trop rapide, la séparation des pics est médiocre et s'il est trop lent, les pics perdent leur finesse par suite d'une diffusion excessive des molécules dans le gaz vecteur. La courbe de Van Deemter établie expérimentalement pour chaque colonne et chaque composé permet de définir la valeur optimale de la vitesse de la phase mobile : $u_{opt} = \sqrt{B/C}$

Quand le débit est bien réglé, on a intérêt à augmenter la température du four pour améliorer la finesse des pics.

II.7.3 La longueur de la colonne

De façon générale, on accroît l'efficacité de la séparation en augmentant la longueur de la colonne mais ceci se fait au détriment de la finesse des pics (toute augmentation se traduit par un nombre de plateaux N supérieur). De plus, la longueur des colonnes est limitée par le fait qu'une colonne trop longue exige une trop forte pression du gaz vecteur.

II.7.4. La nature de la phase stationnaire

Le liquide qui constitue la phase stationnaire est, selon les cas, un hydrocarbure ramifié tel que le squalane de polarité nulle, un polyalkylsiloxane peu polaire, un polyéther polaire ou un polyester très polaire. La dissymétrie des pics ou les temps de rétention trop élevés sont le reflet de phénomènes d'adsorption ou d'affinité trop importante des composés vis-à-vis la phase stationnaire.

II.7.5. Précaution générale

- ✚ l'échantillon à analyser doit toujours avoir subi un traitement initial (minimum) de purification : élimination de l'eau et des particules en suspension.
- ✚ la nature de la phase stationnaire qui se trouve dans le four doit être contrôlée. Ne jamais utiliser la colonne en dehors des limites de températures indiquées par le fabricant
- ✚ la seringue doit être rincée plusieurs fois avec l'échantillon avant l'injection
- ✚ l'aiguille au moment de son introduction à travers le septum de l'injecteur ne pas être courber
- ✚ le septum doit être changé régulièrement (toutes les 50 injections environ)
- ✚ le mélange doit être injecté dès que l'aiguille se trouve enfoncée.

Chapitre V

1. La chromatographie liquide haute performance

5.1. Introduction

La chromatographie liquide haute performance appelé CLHP est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier. Elle met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. Son développement très rapide, à partir de 1970, réside dans le fait qu'elle n'a pas les inconvénients de la chromatographie liquide classique ; cette dernière a toujours été peu utilisée, en raison de la lenteur de la séparation ; de l'absence de détecteur qui aurait permis de suivre facilement le développement de chromatogramme et la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

5.2. Appareillage

Un appareil CLHP (Fig.1.1) comporte différents modules: un réservoir contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur à travers lesquels un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer et un système d'acquisition de données. Il nécessite également un dispositif de dégazage. Les différents modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm).

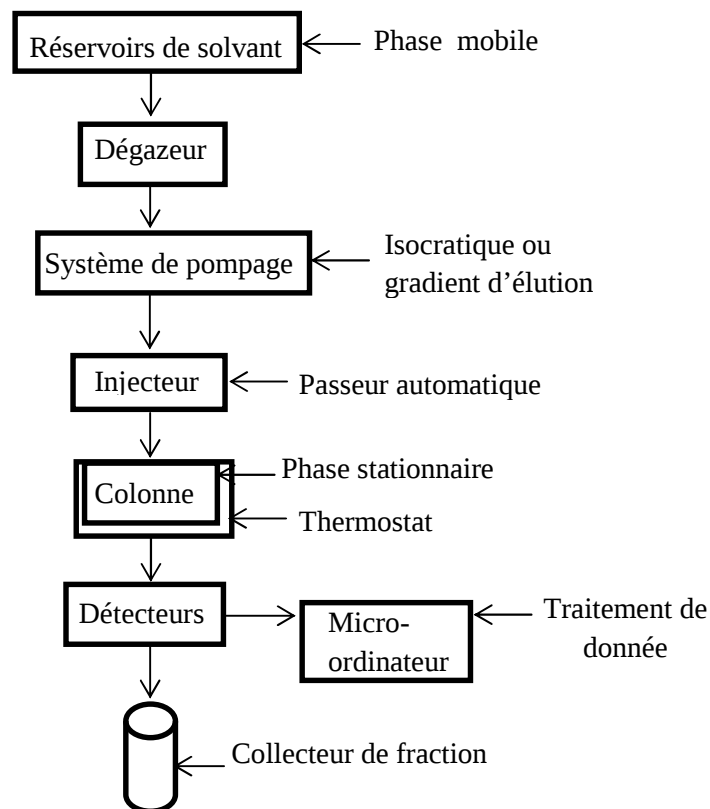


Fig.5.1 Les composants d'un chromatographe liquide à haute performance
(Appareil Dionex)

5.3. Réservoir de solvants

Pour l'éluant on emploie un vase clos pour éviter l'évaporation. Le solvant utilisé doit nécessairement :

- Maintenir la stabilité de la colonne
- Etre compatible avec le détecteur
- Solubiliser suffisamment l'échantillon et ne pas gêner sa récupération.

Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement pour CLHP. Ils doivent être dégazés et filtrés avant usage sur filtre spécial (0,45 μm). Le choix du solvant constitue habituellement la partie la plus difficile de ce type de chromatographie. Il est préférable de faire quelques essais en CCM.

5.4. Dispositif de dégazage

Durant le pompage, dans la chambre de mélange ou dans la colonne elle-même, si les solvants ne sont pas dégazés, l'air dissout dans le liquide soumis à de forte pression, forme des bulles à l'intérieur du système, c'est là un inconvénient majeur pour le fonctionnement de la plupart des détecteurs en particulier ceux qui utilisent des propriétés optiques. En règle générale, plus le liquide est polaire, plus la tendance de l'air à se dissoudre est forte. Il convient donc d'éliminer au maximum l'azote et l'oxygène qui peuvent être présents. Le dégazage de la phase mobile se fait par barbotage d'hélium, par ultrasons ou par un dégazeur.

5.5. Pompe

La pompe d'un chromatographe a pour rôle d'assurer l'écoulement de la phase mobile dans la colonne. Tout appareil CLHP comporte au moins une pompe en mode isocratique (éluant de composition fixe tout au long de l'analyse donc la phase mobile peut être préalablement préparée et disposée dans un seul réservoir) ou en gradient d'élution (éluant de composition variable). L'élution graduée lors de la séparation de mélanges complexes permet, en modifiant la composition de l'éluant, d'optimiser les facteurs de capacité et de réduire les temps d'analyse. Les pompes les plus utilisées sont les pompes de types piston avec lesquelles les débits sont constants, la pression peut atteindre environ 500 bars.

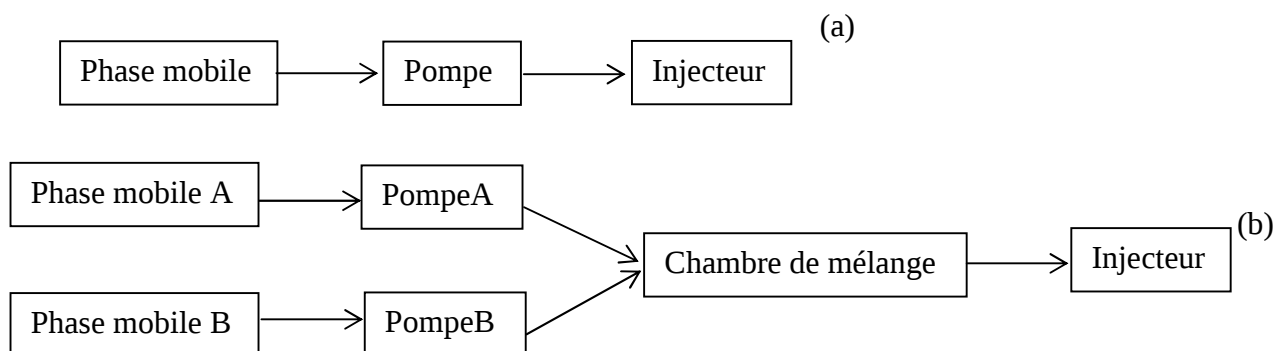
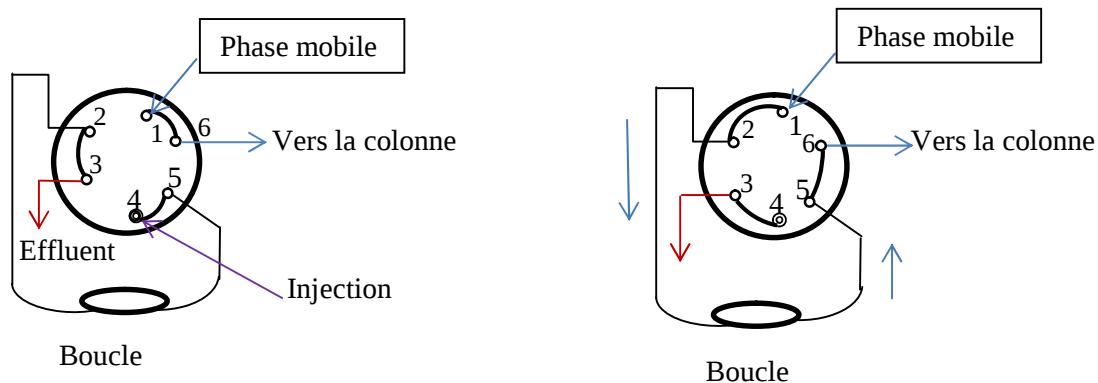


Fig.5.2 Représentation schématique d'un système de pompage

(a) mode isocratique (b) mode gradient d'élution

5.6. Injecteur

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire à l'aide d'une vanne (boucle d'échantillonnage) : on introduit d'abord l'échantillon dans une boucle de volume connu (position chargement ou Load) après rotation de la vanne de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle (position Inject), la phase mobile entraîne l'échantillon en tête de la colonne le volume injecté est constant, cela permet donc de travailler en étalonnage externe pour une analyse quantitative. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle. Aujourd'hui on utilise des injecteurs automatiques.



(a)(b)

Fig.5.3Injecteur à boucle

(a) Remplissage de la boucle

(b) Injection dans la boucle

5.7. Colonne

Les colonnes CLHP sont généralement courtes et droites en acier inoxydable se caractérise par leur géométrie (diamètre intérieur de 4 mm et une longueur de 5 à 30 cm) et par la nature des phases qu'elles contiennent (Figure 1.4). Elles doivent être capables de résister aux fortes pressions. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques mL/min. Ces colonnes ont l'avantage de la rapidité de l'analyse, consomment moins de solvant et conduisent à une meilleure résolution de l'analyse. Dans la plupart des analyses une pré-colonne ou colonne de garde qui ne diffère de la colonne analytique que par sa très faible longueur (1 à 2 cm pour une colonne de 25 cm) permet de protéger la colonne et d'en augmenter la durée de fonctionnement.



Fig.5.4 Colonne CLHP

5.7.1 Les thermostats des colonnes

La plupart des appareils commerciaux récents sont équipés de dispositifs de régulations de la température ; qui permettent le contrôle de la température ambiante jusqu'à 150°C (Fig.1.5). On obtient souvent de meilleurs chromatogrammes en maintenant la température constante à quelques dixièmes de degrés Celsius.



Fig.1.5 Colonne dans un thermostat

5.8. Détecteurs

5.8.1. Photomètre UV-Visible

Le détecteur UV-Visible mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

- ✚ Le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand
- ✚ La phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

Ce détecteur détecte seulement les changements dans le soluté donc on peut l'utiliser dans l'analyse par gradient d'élution. Le détecteur est facile à opérer et ne détériore pas l'échantillon. Il y'a plusieurs types de détecteurs :

- ✚ Détecteur à λ fixe : vapeur de Hg (254 nm)
- ✚ Détecteur à λ variable
- ✚ Détecteur à barrettes de diodes (DAD) : la cellule de mesure est éclairée par une source polychromatique ; gamme de 190 à 800 nm permettant l'enregistrement tridimensionnel absorbance-temps-longueurs d'onde. Ce type de détecteur permet de sélectionner la longueur d'onde optimale de détecteur pour chaque soluté.

5.8.2 Réfractomètre différentiel

Il mesure la variation de l'indice de réfraction entre la phase mobile contenant le soluté et la phase mobile pure correspondant à la référence. La sensibilité optimale correspond à un maximum d'écart entre les indices de réfraction des composants de l'échantillon et de la phase mobile. Un composant dont l'indice est voisin de celui de la phase mobile est alors pratiquement indétectable. Son utilisation est moins répandue que celle du détecteur à UV à cause de sa plus faible sensibilité.

5.8.3 Détecteur fluorimétrique

Il mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. L'émission de lumière est mesurée à angle droit du faisceau d'excitation. Ce procédé sert pour les composés fluorescents ou les dérivés fluorescents de certains composés. Ce mode de détection est plus sélectif et plus sensible de tous les détecteurs optiques à condition que les composés présentent une fluorescence, qu'elle soit naturelle ou obtenue par formation de dérivés.

5.8.4 Détecteur électrochimique

Cette méthode de détection ne s'adresse qu'à la détection de molécule dotée de propriétés oxydoréduction. Son principe repose sur la mesure du courant qui circule dans une cellule d'électrolyse lors de l'oxydation ou de la réduction du soluté contenu dans la phase mobile. Sur ce principe, on peut utiliser deux méthodes de mesures :

- a) Soit effectuer une électrolyse partielle à potentiel fixe sur une fraction constante de soluté et mesurer l'intensité du courant (détecteurs ampérométriques).
- b) Soit réaliser l'électrolyse totale du soluté lors de son passage dans la cellule et mesurer la quantité de courant (détecteurs coulométriques).

Les échantillons à détecter doivent pouvoir s'oxyder ou se réduire à un potentiel suffisamment faible pour ne pas provoquer l'électrolyse de la phase mobile, d'autre part la phase mobile ne doit contenir ni O₂ en solution, ni contaminant métallique, ni halogénures qui donneraient un courant résiduel et donc un bruit de fond et une dérive de la ligne de base.

5.8.5 Détecteur par spectroscopie de masse

La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS) est une technique d'analyse qui permet d'identifier clairement un composé grâce à son rapport masse molaire/charge (m/z).

5.9. Interactions moléculaire entre phase mobile et soluté

Les interactions soluté-phase mobile correspond essentiellement à l'établissement d'interactions diélectriques, de liaisons de type hydrogène ou de Van der Waals.

5.10. Force éluant et polarité

La polarité d'un échantillon et d'un solvant est la tendance de ces deux composés à interagir fortement par polarité. Les composés polaires interagissent très fortement les uns avec les autres. Pour les composés polaires :

-  Plus la phase mobile sera polaire, plus elle va entraîner les solutés
-  Plus la phase mobile sera apolaire, moins elle va entraîner les solutés

Pour les composés moins polaires :

-  Plus la phase mobile sera polaire, moins elle va entraîner les solutés

Applications

La CLHP est utilisée pour séparer et doser des espèces diverses d'analytes: inorganiques, organiques et biologiques

