

# Cours de techniques d'analyse

Chromatographie est un terme général, utilisé pour définir des méthodes de séparation basées sur la distribution d'un soluté entre deux phases, l'une étant mobile (un gaz ou un liquide), l'autre stationnaire (un solide ou un liquide).

## 1. Définition de la chromatographie (**CHROMATOGRAPHY**)

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et doser des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation.

La chromatographie a une place très importante dans la pratique du laboratoire et est utilisée couramment pour :

- ✓ Contrôler la pureté des réactifs et des produits d'une réaction.
- ✓ Suivre une réaction par analyse du milieu réactionnel.
- ✓ Isoler et purifier des produits d'une réaction.

## 2. Historique

En **1906** un botaniste d'origine russe **TSWETT**, présenta à Varsovie son premier article sur une nouvelle sorte de phénomène d'adsorption et son application à l'analyse biochimique. Il y décrivait la formation de zones colorées lors de l'éluion par l'éther de pétrole de pigments végétaux dans une colonne remplie de carbonate de calcium.

L'origine du mot chromatographie vient peut-être de cette séparation de composés colorés puisque **CHROMA** (Krwma) en grec, signifie couleur. Puis les travaux de **TSWETT** tombèrent dans l'oubli pendant une vingtaine d'années et il faudra attendre 1931 la publication de **KUHN** et **LEDERER** sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle pour assister au développement de la chromatographie en tant qu'outil analytique.

A partir de cette date, la chromatographie prit son véritable essor

- ✚ Vers 1940, **Martin** et **Synge** développent la pratique et la théorie de la chromatographie, ils obtiennent le **prix Nobel** en **1952**.
- ✚ En **1952**, mise au point de la Chromatographie en Phase Gazeuse (**CPG**).
- ✚ En **1968**, mise au point de la Chromatographie Liquide Haute Performance **CLHP** ou **HPLC** en anglais.
- ✚ En 1979, première séparation chirale par **HPLC**.

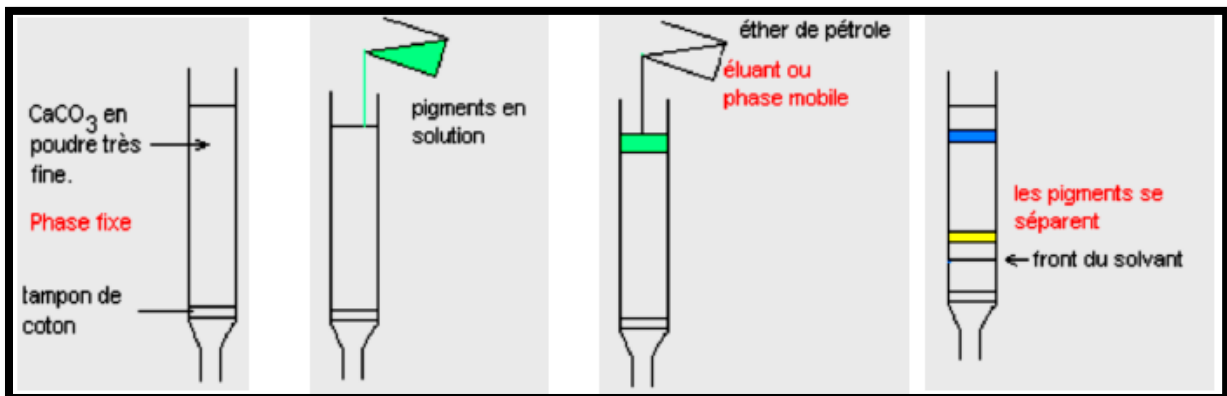


Fig 1. Représentation de l'expérience de Tswett en 1906

(Mikhail TSWETT a utilisé une colonne en verre remplie de carbonate de calcium (phase stationnaire) et l'éther de pétrole comme phase mobile pour séparer les pigments colorés de la chlorophylle.)

### 3. Principe

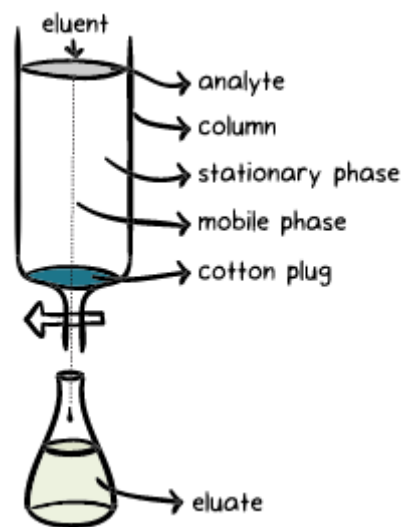
Le principe repose sur les équilibres de concentration des composés présents entre deux phases non miscibles en contact.

- Phase stationnaire : peut-être solide ou liquide, qui est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support.
- Phase mobile : peut-être un liquide ou un gaz ou encore un fluide supercritique, qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant avec elle le soluté. Le processus d'entraînement de ce soluté est appelé élution. Chaque constituant adopte une vitesse de migration qui lui est propre en fonction de sa solubilité dans la phase mobile et de son affinité pour la phase fixe qui tend à le retenir.

Finalement on obtient la séparation des constituants du mélange initial.

#### 4. Terminologie générale de la chromatographie

- Soluté (S) **solute**: toute substance, constituant d'un mélange, séparée par chromatographie.
- Phase mobile (PhM) **mobile phase**: le vecteur, liquide ou gazeux, qui déplace le soluté.
- Phase stationnaire (PhS) **stationary phase**: le produit qui, par ses affinités avec les solutés, va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace.
- Support **Support matériel** : Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire.
- Colonne chromatographique **column**: tube de diamètre et longueur variable, en verre, métal ou autre substance, à l'intérieur duquel s'opèrent les séparations chromatographiques.
- Valeurs de rétention: toutes données qui permettent de chiffrer l'action spécifique de la PhS sur le soluté, au cours de l'analyse (temps de rétention, volume de rétention...).
- Chromatogramme **chromatography**: l'ensemble des réponses successives du détecteur, au cours de l'élution des solutés hors de la colonne.
- Éluant **elution** : Un est un procédé permettant de mettre en solution (dite éluee) un composé adsorbé à l'aide d'un solvant nommé l'éluant.
- Eluant **eluent** : Solvant utilisé pour la séparation de substances adsorbées sur un support dans la chromatographie sur couche mince.
- éluat **Eluate** : C'est le mélange de soluté et de solvant sortant de la colonne.



## 5. Classification des techniques chromatographiques

La classification des chromatographies peut se faire en fonction des mécanismes de séparation. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique.

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

- ❖ Classification selon la nature physique des phases.
- ❖ Classification selon le phénomène mis en œuvre.
- ❖ Classification selon la technique mise en jeu.

### 5.1. Classification selon la nature physique des phases

Dans ce classement

#### 5.1.1. Chromatographie en phase liquide (CPL)

Si la phase mobile est un liquide, la phase stationnaire peut être soit un solide finement pulvérisé soit un liquide immobilisé sur une phase fixe, la combinaison de ces différents possibilités permet de distinguer deux types de chromatographie.

- Chromatographie liquide-liquide (CLL).
- Chromatographie liquide-solide (CLS).

#### 5.1.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Si la phase mobile est un gaz (vecteur), la phase stationnaire peut être soit un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz à bas points d'ébullition, soit un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage, la combinaison de ces différentes possibilités permet de distinguer deux types de chromatographie :

- Chromatographie gaz-liquide (CGL)
- Chromatographie gaz-solide (CGS).

### **5.1.3. La chromatographie supercritique (SFC)**

La SFC représente un cas intermédiaire entre CPL et CPG, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

## **5.2. Classification selon les phénomènes chromatographiques**

Les phénomènes qui donnent lieu à la séparation dépendent de la nature des phases stationnaires, et on considère :

### **5.2.1. La chromatographie d'adsorption**

La phase stationnaire est un solide finement divisé sur lequel les molécules adhèrent par un double effet de physisorption et chimisorption. Le paramètre physico-chimique concerné est le coefficient d'adsorption.

### **5.2.2. La chromatographie de partage**

La phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide inerte : soit imprégnée dans un solide poreux (risques de lessivage), soit greffée sur le solide (phase greffée). La séparation repose sur le coefficient de partage du soluté dans les deux phases liquides.

### **5.2.3. La chromatographie par échange d'ions ou chromatographie ionique**

La phase stationnaire est formée de macromolécules (résines) portant des groupes fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de contre ions avec des ions de même signe de l'échantillon. La séparation repose sur les coefficients de distribution ioniques.

### **5.2.4. La chromatographie d'exclusion, ou perméation de gel, ou tamisage moléculaire**

La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel et sont donc retardés.

### **5.2.5. La chromatographie d'affinité**

La phase stationnaire est ici un substrat inerte sur lequel est greffé un "effecteur" qui présente une affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

## **5.3. Classification d'après le procédé utilisé**

Selon l'immobilisation de la phase stationnaire on distingue :

### 5.3.1. La chromatographie sur colonne (CC)

La phase stationnaire est contenue dans une colonne cylindrique en verre ou en métal.

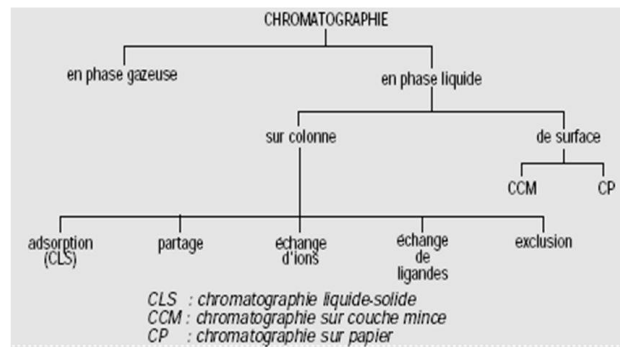
### 5.3.2. La chromatographie sur papier (CP)

Une surface de cellulose considérée comme support maintient par imbibition une phase stationnaire liquide.

### 5.3.3. La chromatographie sur couche mince (CCM)

La phase stationnaire est dans ce cas retenue sur une surface plane (verre, matière plastique ou feuille d'aluminium) qui est recouverte d'une mince couche de 0.2 à 0.3 mm d'épaisseur de gel de silice, cellulose, d'alumine ou même de grains de résines échangeuses d'ions.

### Classification des méthodes chromatographiques



## 5.4. Choix de la technique

Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes.

Le choix de l'une ou l'autre dépend :

- **De la nature du soluté**

Gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...

- **Du but de l'analyse**

Identification de composants d'un mélange, nécessité ou non de "coupler" la chromatographie avec une méthode spectroscopique ou avec la spectrométrie de masse (CPG/SM ou GC/MS), contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages (quantification)...

## 6. Théorie De Base - Grandeurs Fondamentales

### 6.1. Le chromatogramme

Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne. La ligne de base correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué (**Figure 1**).

Ce graphique est utilisé à la fois en analyse qualitative et quantitative.

- **Analyse qualitative** : permet l'identification des composés par la position du pic.
- **Analyse quantitative** : évaluer la concentration ou la masse d'un composé en utilisant l'aire des pics.

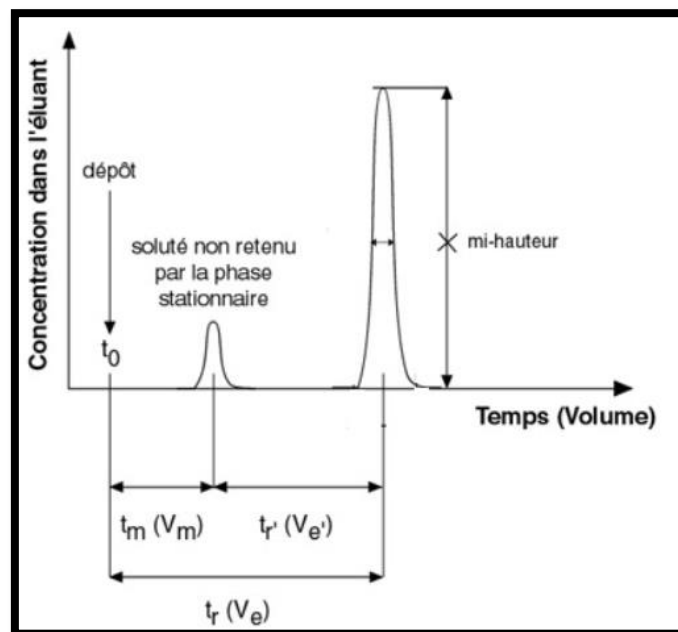


Diagramme montrant les caractéristiques d'un chromatogramme

Un pic chromatographique est caractérisé par :

✓ **Temps mort**

Le temps mort ( $t_m$ ) est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire de la colonne, pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne (ou temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne).

Le temps  $t_0$  est le temps du début de l'injection.

✓ **Le temps de rétention**



Le temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne.

Un constituant est caractérisé par son temps de rétention  $t_r$ , temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui déterminé au maximum du pic lui correspondant sur le chromatogramme.

Le temps de rétention est indépendant de :

- la quantité injectée,
- la nature et de l'abondance des autres constituants dans le mélange.

Par contre il dépend de :

- la masse de phase stationnaire dans la colonne,
- débit de la phase mobile,
- volume mort du chromatographe (injecteur, détecteur, canalisations..),
- la nature de la phase stationnaire.

#### ✓ Le temps de rétention corrigé ou réduit $t_r'$

Temps mis par les molécules du soluté pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne représentant le temps passé dans la phase stationnaire.

Il est obtenu par différence entre le temps de rétention réel et le temps mort. Il est lié uniquement au phénomène de rétention proprement dit.  $t_r' = t_r - t_m$

#### ✓ Le volume de rétention

Le volume de rétention de chaque soluté représente le volume de la phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Ce volume correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si  $D$  est le débit alors :  $V_r = t_r \times D$

On peut également calculer le volume mort correspondant au volume de la phase mobile dans la colonne (volume interstitiel) :  $V_m = t_m \times D$

Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile

- La vitesse linéaire moyenne de progression du soluté  $v$  est égale à :

$$v = \frac{L}{t_r} \quad L : \text{longueur de la colonne}$$

La vitesse linéaire moyenne de la phase mobile  $u$  est égale à :

$$\mu = \frac{L}{t_m}$$

## 6.2. Le coefficient de distribution

En chromatographie en phase liquide, les séparations sont basées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles l'une stationnaire (particules solides imprégnées ou non d'un liquide), l'autre mobile (liquide).

Pour un système chromatographique donné, le coefficient de distribution  $K$  (ou coefficient de partage) est défini par :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

$C_s$  : concentration du soluté dans la phase stationnaire

$C_m$  : concentration du soluté dans la phase mobile.

### 6.3. Le facteur de capacité $k'$ (ou facteur de rétention)

Quand on introduit un composé dans la colonne, sa masse totale  $m_T$  se répartit en deux quantités  $m_M$  dans la phase mobile et  $m_S$  dans la phase stationnaire. Ces quantités restent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Elles dépendent de  $m_T$  et de  $K$ . Leur rapport est fixe et est appelé facteur de rétention :

$$K' = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad K' : \text{coefficient de distribution}$$

Avec  $V_S$  : volume de la phase stationnaire qui est calculé par différence entre le volume total de la colonne et le volume de la phase mobile ( $V_M$ ).

$k'$  n'est pas une constante mais varie avec les conditions opératoires (température, composition de la phase mobile...). C'est le paramètre le plus important en chromatographie pour définir le comportement d'une colonne. On évite d'avoir des valeurs de  $k'$  trop élevées pour ne pas allonger le temps d'analyse.

$k'$  peut se déterminer directement à partir du chromatogramme :

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad \text{ou} \quad K' = \frac{t'_r}{t_m}$$

Cette relation est également souvent rencontrée sous la forme :

$$t_r = t_m \times (1 + K')$$

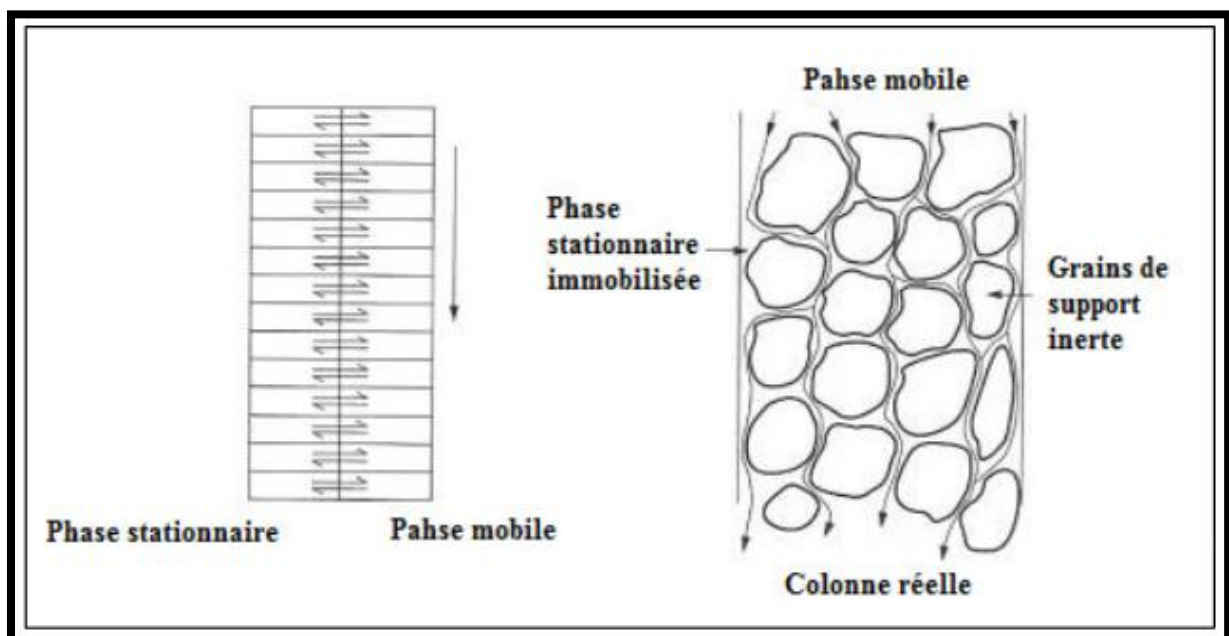
### 6.4. L'efficacité d'une colonne

#### a) Nombre de plateaux théoriques et de plateaux efficaces

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques  $N$  de la colonne.

Cette théorie est née de la recherche d'un modèle statique permettant de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique comme celui d'une colonne à distiller.

Au lieu de considérer le déplacement réel, continu de la phase mobile, on admet que celle-ci progresse par sauts successifs et se met en équilibre avec la phase stationnaire entre deux transferts, ce qui permet de découper fictivement la colonne de longueur  $L$  en  $N$  petits disques fictifs de même hauteur  $H$ , numérotés de 1 à  $n$ . Pour chacun d'eux, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration dans la phase stationnaire de ce soluté. À chaque nouvel équilibre le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire dans la colonne, appelé plateau théorique (**Figure 2**).



**Figure 2 : théorie des plateaux**

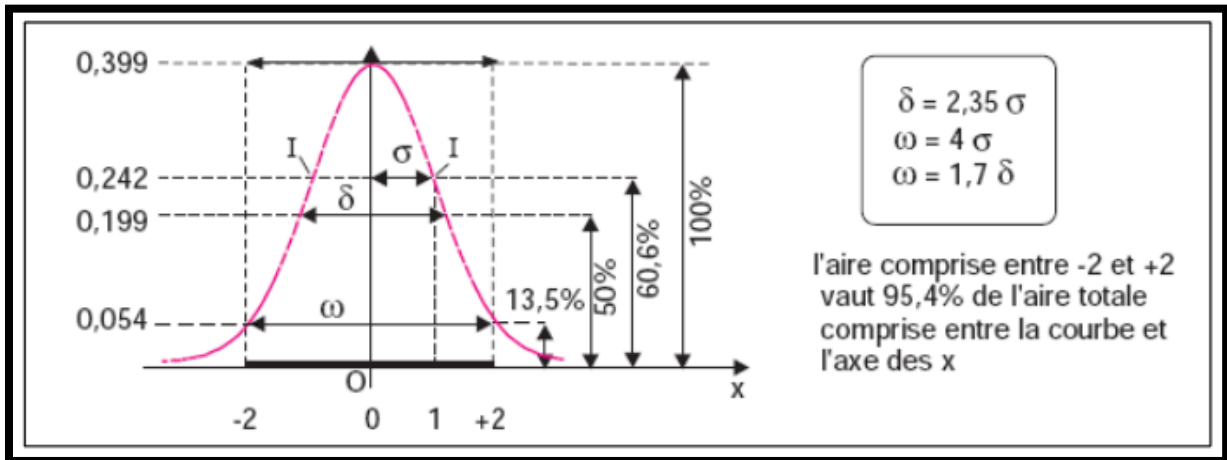
La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou  $H$ ) vaut donc :

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

L'efficacité de la colonne augmente lorsque le nombre de plateaux théoriques augmente ou si  $H$  diminue à longueur  $L$  constante. Elle peut varier considérablement selon le type de colonne et la nature des deux phases.

#### b) Pics d'éluion Gaussiens

L'efficacité de la colonne est calculée à partir du pic chromatographique que l'on assimilera à une courbe de Gauss. La dispersion d'un pic est caractérisée par son écart type  $\sigma$  et sa variance  $\sigma^2$ .



$\delta$  : la largeur à mi-hauteur (mesurée à 50% de la hauteur totale).

$\sigma$  : l'écart type du pic (qui est égal à la demi largeur du pic à 60,6% de sa hauteur totale)

variance  $v = \sigma^2$

$\omega$  : la largeur de la base du pic mesurée à 13,5% de la hauteur totale

L'efficacité d'une colonne est liée à la largeur des pics et on définit cette efficacité comme étant la variance par unité de longueur de colonne soit :

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

Comme H est exprimé en unité de longueur,  $\sigma$  et L sont exprimés en unité de longueur.

On peut déterminer la H ou N graphiquement. On mesure graphiquement  $t_r$  et  $\omega$  (en unité de temps). Ce qui permet de déterminer N puis H.

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

On peut aussi exprimer cette relation en fonction de la largeur à mi-hauteur  $\delta$ . Elle devient

$$N = 5.54 \frac{t_r^2}{\delta^2}$$

On utilise généralement cette dernière équation car les pics sont souvent déformés à la base.

### c) Efficacité réelle d'une colonne

N et H sont deux paramètres utilisés dans la littérature et par les fabricants d'appareils pour évaluer les performances d'une colonne. Ils sont donnés pour un soluté défini dans les conditions définies.

Lorsque l'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 :

$$N_{eff} = 16 \frac{t_r^2}{\omega^2} \quad \text{ou} \quad N_{eff} = 5.54 \frac{t_r^2}{\delta^2}$$

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 lorsque l'on veut comparer les performances d'une colonne capillaire et d'une colonne remplie.

## 6.5. La qualité de la séparation

### a) Sélectivité d'une colonne

Le facteur de sélectivité  $\alpha$  décrit la position de deux pics adjacents 1 et 2 situés sur un chromatogramme. Il correspond au rapport des facteurs de rétention de la colonne pour les deux composés. Il définit si la séparation est chimiquement possible :

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} \quad \alpha \text{ est toujours supérieur à } 1$$

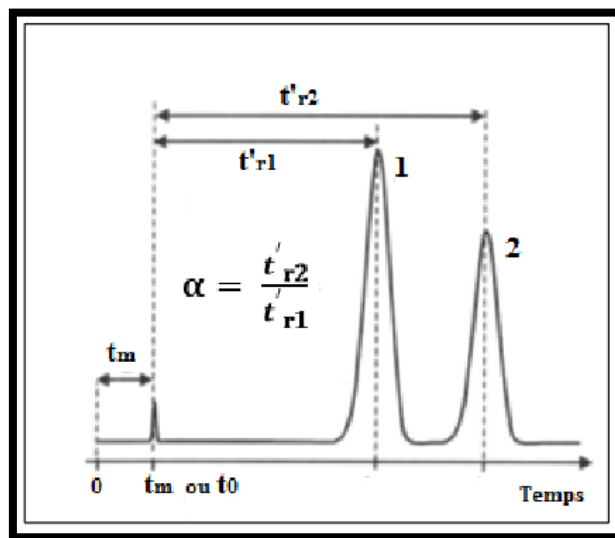
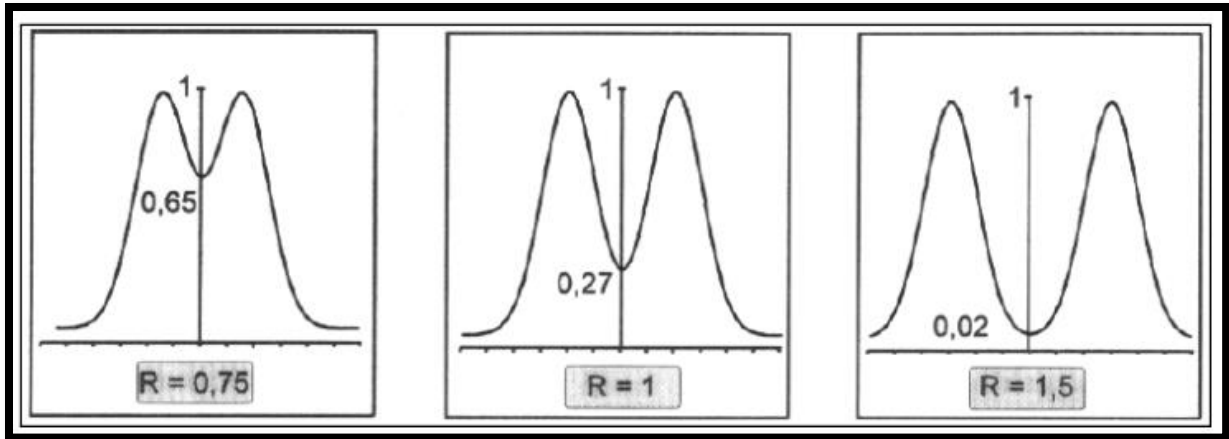


Figure 4 : facteur de sélectivité

### b) Résolution

La résolution  $R$  d'une colonne donne la mesure quantitative de son aptitude à séparer deux solutés. Elle est définie par :

$$R = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{\omega_1 + \omega_2}$$



**Figure 5 : facteur de résolution**

Une résolution de 1,5 permet la séparation pratiquement complète de 1 et 2, ce qui n'est pas le cas pour une résolution de 0,75.

Pour une résolution de 1 le pic de 1 contient environ 4% de 2 et le pic de 2 environ 4% de 1.

Pour une résolution de 1,5 le chevauchement est d'environ 0.3%.

On établit facilement l'équation qui lie la résolution d'une colonne et le nombre de ces plateaux théoriques ainsi que les facteurs de capacité et de sélectivité de deux solutés sur la colonne :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{K'_2}{1 + K'_2} \right)$$

où  $K'_2$  est le facteur de capacité de l'espèce la plus lente et  $\alpha$  le facteur de sélectivité.

## 7. Optimisation d'une analyse chromatographique

La résolution et le temps d'élution sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante du ou des composés intéressants en un minimum de temps. Les paramètres qui conditionnent  $R$  et  $t_r$  sont le nombre de plateaux théoriques  $N$ , le facteur de capacité  $\alpha$  et le facteur de sélectivité  $K'_2$ :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{K'_2}{1 + K'_2} \right)$$

### 7.1. Modification de la hauteur équivalente à un plateau théorique

La résolution d'une colonne est par définition proportionnelle à la racine carrée du nombre de plateaux théoriques qu'elle contient. L'augmentation du nombre de plateaux entraîne un

allongement de la durée de la séparation, sauf si cette augmentation est obtenue en réduisant H.

Les méthodes permettant de minimiser H sont la diminution de

- diamètre des particules du support
- la température (CPG)
- l'épaisseur du film liquide (HPLC)

On peut optimiser également la vitesse d'écoulement de la phase mobile.

## 7.2. Modification du facteur de capacité

La séparation peut souvent être améliorée de manière significative en modifiant le facteur de capacité  $K'_2$ . L'augmentation de  $K'_2$  améliore le facteur de résolution au détriment de la durée de l'élution. Les valeurs optimales de  $k'$  sont généralement comprises entre 2 et 5.

Le moyen le plus usuel pour améliorer la résolution est d'optimiser  $k'$  :

- pour les phases mobiles gazeuses,  $k'$  peut être contrôlé en modifiant la température
- pour les phases liquides des changements de composition du solvant permettent souvent d'agir sur  $k'$  de manière à obtenir de meilleures séparations.

## 7.3 Modification du facteur de sélectivité

L'optimisation de  $k'$  et de N ne suffisent pas pour donner une bonne séparation de deux solutés en un temps raisonnable si  $\alpha$  est proche de 1. Dans ce cas on doit chercher à augmenter  $\alpha$  tout en maintenant  $k'$  entre 1 et 10. Plusieurs options sont possibles, on peut :

- modifier la phase mobile
- modifier la température de la colonne
- modifier la composition de la phase stationnaire
- utiliser des effets chimiques spéciaux.

Une augmentation de température entraîne également une augmentation de  $k'$  mais elle a peu d'effet sur la valeur de  $\alpha$  en chromatographie liquide-liquide ou liquide-solide. Par contre la température a une influence sur l'échange d'ions et sera un paramètre à optimiser.

## 8. Analyse qualitative et quantitative

### 8.1. Analyse qualitative

Elle sert essentiellement à l'identification des composants d'un mélange.

Elle consiste à identifier les solutés par leur temps de rétention qui pour des conditions données (solvant, débit, colonne etc) est caractéristique du composé. Il peut bien sûr arriver

que deux composés différents mais très proches aient le même temps de rétention. On doit donc s'assurer préalablement qu'un pic donné correspond bien à un seul soluté. C'est l'objet de toute la phase de mise au point des conditions opératoires utilisées. On admet ici pour la suite que chaque pic correspond à un seul composé.

## 8.2. Analyse quantitative

Une fois identifiés le ou les solutés intéressants, celui-ci permet l'analyse quantitative grâce à la relation:  $m_i = K_i A_i$

$m_i$  : la masse du soluté i injecté

$A_i$  : l'aire du pic représentant ce soluté.

$K_i$  : le coefficient de proportionnalité.

### a) Mesure de l'aire de pic $A_i$

On utilise essentiellement la triangulation manuelle et l'intégration automatique.

**la triangulation** : on assimile le pic à un triangle soit en traçant les tangentes aux points d'inflexion de la courbe

et en calculant l'aire:  $A_i = \frac{1}{2} H' \times \omega$

soit en mesurant la largeur à

mi - hauteur et en calculant l'aire

par:  $A_i = H \times \delta$

ou encore en mesurant les largeurs

au quart ( $\beta$ ) et aux trois quarts ( $\gamma$ )

de la hauteur,  $A_i = \frac{1}{2} H \times (\beta + \gamma)$

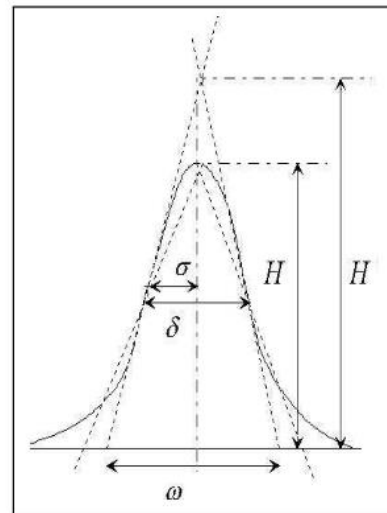


Figure 6 : la triangulation

### b) Détermination du coefficient de proportionnalité

Il est impossible avec les chromatographes courants de calculer le coefficient de proportionnalité par mesure directe de l'aire du pic enregistré quand on introduit une masse exacte, connue, d'un soluté d'un injecteur. Les seringues d'injection ne permettent pas de repérer le volume d'échantillon avec une précision suffisante. On aura donc recours à des méthodes d'étalonnage, qui, comme en analyse qualitative, feront de la chromatographie quantitative un procédé relatif vis-à-vis de substances connues. Voici les principales méthodes utilisées.



- **Normalisation interne** : en considérant que tous les  $K_i$  sont égaux (séries homologues telles qu'alcanes, alcools, etc...). On obtient alors les pourcentages en masse de chaque soluté de la manière suivante:

$$m_i\% = \frac{A_i}{\sum_i A_i} \times 100$$

- **Etalonnage interne** : dans cette méthode, on compare individuellement chacun des pics à évaluer au pic d'une substance étalon E, convenablement choisie, introduite en proportion connue dans le mélange à analyser. il convient évidemment que le pic étalon ne soit confondu avec aucun des pics du chromatogramme.

$$m_e = K_e \times A_e \quad \text{soit} \quad \frac{m_i}{m_e} = \frac{k_i}{K_e} \times \frac{A_i}{A_e}$$

On définit alors  $K_{i/e} = \frac{K_i}{K_e}$

On calculera donc la réponse de chaque soluté concerné par rapport à l'étalon. La méthode est générale. Elle est précise et reproductible

- **Etalonnage externe** : Cette technique n'est valable qu'avec une excellente qualité d'injection.

On injecte une masse  $m_e$  de composé étalon en solution ( $V_e$  injecté).

$$m_e = K \times A_e \quad \text{soit} \quad K = \frac{m_e}{A_e}$$

On injecte un même volume de solution contenant le composé ( $m_i$ ) et on mesure  $m_i$ .

$$m_i = K \times A_i \quad \text{soit} \quad m_i = \frac{m_e}{A_e} \times A_i$$

### III. Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

#### III. 1. Introduction

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) (gas chromatography, **GC**, en anglais) est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles, appelées ici « analytes ». Cette technique a été développée par **A.J.P MARTIN** et **R.L.M. SYNGE**, récipiendaires du **Prix Nobel** de chimie **1952** pour l'invention de la chromatographie de partage. Elle est utilisée dans des domaines très variés, tels que la parfumerie, l'œnologie, l'industrie pétrolière, la biologie, la chimie fine et l'industrie des matières plastiques.

Cette chromatographie qui est la plus performante au point de vue de la séparation, est réservée aux produits volatils et thermostables de masse moléculaire inférieure à **500 Daltons**.

#### III.2. principe

Le mélange à éluer est injecté à l'aide d'une seringue. Une fois vaporisés par l'injecteur, les composés sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur (le plus souvent **He** ou **N<sub>2</sub>**). Suivant l'affinité avec la phase stationnaire, les composés sont séparés avant d'être détectés en sortie de colonne. Les appareils de **CPG** sont fréquemment couplés avec un spectromètre de masse pour l'identification des composés au fur et à mesure de leur élution.

#### III. 3. Appareillage

L'appareil utilisé pour réaliser une analyse par chromatographie en phase vapeur est appelé chromatographe. Il comporte plusieurs éléments, comme indiqué sur le schéma ci-dessous :

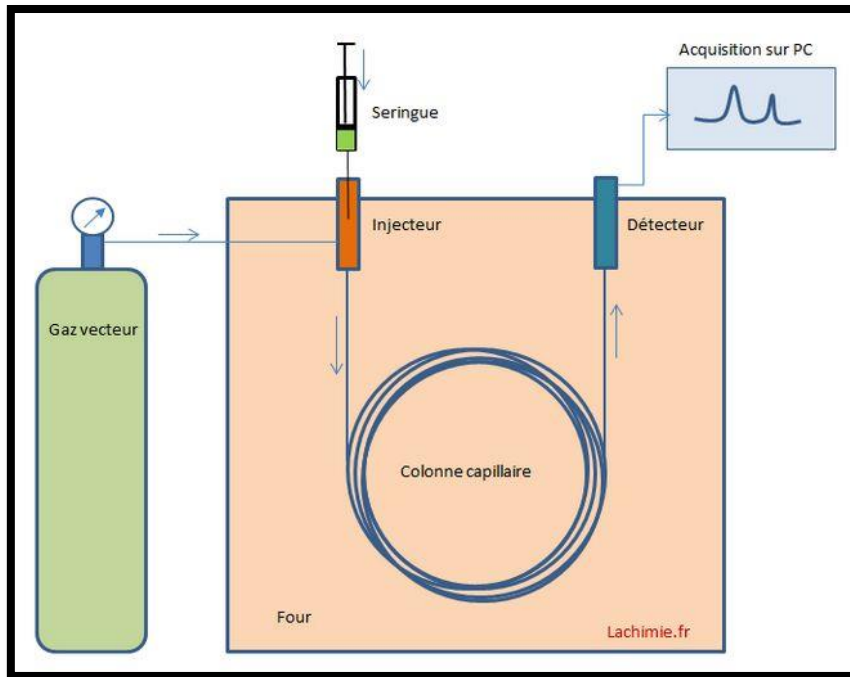
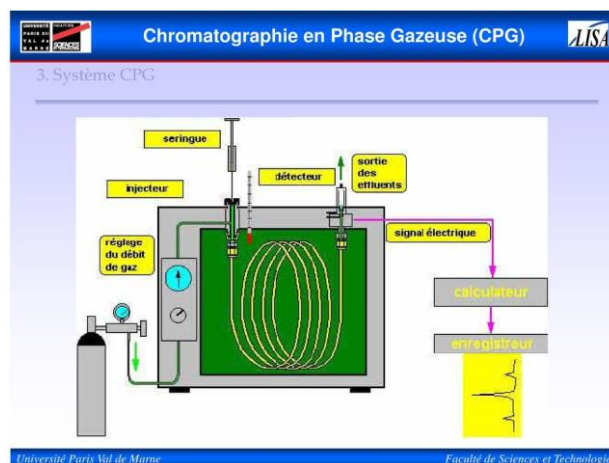


Schéma simplifié d'un chromatographe en phase gazeuse

### III.3.1. Le gaz vecteur (phase mobile)

Le gaz vecteur est le gaz qui circule à l'intérieur du chromatographe, entraînant les **analytes** à travers la colonne, depuis l'injecteur jusqu'au détecteur. Son choix dépend du type de détecteur utilisé ; cela peut être par exemple de l'**hélium**, de l'**azote**, de l'**argon** ou de l'**hydrogène**. Le débit de ce gaz vecteur est de l'ordre de **30 à 40 mL/min** pour les **colonnes remplies** et de **0,2 à 2 mL/min** pour les **colonnes capillaires**. Le débit du gaz vecteur influe sur le pouvoir de résolution du chromatographe. Deux phénomènes, la diffusion longitudinale et la résistance au transfert de masse entre les phases mobile et stationnaire, ont des effets opposés sur le pouvoir de résolution de la colonne. L'opérateur choisit donc une valeur du débit afin d'optimiser le pouvoir de résolution du chromatographe.

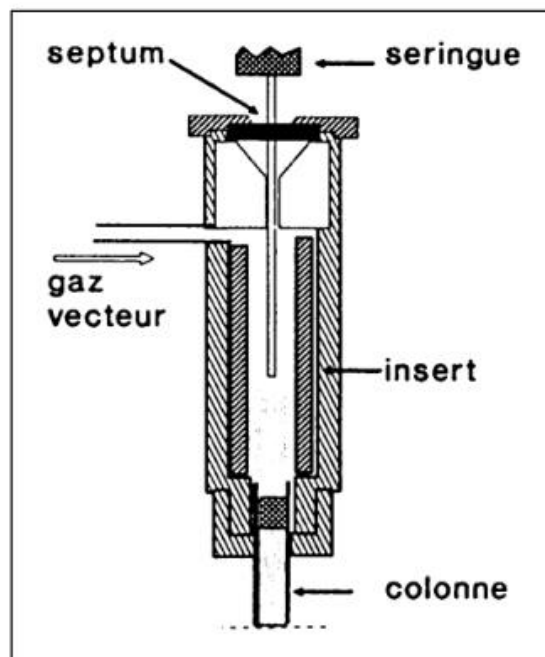


### III.3.2. Le système d'injection

On injecte, à l'aide d'une micro-seringue ou vanne l'échantillon, liquide, solide, ou gazeux que l'on veut analyser, dans un tube. On introduit ensuite un gaz vecteur, qui le volatilise et l'entraîne vers la colonne.

#### III.3.2.1. Injection direct

Le système le plus courant est l'injecteur à septum représenté ci-dessous. Il s'agit d'un tube métallique, doublé d'un chemisage de verre (insert), balayé par le gaz vecteur et chauffé à une température supérieure de 20 à 30 °C au point d'ébullition du constituant le moins volatil du mélange analysé de façon à permettre une vaporisation immédiate de tous les constituants du mélange. L'une des extrémités de l'injecteur est obturée par une pastille d'élastomère siliconé nommée septum pour permettre le passage de l'aiguille de la micro-seringue qui contient l'échantillon à injecter et l'autre est reliée à la colonne. La totalité de l'échantillon injecté est transféré dans la colonne. L'introduction du mélange se fait par l'intermédiaire d'une micro-seringue dont le volume varie généralement de 1 à 10  $\mu\text{L}$  et dont l'aiguille a un diamètre de l'ordre de 0,15 mm.



#### III.3.2.2. Injection split/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

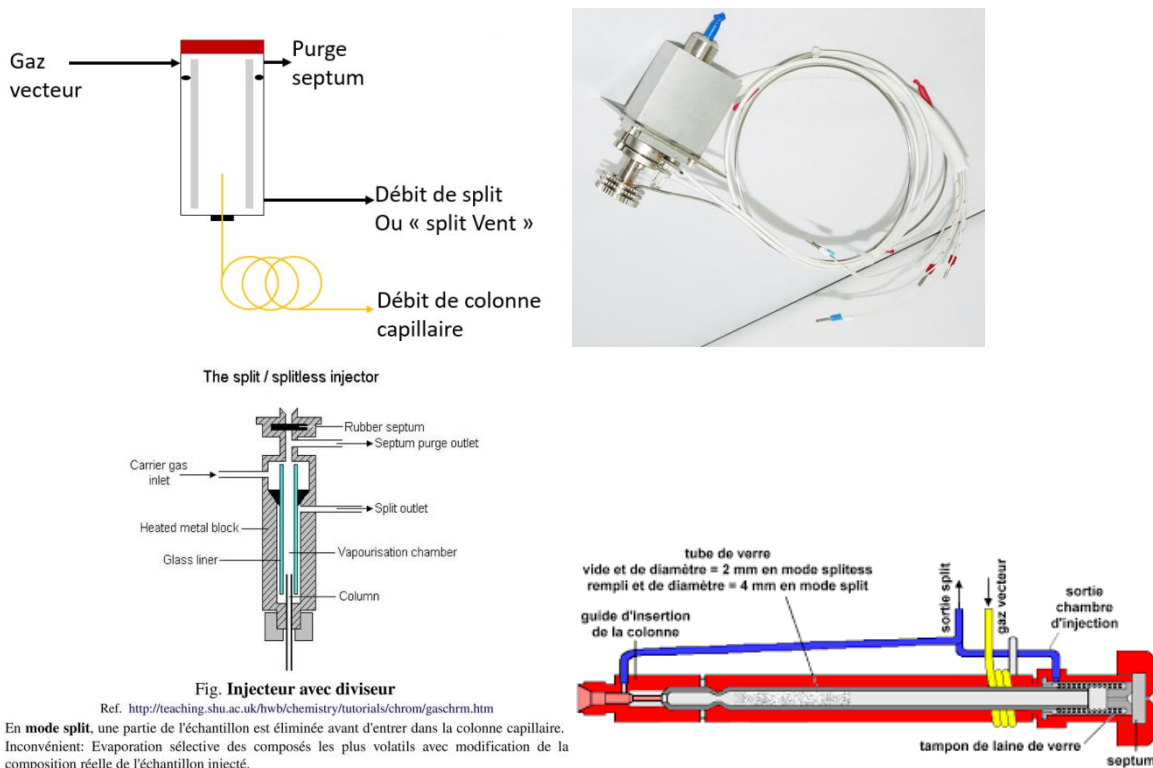
plus petite est la seule à pénétrer dans la colonne. Ce mode est utilisé dans le cas des colonnes capillaires à faible débit.

En mode splitless l'échantillon est vaporisé et mélangé dans le gaz porteur, mais le mélange n'est pas divisé en deux parties. Il reste quelques secondes dans le liner avant d'être transféré sur la colonne (environ 95 % du produit). Le 5 % restant est évacué par l'ouverture de la vanne de fuite. Cette méthode est utilisée quand l'échantillon à analyser est très dilué et éventuellement très sale (contenant des résidus non-volatils).

### exemple :

Le débit de la colonne capillaire est de 1ml/min. Le split ratio est de 100.

Un centième de la quantité injectée passera dans la colonne capillaire.



### III.3.2.3. Injection On column

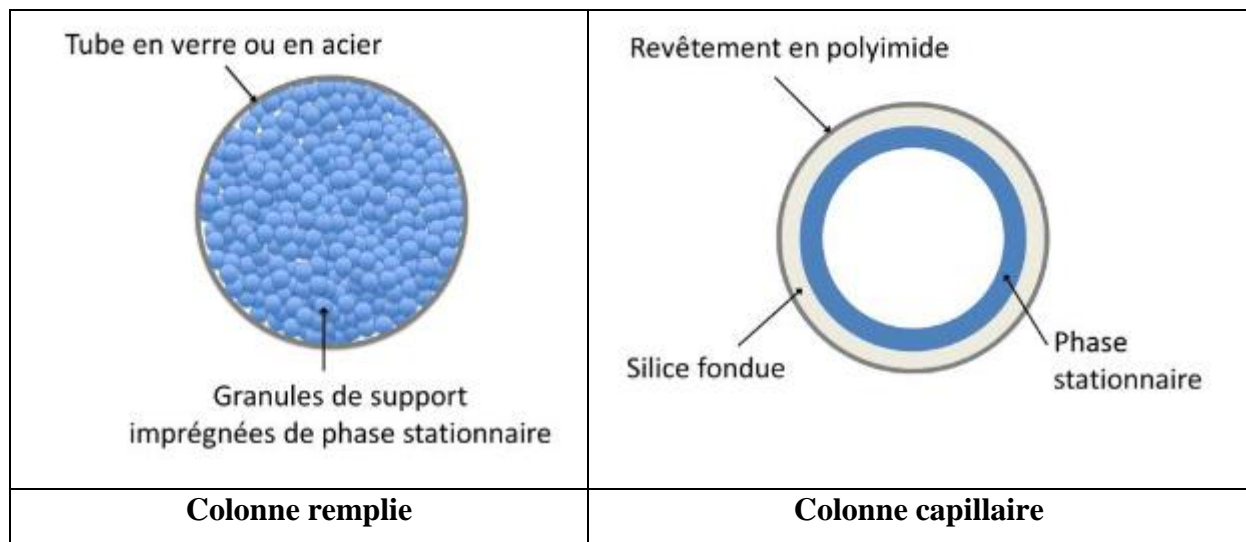
On utilise une seringue de faible diamètre qui permet de déposer l'échantillon dans la colonne. La plupart des injections s'effectuent maintenant de façon automatisée ce qui permet d'avoir une meilleure reproductibilité.

A l'arrêt de la CPG, le gaz vecteur doit circuler dans la colonne tant que la température de l'injecteur n'est pas descendue en dessous de 100°C. Une température trop élevée peut endommager la colonne.

### III.4. La colonne (phase stationnaire)

Il existe deux types de colonnes : les colonnes remplies et les **colonnes capillaires**. Les

**III.4.1. Colonnes remplies** ont un diamètre de quelques millimètres et une longueur de l'ordre du mètre. Elles sont remplies de granules de support inerte, généralement de la silice, dont la surface est imprégnée ou greffée avec la phase stationnaire. Elles sont aujourd'hui supplantées par les colonnes capillaires, dont le pouvoir de résolution est bien supérieur.



**III.4.2. Les colonnes capillaires** sont de simples tubes d'acier inoxydable, de verre ou de silice fondue (matériau inerte vis-à-vis de la phase stationnaire et des échantillons) de **diamètre** intérieur compris entre **0,1 et 0,5 mm**, et d'une longueur typique de plusieurs dizaines de mètres, pouvant aller jusqu'à **100 m**. Pour tenir dans l'appareil, la colonne est enroulée, avec des spirales ayant 10 à 30 cm de diamètre. La surface interne de ce tube est recouverte d'un film de **0,1 à 5 µm d'épaisseur** constitué de la phase stationnaire. Ce film est mis en place par greffage ou simple déposition, le greffage étant généralement préféré pour des raisons de stabilité thermique. Par exemple, la Carbowax® est une colonne capillaire comportant un film polaire de polyéthylène glycol greffé en surface, film qui constitue la phase stationnaire. La SE-30® est une colonne capillaire apolaire comportant un film de polydiméthylsiloxane qui constitue la phase stationnaire.

### III.5. Four

Le four principal est un compartiment, placé entre la chambre d'injection et le détecteur, qui contient la colonne chromatographique. Il est muni d'éléments chauffants pouvant contrôler la température du four avec une très grande précision. Des contrôles permettent également de

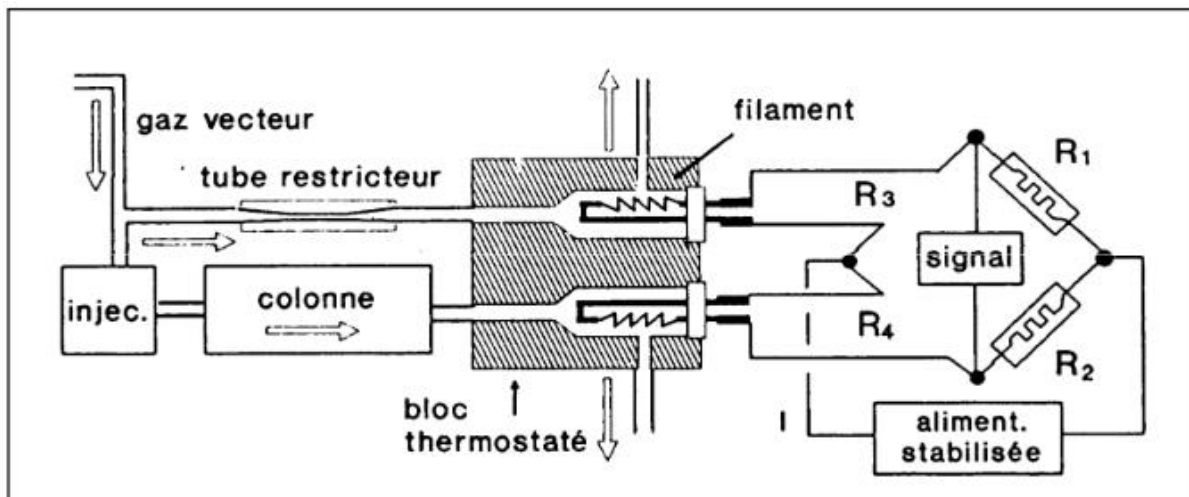
travailler à température programmée pour la séparation de mélanges de composés ayant des capacités de rétention très différentes sur la phase stationnaire.

### III.6. Détecteur

Le système de détection va permettre de mesurer le signal émis par les différentes molécules et de pouvoir les identifier. Pour l'enregistrement du signal émis par le détecteur, des logiciels sur PC remplacent avantageusement les enregistreurs analogiques sur papier.

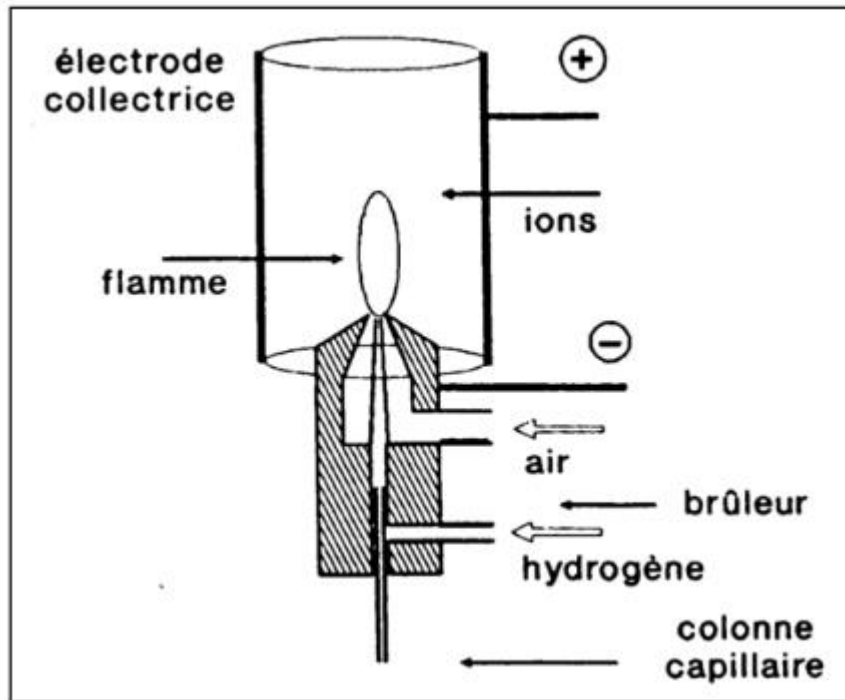
Il existe plusieurs types de détecteurs dont deux utilisés le plus couramment.

**a) Détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) :** ce fut le détecteur le plus répandu aux débuts de la chromatographie en phase gazeuse. Son principe repose sur le fait que la résistance d'un métal parcouru par un courant d'intensité constante varie lorsqu'il est soumis à un gradient de température.



**Détecteur à conductibilité thermique**

**b) Détecteur à ionisation de flamme (FID) :** c'est le détecteur le plus utilisé en CPG. Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans un petit brûleur dont la flamme est alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. La combustion des composés organiques élués produit des ions qui sont collectés au moyen de deux électrodes. Le courant très faible qui en résulte est transformé en une tension qui est enregistrée.



**Détecteur à ionisation de flamme**

### c) 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.

### d) Autres détecteurs

Il existe d'autres types de détecteurs, comme le détecteur thermoionique (NPD) spécifique des composés azotés et phosphorés, celui à capture d'électrons (CED) particulièrement sensible aux composés halogénés et celui à photométrie de flamme spécifique des composés contenant du soufre et du phosphore. Habituellement, on fixe la température du détecteur sensiblement à la même valeur que celle de l'injecteur.



## III.7. Facteurs dont dépend la séparation

### III.7.1. Température

Généralement, si les constituants du mélange à séparer ont des polarités voisines, les composés les plus volatils sont les plus rapidement entraînés. Si la température de la colonne est trop basse, la vitesse d'échange entre la phase stationnaire et le gaz vecteur est lente, la diffusion devient importante, le temps de rétention de certains composés trop long et les pics correspondants sont dissymétriques ou déformés. Si la température de la colonne est trop élevée, l'équilibre de chaque constituant entre les deux phases mobile et stationnaire n'a pas le temps de s'établir et tous les constituants apparaissent à la sortie de la colonne en même temps. 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. Un programmeur électronique, mis en route à l'injection, fait varier la température du four selon un profil choisi.

### III.7.2. Débit du gaz vecteur

Il doit être tel que les différents 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. S'il est trop lent, les pics perdent leur finesse par suite d'une diffusion trop importante des constituants dans le gaz vecteur. Quand le débit est bien réglé, on a intérêt à augmenter la température du four pour améliorer la finesse des pics (voir exemple ci-dessus).

### III.7.3. 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. De plus, la longueur des colonnes est limitée par le fait qu'une colonne trop longue exige une trop forte pression du gaz vecteur.

### III.7.4. 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. Ce liquide doit être chimiquement inerte vis à vis des composants du mélange à séparer. De plus, on ne doit l'utiliser que dans les limites de températures pour lequel il est prévu : si la température devient trop basse, la phase stationnaire devient visqueuse, ce qui diminue considérablement la vitesse d'échange entre le gaz vecteur et la

phase stationnaire ; si la température devient trop élevée, il y a perte de la phase stationnaire par vaporisation. Le principe général qui doit servir de guide au choix de la phase stationnaire est le suivant : les structures de polarités voisines ont des affinités entre elles. Ainsi, pour séparer des substances polaires, on utilise une phase fixe polaire car ces substances sont fortement retenues par la phase fixe ; dans ce cas, l'ordre de sortie des composés d'une série homologue est l'ordre croissant de leur point d'ébullition. Si des composés peu polaires se trouvent dans le mélange analysé, ils sont peu retenus par la phase stationnaire polaire et sont élués avant les composés polaires ayant même point d'ébullition. Si la phase stationnaire est apolaire, c'est l'inverse qui se produit: les composés non polaires sont bien retenus et sont élués selon l'ordre de leur point d'ébullition croissant dans une série homologue et un composé polaire est élué avant un composé non polaire ayant même point d'ébullition.

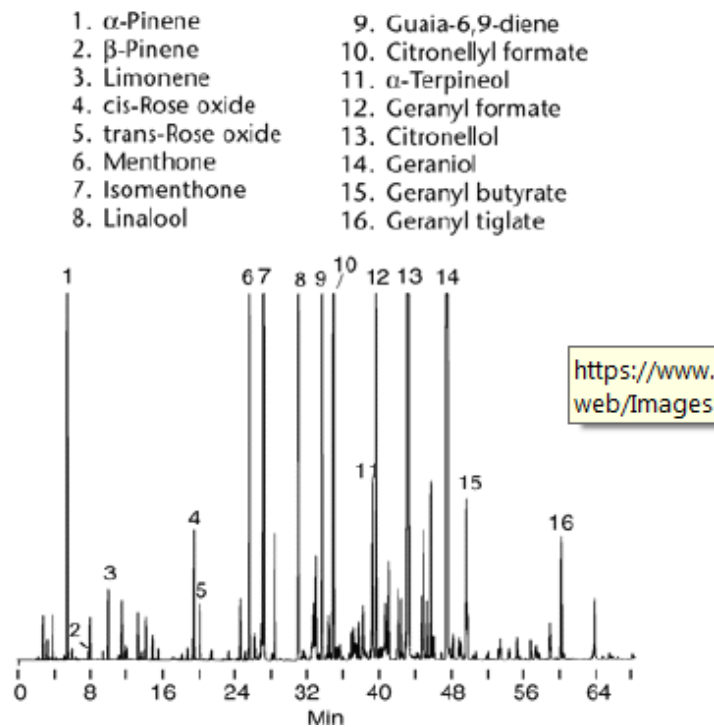
### III.8. En pratique

Mode opératoire pour réaliser une analyse CPG:

- ✓ Vérifier qu'une colonne (ou plusieurs) est/sont déjà en place dans le chromatographe.
- ✓ Programmer le four. Si des conditions expérimentales adéquates sont déjà connues, les utiliser. Sinon :
  - Une méthode de type gradient est souvent suffisante. Balayer une grande plage de température, par exemple de 50 à 250 °C sur 10 min.
  - Si une méthode isotherme est désirée, commencer par le même gradient, puis resserrer les valeurs extrémales par itération pour obtenir le pic correspondant à l'analyte d'intérêt au temps de rétention jugé adéquat.
- ✓ Préparer une solution d'échantillon à une concentration environ égale à 1 mg.mL<sup>-1</sup>, dans un solvant volatil (par exemple diéthyléther, cyclohexane, acétate d'éthyle).
- ✓ Choisir la colonne. Par défaut, une colonne apolaire est suffisante. On réserve généralement l'utilisation de colonnes polaires aux cas où les volatilités des analytes à séparer sont très proches.
- ✓ Injecter environ 1 µL dans l'injecteur. Par défaut, on peut choisir comme température de l'injecteur la plus haute température atteinte dans le four pendant l'analyse.
- ✓ Afin de nettoyer la colonne, on peut la laisser quelques minutes à la température maximale d'utilisation. Ceci permet de débarrasser la colonne des analytes les moins volatiles qui ne sont pas sortis de la colonne à la fin de l'analyse, et risquent de sortir lors d'une injection ultérieure.

**Exemple** : Analyse par CPG de l'essence de géranium.

Le chromatogramme obtenu dans la figure V. 19, indique que l'huile de géranium contient au moins 16 composés.



Chromatogramme de l'essence de géranium

Les Conditions de l'analyse sont les suivant :

- **Colonne:** SUPELCOWAX 10, 30m x 0.25mm ID, film de 0.25 $\mu$ m
- **Four:** 50°C (2 min) to 280°C at 2°C/min, puis 20 min
- **Phase mobile** : helium, 25cm/sec
- **Détecteur**.: FID
- **Injecteur:** 0.2 $\mu$ L, split (100:1).

### III.9. Application de la CPG

L'utilisation de cette technique s'est largement répandue dans un grand nombre d'industries donnant lieu à des applications analytiques très diverses :

#### Contrôle analytique pharmaceutique en industrie

- Contrôle des matières premières / impuretés, solvants résiduels,
- Contrôle en cours de fabrication de l'intégrité de la molécule,
- Contrôle du produit fini / teneur,

- Etude de stabilité dans le temps / produits de dégradation

 **Dosage en milieux biologiques (extraction et purification)**

- Etudes de biodisponibilité,
- Etudes métaboliques (identification /SM),
- Suivi thérapeutique au cours d'un traitement,
- Dosage biochimiques.

 **Dosage en toxicologie**

- Recherche de toxique en intoxication aiguë (méthanol, EG...),
- Dosage des drogues : amphétamines, opiacés, cannabinoïdes,
- Contrôle anti-dopage,
- Dépistage de toxicomanie

 **Agroalimentaire**

- Recherche et dosage des pesticides,
- Recherche et dosage et des nitrosamines (nitrites)

 **Industrie chimique, cosmétologie**

- Analyse des essences, parfums, arômes, hydrocarbures.

La chromatographie en phase gazeuse sert surtout pour l'analyse de liquide thermiquement stables et assez volatils (point d'ébullition < 250°C) et pour séparer les petites molécules avec des quantités de l'ordre de quelque picogrammes.

## La Chromatographie liquide sur colonne

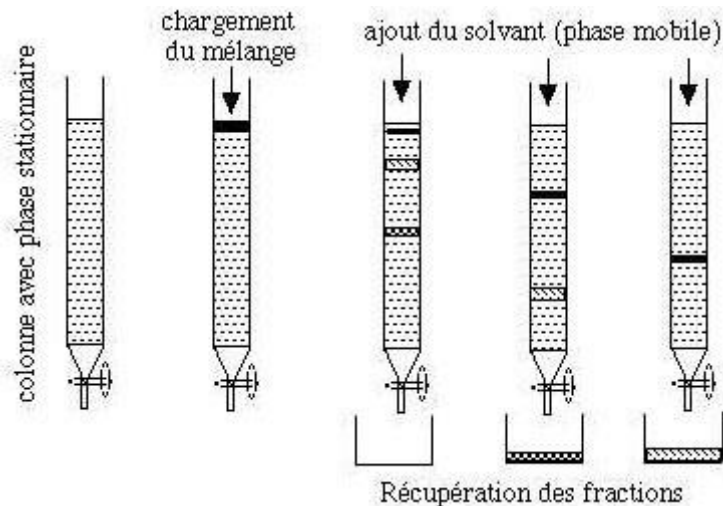
### 1. Généralité

La chromatographie sur colonne est une méthode préparative, elle permet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes (50 mg à environ 20 g en laboratoire, et jusqu'à 1 kg en industrie.)

Elle présente cependant plusieurs inconvénients :

- de grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution
- la durée de l'élution est généralement très grande
- la détection des composés exige une attention constante

Elle est adaptée à la purification des faibles quantités de produits, lorsque les conditions opératoires sont au point. Cependant, la méthode étant très empirique, sa mise au point nécessite souvent de nombreux essais.



Selon la nature de la phase stationnaire on peut distinguer quatre types de chromatographie :

- 1- chromatographie d'absorption
- 2- chromatographie de partage
- 3- chromatographie par échange d'ions
- 4- chromatographie par exclusion de taille.

### 2. La chromatographie d'absorption

C'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire. La chromatographie d'adsorption en phase inverse : C'est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.

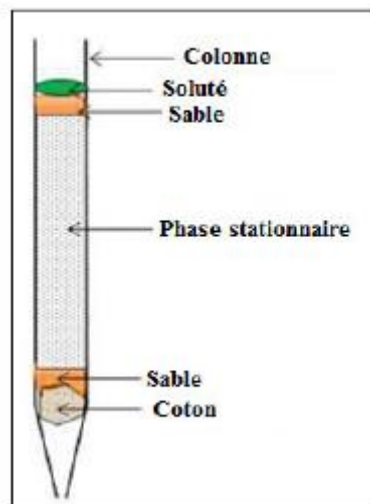
L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide (ou gaz) sur une surface solide. Ce phénomène fait intervenir des forces

complexes entre le soluté et l'adsorbant : force électrostatique, force inductive, force de dispersion de London, force de liaison hydrogène, force de transfert de charge et autres. En chromatographie l'adsorption doit être réversible. La substance adsorbée est désorbée en solution par rupture de liaisons précédentes.

### 2.1. Description et principe

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur et de sections variables, l'échantillon en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés.

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant.



#### Facteurs dont dépend la séparation

Quatre facteurs interviennent : l'adsorbant, l'éluant, la dimension de la colonne et la vitesse d'élution.

##### 1) Adsorbant

Le plus utilisé est l'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), cependant, on la limitera aux composés organiques stables car, sous sa forme basique, elle peut provoquer la déshydratation des esters par exemple. Le gel de silice ( $\text{SiO}_2$ ) se présente sous forme d'une poudre blanche utilisée en particulier pour la séparation des composés qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être traités par l'alumine.

La granulométrie de l'adsorbant doit être supérieure à celle des adsorbants utilisés en CCM.

Leur taille est habituellement comprise entre 50 et 200  $\mu\text{m}$ .

La quantité d'adsorbant dépend de la difficulté de la séparation et de la masse d'échantillon. On peut considérer que pour chaque gramme d'échantillon, il faut 30 à 50 g d'adsorbant si la polarité des composants à séparer est très différente et jusqu'à 200 g si la séparation est difficile.

Les adsorbants figurant dans la liste ci-dessous sont classés selon l'ordre croissant de leurs forces d'interactions avec des composés polaires :

- Cellulose, papier
- Kieselguhr, terre de diatomée.
- Amidon.
- Sucre.
- Talc.
- Carbonate de sodium.
- Oxyde de magnésium.
- Gel de silice.
- Alumine.
- Charbon activé.

En général, plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires.

## 2) Eluant

L'éluant est en général un mélange de deux solvants. Au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les substances les moins retenues par l'adsorbant (les moins polaires) tout en recherchant un  $R_f \sim 0.3$  pour le produit le moins polaire. Ensuite on fait varier la composition de l'éluant en additionnant graduellement le solvant le plus polaire. Ainsi les composés les plus polaires, retenus sur l'adsorbant, ne migreront que graduellement vers le bas de la colonne. La polarité de l'éluant peut rester la même tout au long de la chromatographie (élution isocratique).

Les liquides classés ci-dessous le sont par polarité croissante (série éluotrope)

- éther de pétrole
- cyclohexane
- tétrachlorométhane
- trichloroéthylène
- Toluène
- benzène

- Dichlorométhane
- Ether di éthylique
- trichlorométhane
- acétate d'éthyle
- pyridine
- propanone
- propan 1-ol
- éthanol
- méthanol
- eau
- acide acétique

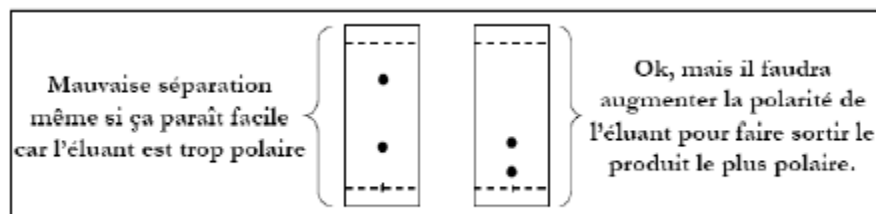


Figure : le bon choix de l'éluant

### 3) Dimension de la colonne

La quantité d'adsorbant est telle qu'il occupe une hauteur égale à environ 10 fois le diamètre de la colonne. Il faut également prévoir un espace de 10 cm environ au-dessus de l'adsorbant pour placer le solvant.

### 4) Vitesse d'éluion

Elle doit être la plus constante possible. Il faut qu'elle soit suffisamment lente pour que le soluté soit au plus près de l'équilibre entre les phases liquide et adsorbée. Elle ne doit pas être trop lente car sinon les substances diffusent dans le solvant et on obtient des bandes de plus en plus larges et une séparation médiocre.

### Remplissage de la colonne

C'est l'opération la plus délicate car le remplissage doit être le plus homogène possible et exempt de bulle d'air. Les surfaces inférieure et supérieure de l'adsorbant doivent être parfaitement horizontales. La colonne étant verticale, le remplissage peut être réalisé selon deux méthodes au choix.



**✓ Remplissage par voie humide**

On prépare dans un bécher un mélange homogénéisé de l'adsorbant et du moins polaire des solvants utilisé pour le développement 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 pour que l'adsorbant qui se dépose progressivement forme une couche d'environ 2 cm. On tapote les parois de la colonne pour favoriser le tassement de l'adsorbant. On ouvre alors le robinet pour que le solvant s'écoule lentement et on poursuit l'addition de la bouillie homogénéisée par portions successives. Quand tout l'adsorbant est introduit, on laisse décanter jusqu'à ce que le liquide qui surnage soit limpide. Pendant l'opération, on doit veiller à ce que le niveau de solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant.

**✓ Remplissage par voie sèche**

La colonne est remplie au deux tiers par le moins polaire des deux solvants et l'adsorbant en poudre est ajouté en portions successives dans la colonne à l'aide d'un entonnoir, pendant l'addition, on frappe continuellement sur les parois 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.

**Dépôt des produits à analyser**

Il s'effectue robinet fermé, à la pipette pasteur de façon homogène sur les bords de la colonne, le plus bas possible. Il doit former une zone cylindrique étroite dans le haut de la colonne.

Choix du solvant ? Si possible, éluant de départ le plus petit volume possible Le dépôt doit ensuite être absorbé intégralement avant l'ajout du solvant d'éluion.

Deux possibilités s'offrent à vous si le produit brut est solide :

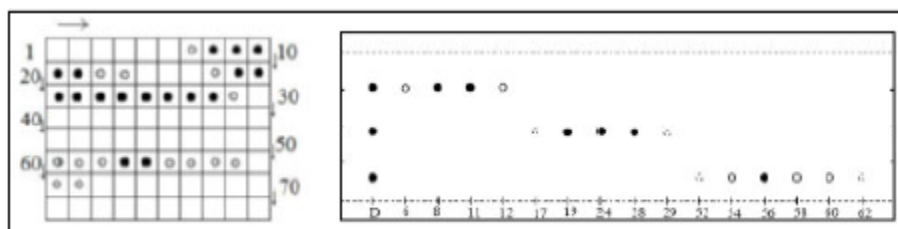
- Le solubiliser dans l'éluant et l'ajouter tel que décrit précédemment.
- Faire une imprégnation sur silice : mélanger le produit en solution avec ~ 5 fois sa masse de silice. Évaporer à sec et additionner ce solide sur le haut de la colonne avant de mettre le sable. On utilise souvent cette technique si le produit brut n'est pas soluble dans l'éluant choisi.

**Elution**

L'éluion doit être continue, on peut alimenter la colonne en continue à l'aide d'une ampoule de coulée ou bien ajouter manuellement l'éluant. Veiller à ce que la surface de l'adsorbant ne

soit jamais au contact de l'air car une colonne laissée à sec se détériore : la séparation sera vouée à l'échec à cause des fissures.

Si on utilise un gradient d'éluant, il faut laisser écouler le premier solvant avant de rajouter le deuxième. Pour la plupart des opérations, une vitesse de 5 à 50 gouttes à la minute convient (la limite inférieure correspond aux séparations difficiles). Le volume de chaque fraction recueillie varie de 1 à 50 mL selon les cas. On collecte les fractions et on les analyse par CCM. Déposer une micro-goutte de chaque fraction sur une CCM.



analyse des fractions d'une colonne par CCM

Lorsque l'analyse des fractions est terminée, on réunit celles qui correspondent à des produits identiques, en prenant soin d'éliminer celles qui correspondent à des recouvrements de zones. Les substances obtenues de cette façon sont généralement d'une très grande pureté.

Il existe maintenant des systèmes automatisés où la colonne est pré paquetée, le gradient est programmé, et l'appareil collecte des fractions. L'interface nous donne directement les fractions qui contiennent un chromophore. Il reste juste à faire les CCM et évaporer.

### Applications

La chromatographie sur colonne classique est beaucoup utilisée pour purifier des produits de synthèse organique et aussi pour séparer les composants d'extraits de plantes (phytochimie).

Elle présente plusieurs inconvénients :

- Elle nécessite une grande quantité d'éluant.
- La durée de l'élution est en général très grande (au minimum, plusieurs heures).
- La détection des composés exige une attention constante.

La chromatographie sur colonne moderne a résolu les problèmes rencontrés, elle met par ailleurs en jeu un matériel plus sophistiqué.

## Chromatographie liquide haute performance (CLHP) (HPLC en anglais)

### I. Introduction

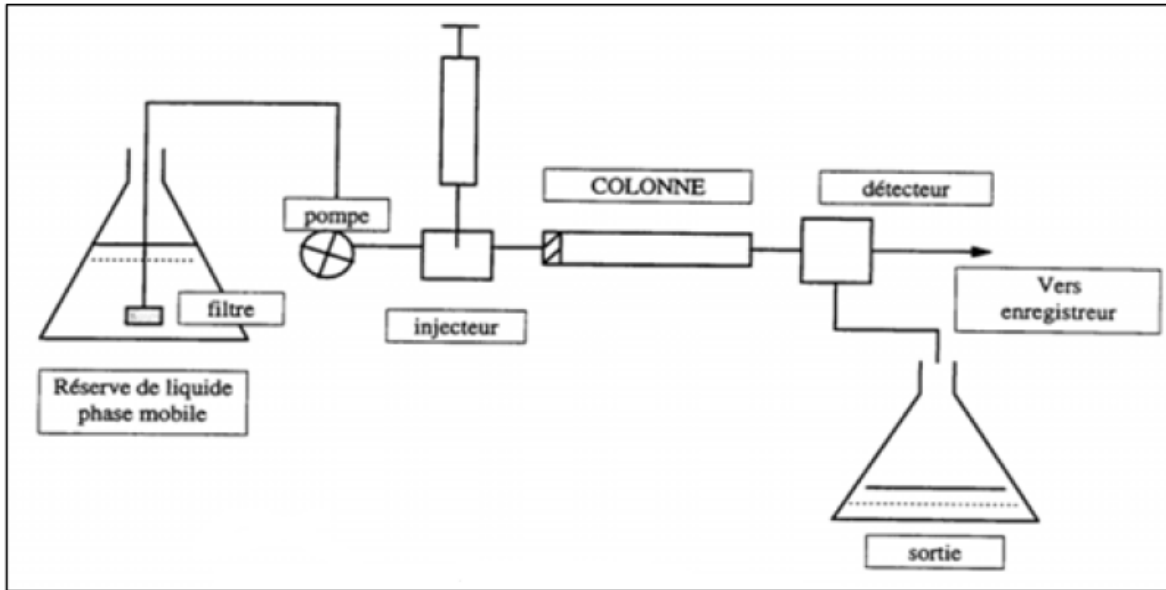
La chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou simplement La chromatographie en phase liquide (CPL) ou liquid chromatography (LC) est une technique séparative utilisée en analyse quantitative, qualitative et principalement employée dans le domaine de la chimie analytique comme outil scientifique majeur mais aussi dans des domaines variés tels que la Toxicologie et la Biochimie.

Le champ d'application de l'HPLC recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire. L'efficacité des colonnes est moindre qu'en CPG, mais l'utilisation de phases chirales ou des nouvelles phases stationnaires opérant suivant plusieurs modes, les techniques par appariement d'ions ainsi que d'interaction hydrophobe accroissent encore plus les possibilités de la CLHP.

La HPLC met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage, que des phénomènes d'adsorption, d'échanges d'ions ou d'exclusion. La méthode de séparation qui elle utilise fait sensiblement appel ou même élément de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs souvent et une colonne remplie avec une phase stationnaire. La durée d'éluion est en général courte et est obtenue par l'application d'une pression élevée de l'ordre de 200 bars grâce à une pompe qui maintient constant le débit du liquide.

### II. Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant), suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans la colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic chromatographique.



principe de fonctionnement de l'HPLC

### III. Appareillage

Dans tous les appareils HPLC, on retrouve un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre. Une, ou plusieurs pompes assurent le débit du solvant d'éluion. En aval de l'injecteur se trouvent la ou les colonnes où s'effectuera la séparation, puis au bout de la chaîne se trouve le détecteur. Par la suite, nous allons aborder un peu plus en détail chacun des composants essentiels d'une HPLC.

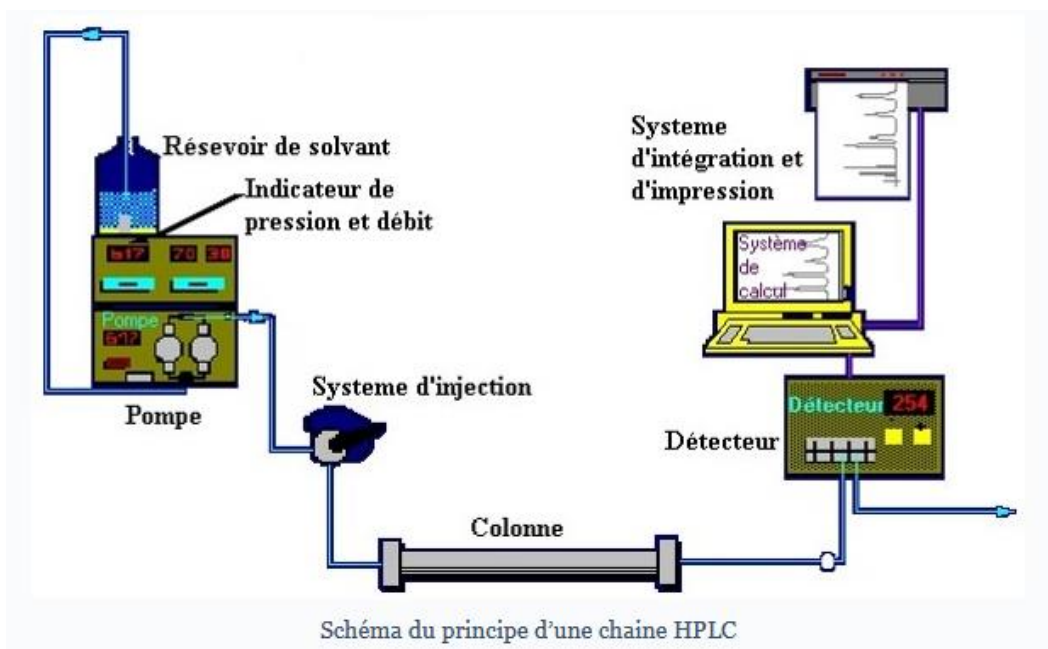


Schéma du principe d'une chaîne HPLC

### III.1. Un réservoir de solvant (éluant)

Les appareils sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs contenant chacun une quantité suffisante la phase mobile. Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

### III.2. Dégazeur

Comme son nom l'indique, ce composant permet de retirer le gaz (oxygène) présent dans le(s) solvant(s) afin d'éviter d'endommager les échantillons ou la phase stationnaire. Deux types de dégazeurs sont utilisés en HPLC :

- Dégazeur à gaz inerte : On fait barboter un gaz inerte dans la PM (Phase Mobile) pour retirer le gaz dissous dans le liquide. L'hélium est le gaz inerte le plus utilisé pour cette application.
- Dégazeur par vide : Cette méthode consiste à descendre en pression dans une enceinte où se trouve le solvant à l'aide d'une pompe à vide primaire, et ainsi séparer le gaz dissous dans le fluide. Elle est bien plus efficace, ne requiert plus de gaz inerte, et remplace de plus en plus l'ancienne technique dans le domaine de l'analyse HPLC. La pression dans l'enceinte est de l'ordre du millibar.

### III.3. La pompe

C'est la partie qui sert à stocker l'éluant et à l'injecter sous pression dans la colonne. Les pompes demeurent la partie la plus délicate de l'appareillage car elles doivent répondre à des critères rigoureux :

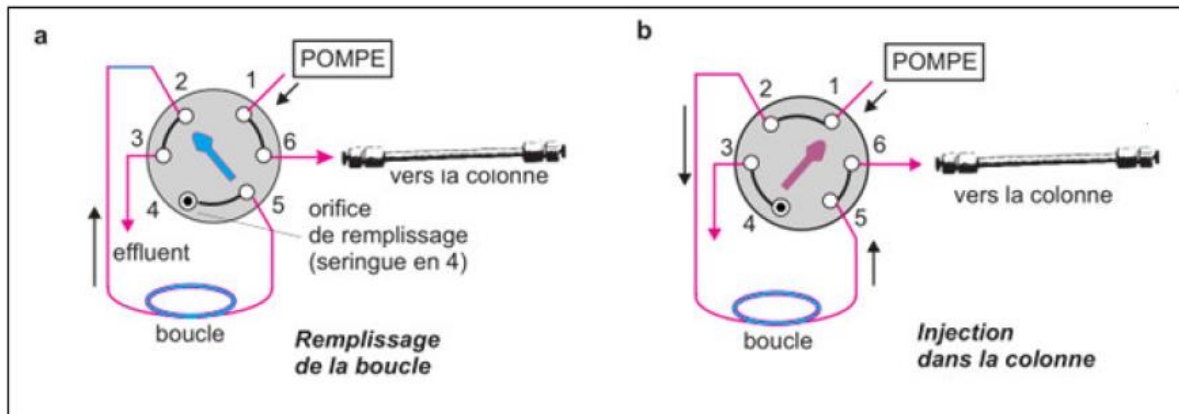
- Obtention de pressions pouvant aller jusqu'à 420 bars,
- Débit compris entre 0,1 et 10 mL.min<sup>-1</sup> et le plus régulier possible,
- Résistance à la corrosion quel que soit le solvant utilisé ...

Les pompes les plus utilisées comportent deux pistons, ce qui permet de régulariser le débit. Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer 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.

### III.4. L'injecteur

L'injecteur le plus courant est une vanne d'injection à boucle représenté ci-dessous :



### injecteur à boucle

**Dans la position remplissage :** la vanne fait communiquer la pompe et la colonne. L'échantillon, en solution, est introduit à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle.

**Dans la position injection :** après rotation de la vanne, la phase mobile entraine l'échantillon en tête de colonne. L'injection doit se faire en un temps très bref afin de perturber le moins longtemps possible le régime établi dans la colonne et le détecteur. Il faut introduire en tête de colonne, sans stopper la circulation de la phase mobile, un volume précis d'échantillon (compris entre 5 et 500  $\mu\text{L}$ ), là où la pression dépasse souvent 104 kPa.

### III.5. La colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. La phase stationnaire est maintenue entre deux disques poreux situés aux extrémités. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .



### III.6. Détecteurs

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule.

Il existe plusieurs détecteurs utilisés en HPLC :

- réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes
- Electrochimique
- fluorimétrie...

Ainsi que différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse
- Résonance Magnétique Nucléaire...
- 

### IV. Interaction moléculaire entre phase mobile et soluté

- Interactions diélectriques
- Liaisons H
- Forces de van de waals

### VI.1. Force éluante et polarité

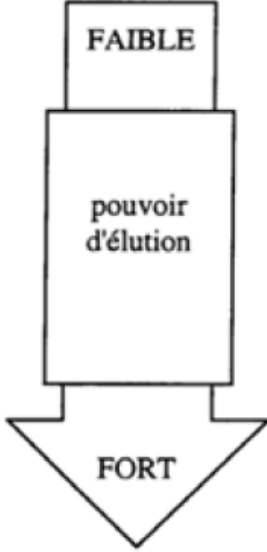
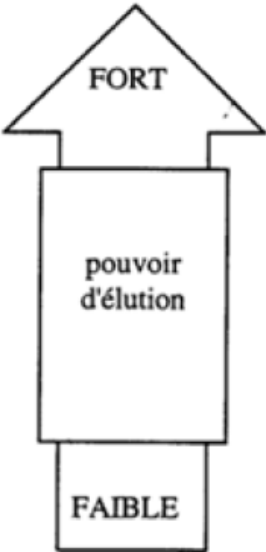
**Pour les composés polaires :**

- 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 peu polaires :**

Plus la phase mobile sera polaire, moins elle va entraîner les solutés et inversement.

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile.

phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

pouvoir d'élution de la phase mobile en HPLC

## VI.2. Polarité de Snyder

On mesure le coefficient de distribution entre le solvant étudié et différentes phases stationnaires.

**Exemple :** éthanol : donneur de protons, dioxane : accepteur de protons, nitrométhane : moment dipolaire élevé.

La polarité globale d'un mélange de 3 solvant sera  $P' = \log K_1 + \log K_2 + \log K_3$

En normant  $X_1 + X_2 + X_3 = 1$  alors  $X_1 = \log K_1 / P'$

**k'** : facteur de capacité du soluté.

**P'** : La polarité globale.

**X** : coefficient de distribution.

## V. Mécanismes d'interaction avec la colonne

On distingue quatre types de chromatographie selon la nature de la phase stationnaire :

- Chromatographie d'adsorption
- chromatographie de partage
- chromatographie par exclusion de taille
- chromatographie par échange d'ions.



## V.1. Chromatographie d'adsorption

### • L'adsorption

L'adsorption est un phénomène de surface par lequel des molécules se fixent sur la surface d'un adsorbant, selon divers processus plus ou moins intenses. Pour que cette adsorption soit utilisable à des fins préparatoires, il faut que cette fixation soit réversible.

Le phénomène inverse, par lequel les molécules adsorbées sur une surface s'en détachent se nomme la désorption.

### • La chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption est la plus ancienne méthode de chromatographie (TWSETT, 1906). Elle s'applique à la plupart des composés organiques de masses molaires inférieures à 3000 et ceci d'autant mieux que ces masses sont plus élevées. Cette chromatographie liquide-solide 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 à 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.

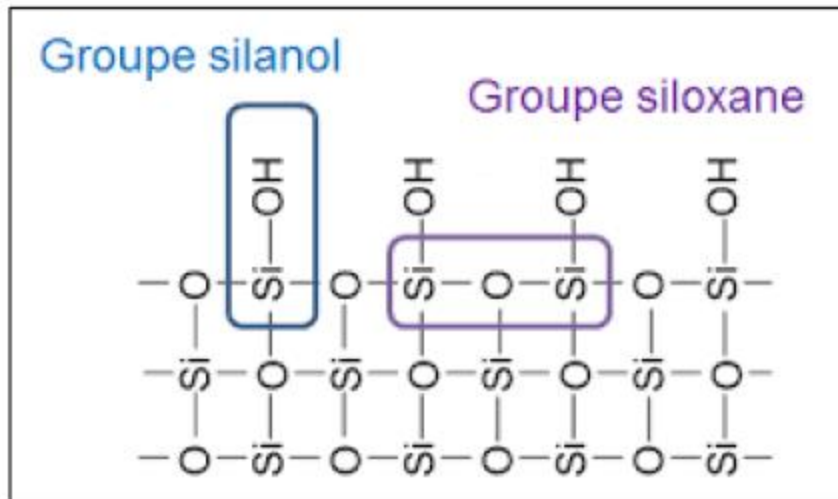
### • Les adsorbants

La surface spécifique des adsorbants correspond à leur surface d'adsorption par unité de masse. Elle est liée à leur granulométrie et à leur porosité. Une grande surface spécifique est naturellement souhaitable car elle permet d'obtenir de meilleures séparations tout en diminuant la longueur des colonnes (important en CL).

L'adsorbant doit être pratiquement insoluble dans les solvants et éluant utilisés d'une part et présenter, d'autre part, une inertie chimique vis-à-vis des solutés. L'origine des adsorbants est très diverse. Les poudres de charbon végétal ou animal sont parfois utilisées mais elles présentent un trop grand pouvoir adsorbant. C'est parmi les oxydes, les hydroxydes et les sels minéraux insolubles que l'on trouve la plus grande majorité des adsorbants. Ceux que l'on emploie le plus couramment sont :

- **La silice (SiO<sub>2</sub>)** : Souvent désignée aussi sous le terme de gel de silice (silice plus ou moins hydratée (4 % H<sub>2</sub>O), provenant de la déshydratation de l'acide silicique). Elle se présente sous forme d'une poudre blanche de très fines granulométries.

**Le mécanisme de rétention** sur cet adsorbant est maintenant admis comme résultant de la présence, à sa surface, de groupes **silanols (-OH)** et de groupes **siloxanes (-O-)** qui expliquent sa polarité, son caractère acide et la possibilité de former des liaisons hydrogènes.



représentation du gel de silice

**L'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )** : Elle s'obtient par déshydratation de l'hydroxyde ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ). Selon sa préparation, elle renfermera un certain nombre de molécules d'eau liées ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ).

La silice convient pour les solutés qui sont des bases (les amines aliphatiques et aromatiques). Inversement, l'alumine convient bien pour la séparation des solutés acides comme : les phénols et les acides carboxyliques. Pour ces deux supports les molécules polaires sont toujours les plus adsorbés.

A côté de ces adsorbants, on peut encore citer les **sels de calcium** (phosphates et carbonates), les **oxydes de magnésium**, les **silicates de magnésium** ainsi que des adsorbants organiques tels que l'urée, polyamide, saccharose et dérivés du polystyrène.

Pour des molécules très polaires la chromatographie d'adsorption n'est pas adéquate car il y a une très forte rétention d'où la nécessité d'utiliser la chromatographie de partage.

#### • Phase mobile

Il faut que le soluté soit soluble dans l'éluant pour que la migration se fasse et il est possible de faire des mélanges de solvants pour changer sa polarité. Sous réserve de leur miscibilité et de leur compatibilité avec le système de détection pour obtenir de bonne séparation.

La plupart des séparations chromatographiques s'effectuent en adaptant la polarité de la phase stationnaire à celle du soluté, on utilise par contre une phase mobile dont la polarité est extrêmement différente.

Moins un composé est polaire, moins il s'accroche à l'adsorbant, plus il migre avec l'éluant et plus un composé est polaire, plus il s'accroche à l'adsorbant, moins il migre avec l'éluant.

## V.2. Chromatographie de partage

### • Principe

La chromatographie de partage est la technique de chromatographie liquide, la plus utilisée.

Elle fonctionne par partage de solutés entre deux phases non miscibles l'une mobile et l'autre stationnaire.

La phase stationnaire peut-être un film liquide imprégné sur un support en principe inerte (la silice perd ses propriétés adsorbantes par saturation des sites d'adsorption) mais il a tendance à être emporté avec la phase mobile ("lessivage", "bleeding"), ou une phase organique fixée par liaison chimique covalente sur un support (phase greffée).

Il s'établit un équilibre qui dépend de la solubilité relative du soluté dans les deux solvants donc du coefficient de partage. La séparation de deux ou plusieurs corps sera d'autant efficace que leurs coefficients de partage respectifs seront différents. Ce mécanisme est surtout utile pour la séparation de molécules très polaires de **masses molaires inférieures à 3000** et aux homologues d'une même série, mal séparés par chromatographie d'adsorption.

### • Support

Les supports sont inertes vis-à-vis des composés à séparer. Ils ne servent qu'à immobiliser, par adsorption ou formation de liaisons chimiques covalentes, la phase stationnaire liquide.

Ce sont des solides très finement divisés qui présentent une très grande surface afin de retenir, sous un petit volume, une grande quantité de phase stationnaire. Il est nécessaire que leurs rétention soit énergique et qu'ils ne réagissent pas avec le soluté. Leurs propriétés d'adsorption doivent être totalement masquées. Les phases stationnaires décrites en chromatographie d'adsorption peuvent être utilisées comme support.

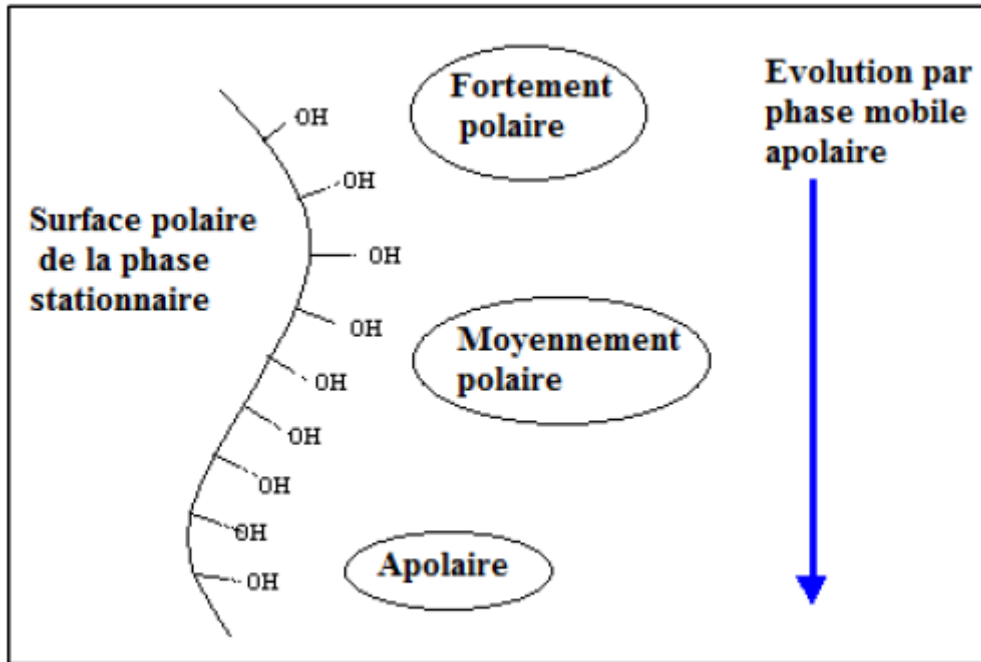
### • Types de chromatographie de partage

Selon la polarité de la phase stationnaire et mobile on peut distinguer :

#### - Chromatographie de partage sur phase normale.

**La phase stationnaire** est polaire, de nature hydrophile, avec des groupements : amine :  $\text{NH}_2$ , nitrile :  $\text{CN}$ , dialcool :  $(\text{CHOH})\text{CH}_2\text{OH}$ , greffés sur la silice.

**La phase mobile** est un solvant apolaire, de nature lipophile, l'hexane ou l'éther isopropylique  $(\text{CH}_3)_2\text{CHOCH}(\text{CH}_3)_2$ . En chromatographie à phase normale, le constituant le moins polaire est élué le premier, l'augmentation de polarité de la phase mobile réduit son temps d'élution.

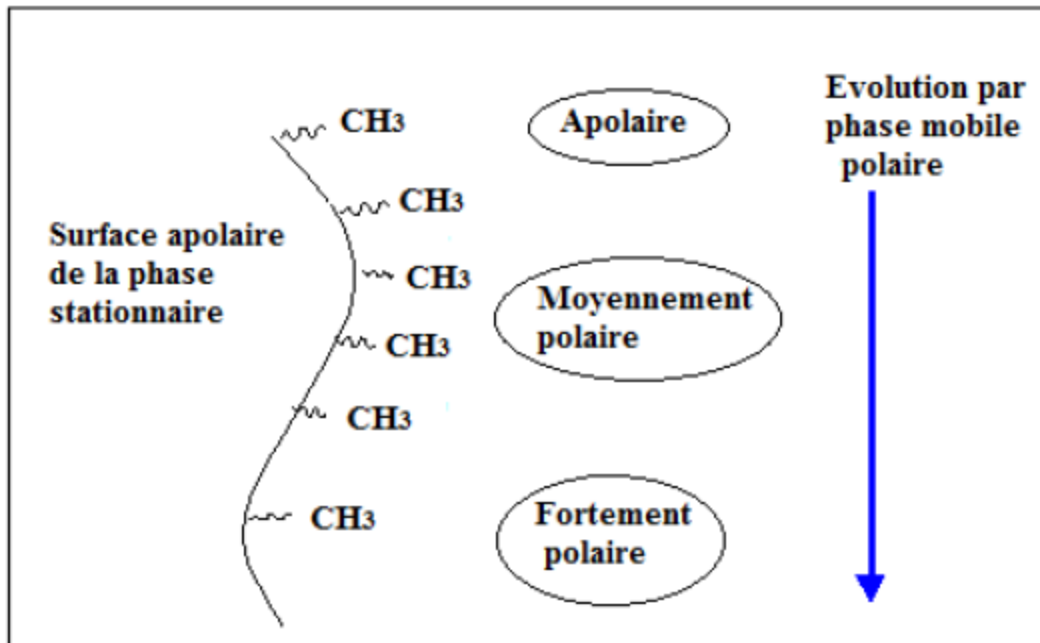


### chromatographie de partage sur phase normale

#### - Chromatographie de partage sur phase inversée

C'est la **phase stationnaire**, constituée souvent d'un hydrocarbure qui est apolaire, de nature lipophile avec des chaînes alkyles de C4 à C30, des groupements propyle, phényle ou diphényle.

**La phase mobile** est un solvant polaire, tel l'eau, le méthanol, ou le cyanure de méthyle (acétonitrile). Dans ces systèmes, le solvant le plus polaire (l'eau) est le moins éluant et la force éluante de la phase mobile est augmentée par ajout d'un solvant organique (méthanol, acétonitrile), le constituant le plus polaire est élué le premier et l'augmentation de polarité de la phase mobile allonge son temps d'éluion.

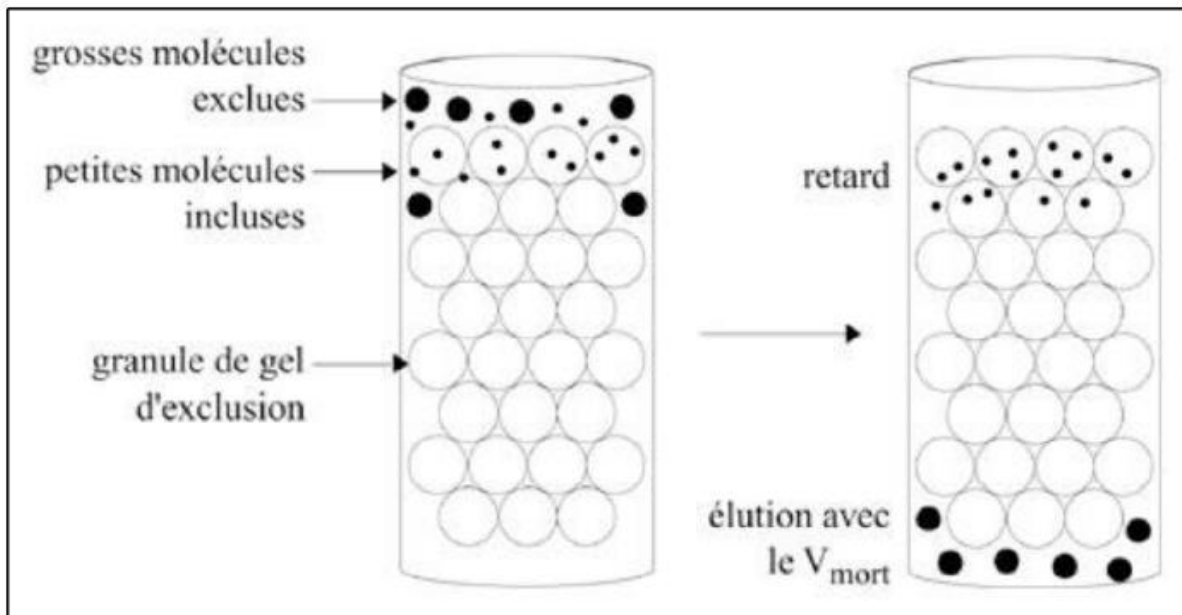


### chromatographie de partage sur phase inverse

#### V.3. chromatographie d'exclusion sur gel

##### • principe

La chromatographie d'exclusion, ou gel filtration ou gel perméation est fondée sur la "rétention" des molécules de soluté en fonction de leur taille en raison de leur pénétration dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée. Si on suppose que les molécules de soluté ne présentent aucune affinité pour les parois de la phase stationnaire particulière, les grosses molécules ne pourront pas pénétrer dans les pores, elles migreront plus rapidement que les petites molécules qui peuvent, quant à elles, pénétrer dans un plus grand nombre de pores. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.



### la chromatographie d'exclusion stérique

- **La phase stationnaire**

**La phase stationnaire** est généralement un polymère poreux dont les pores ont des dimensions choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer.

Dans cette technique le matériel servant de base est un gel. La filtration de gel est une chromatographie d'exclusion sur un support hydrophile qui est utilisé pour séparer des espèces polaires. Tandis que la perméation de gel est une chromatographie d'exclusion sur un support qui est utilisée pour séparer des espèces non polaires.

On distingue les gels mous, semi-rigides et rigides :

- **Les gels mous** : structures faiblement réticulées et capables d'absorber dans leurs pores de grandes quantités de solvant. Ils gonflent de plusieurs fois leurs volumes secs et leurs porosités augmentent en proportion du volume du solvant absorbé. Ils s'utilisent principalement avec des solutions aqueuses (chromatographie de filtration sur gel). Il s'agit le plus souvent de dextrane rendu insoluble dans l'eau par réaction à l'épichlorhydrine. Il existe des gels dont le polymère est du polyacrylamide et des gels mixtes composés d'acrylamide et de dextrans.

- **Les gels semi rigides** : ils sont produits par polymérisation, ce sont des dérivés du vinylbenzène en présence d'agent réticulant. On les utilise principalement avec des solvants organiques : gels de polystyrène, ce type de gel possède des propriétés remarquables et ne

gonfle pratiquement pas, il peut être utilisé dans la plupart des solvants sauf : l'eau, les alcools, l'acétone, l'acide formique. Il est utilisable en haute pression.

- **Les gels rigides** : Ils sont constitués par des silices poreuses ou des verres poreux. Ils ont évidemment des sites d'adsorption (groupements hydroxyles) qui peuvent retarder excessivement les espèces polaires. On modifie alors chimiquement la silice.

#### • La phase mobile

En chromatographie d'exclusion sur gel, le choix de la phase mobile ne s'effectue plus selon la polarité du solvant comme dans le cas de la chromatographie de partage et celui de la chromatographie d'adsorption. En effet, la phase mobile doit surtout être capable de dissoudre l'échantillon et être suffisamment semblable à la phase stationnaire afin de la mouiller et d'éviter l'adsorption. Lorsque le gel est mou, le solvant doit aussi le gonfler puisque la taille des pores de ce gel dépend de la quantité de solvant imbibée. Dans le cas idéal, la phase mobile, le solvant piégé et le gel doivent interagir de manière identique avec les molécules du soluté, ainsi, on peut être sûr que son déplacement dans les pores ne se fait que par diffusion. Il faut aussi que le solvant soit compatible avec l'appareillage et le détecteur si l'on en fait usage directement.

### V.4. La chromatographie sur échangeurs d'ions

#### • Principe

La chromatographie à échange d'ions (ou chromatographie à ions ou chromatographie échangeuse d'ions) est un type de chromatographie en phase liquide permettant d'isoler une substance chargée électriquement d'un mélange de molécules chargées (liquide).

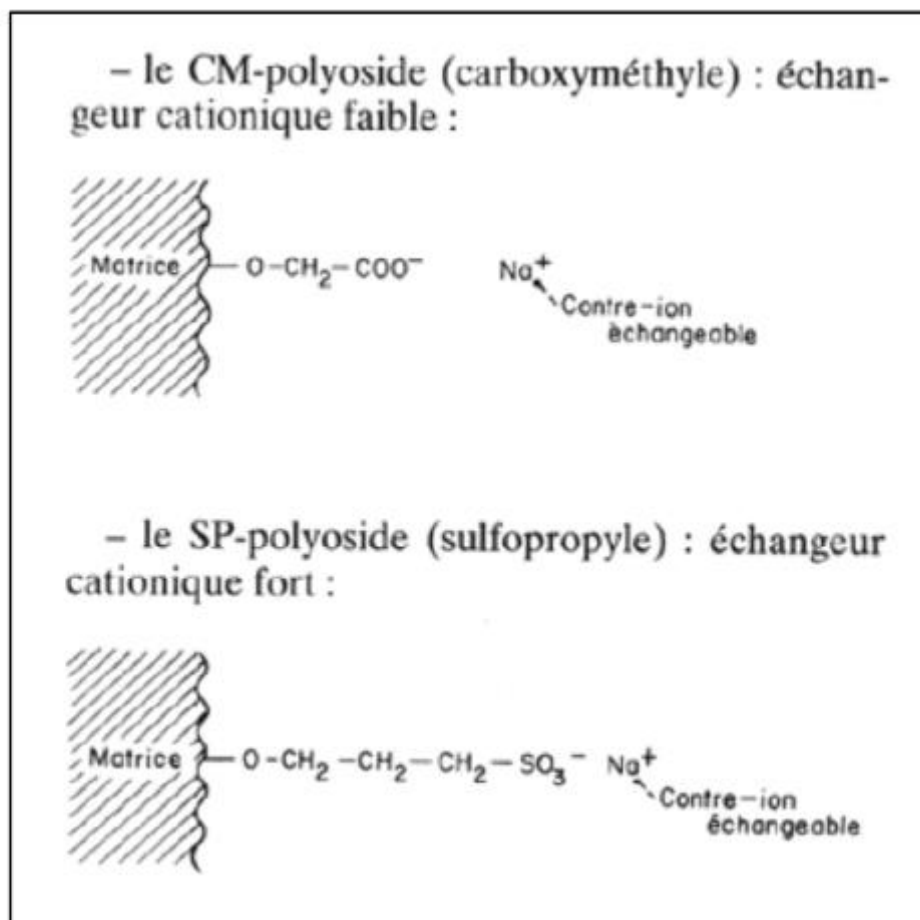
La séparation des composés est assurée dans tout système chromatographique par la phase stationnaire qui, dans le cas de la chromatographie ionique (CI) est une résine échangeuses d'ions. Cette phase stationnaire est un support solide comportant des groupes fonctionnels ionisés chargés soit positivement (pour séparer les anions) soit négativement (pour séparer les cations). L'éluant emporte les anions ou les cations à séparer. Selon que l'interaction électrostatique entre la résine de la colonne et les ions à séparer est plus ou moins forte, la séparation se fera plus ou moins facilement.

### • La phase stationnaire

En chromatographie ionique la phase stationnaire est une résine échangeuse d'ion. Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution. L'échangeur d'ions comporte deux parties : Les groupements fonctionnels qui lui confèrent ses propriétés et la matrice (support fixe) sur laquelle ces derniers sont greffés.

Les groupements fonctionnels sont fixés par des liaisons covalentes sur la matrice, ils sont de deux types :

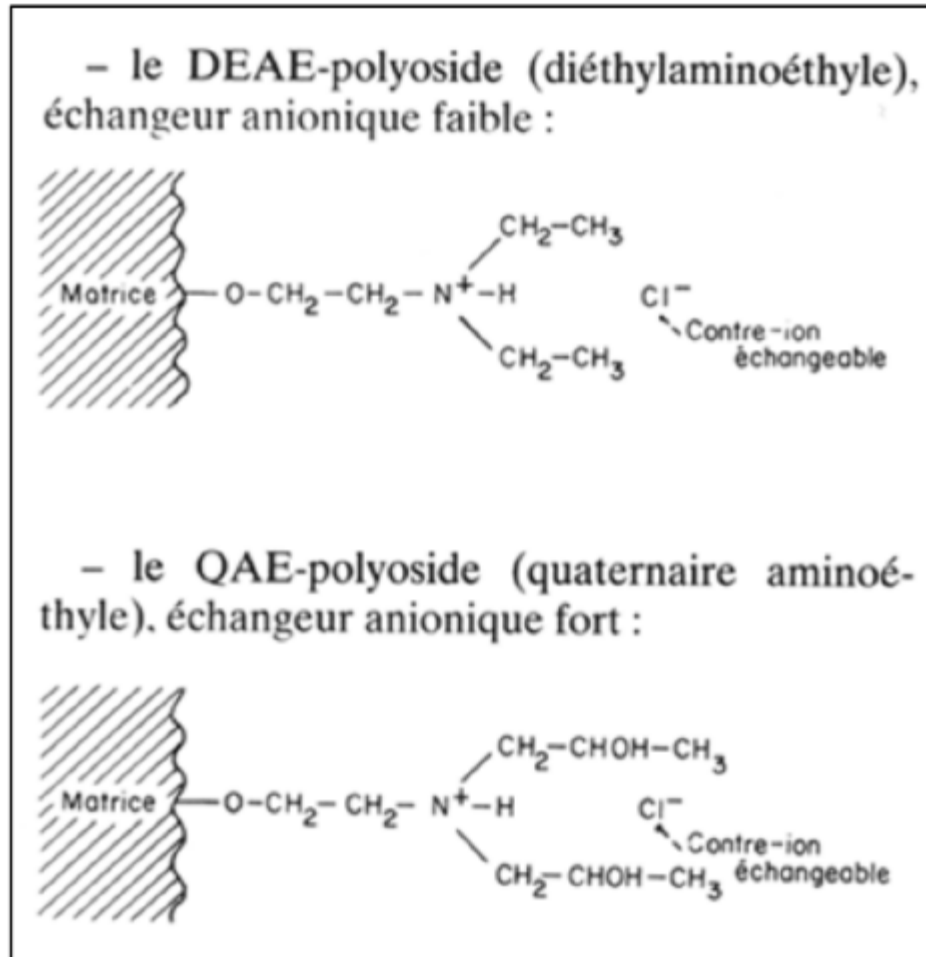
- **Les échangeurs de cations portent des groupements chargés négativement (-)** : Le groupement négatif, habituellement la base conjuguée d'un acide (carboxylique ou sulfonique), est lié à la résine (souvent un polymère organique) de façon covalente et est en général sous forme protonnée avant utilisation (c'est donc le cation  $H^+$  qui est alors échangé). L'échange se fait suivant l'équation



**échangeurs cationiques**



Les échangeurs d'anions portent des groupements chargés positivement (+) : Le groupement positif, habituellement une amine ou un ammonium est lié à la résine (souvent un polymère organique) de façon covalente. L'échange se fait suivant l'équation



### échangeurs anioniques

Les groupements fonctionnels cationiques et anioniques sont classés selon leur aptitude à l'ionisation :

- Les groupements sont dit forts car leur capacité d'échange est constante et indépendante du pH (ex : résine cationique SO<sub>3</sub> acide sulfonique, résine anionique N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> ammonium quaternaire).
- les groupements faibles ne sont pas ionisés à un certain pH (ex : résine cationique COO groupement carboxylique, résine anionique NH<sub>3</sub><sup>+</sup> amine primaire).

**• Support**

**Les supports peuvent être de deux types** : minéraux comme la silice et organiques comme la résine polystyrénique, cellulose, dextrane.

Les phases stationnaires les plus connues sont obtenues par copolymérisation styrène/divinylbenzène afin d'obtenir des phases réticulées, résistantes à l'écrasement. Elles se présentent sous forme de particules sphériques d'un diamètre de quelques micromètres. Ces particules sont ensuite greffées pour en faire des polyanions ou polycations.

**• La phase mobile**

La plupart des séparations utilisant les résines échangeuses d'ions s'effectuent avec une solution aqueuse en raison des propriétés de solubilisation et d'ionisation de l'eau.

Toutefois, il peut être nécessaire d'utiliser des mélanges de solvants polaires (méthanol-eau) afin d'optimiser une élution ou faciliter la solubilité de certains solutés.

L'élution est assurée par déplacement des équilibres : soit par la présence d'un ion ayant plus d'affinité pour la résine, soit par l'élévation des concentrations en ions  $\text{H}^+$  ou  $\text{OH}^-$ , soit, dans le cas des échangeurs faibles, par modification du pH qui agit ainsi sur l'ionisation aussi bien des groupements échangeables de la résine que de ceux des solutés.

**Comparaison entre la CG et la CL****Avantages CL/CG**

- température plus importante
- débit constant de phase mobile dans la colonne
- grand choix de phase mobile et stationnaire

**inconvénient CL/ CG**

- coefficient de diffusion dans la phase mobile importante.
- la vitesse d'échange entre le soluté et la phase mobile liquide est plus lente que celle entre le soluté et la phase stationnaire ; le temps d'analyse est plus long.

La pression dans la colonne est élevée en HPLC (la viscosité est 100 fois plus faible pour un gaz).

## La chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC en anglais)

### I. Introduction

Cette technique est basée essentiellement sur des phénomènes d'adsorption et sur le principe de la capillarité. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve chromatographique, l'éluant monte à travers la phase stationnaire (PhS).

Mais, en fonction de sa densité, de sa solubilité dans la phase mobile et des forces électrostatiques retenant le composant sur la PhS, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse dans l'absorbant.

#### Exemple :

La figure ci-dessous représente la séparation des composés colorants alimentaires par Chromatographie sur couche mince.



Expérience représentant la séparation des colorants sur une plaque CCM

Le contenant sera une cuve chromatographique, à savoir un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

On va devoir gérer 3 éléments bien définis :

### II. La phase mobile (PhM)

Egalement appelée éluant : c'est un solvant (ou un mélange de solvants), qui progresse le long d'une phase dite « stationnaire », fixée sur un support, en entraînant les composants de l'échantillon.

Selon le type d'analyse à réaliser, le choix de l'éluant sera variable :

Pour les hydrocarbures : hexane, éther de pétrole ou benzène

- pour des groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole, mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique.
- Pour des composés polaires : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol.

### III. La phase stationnaire (PhS)

C'est une couche d'environ  $\frac{1}{4}$  d'un adsorbant qui est fixée sur une plaque de verre (ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium, voire même sur une feuille de papier), à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre), l'amidon ou un polymère organique. Après le dépôt de l'échantillon sur la PhS, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

L'échantillon

Il est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : les plus utilisés sont le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution (1 cm<sup>3</sup> max.) est déposée sur la plaque, à environ 1 cm de la partie inférieure.

#### Choix des conditions opératoires

##### Choix de la phase stationnaire.

Il en existe trois principaux : silice, alumine et cellulose. Les supports sont généralement montés sur une plaque d'aluminium. Certaines plaques possèdent un colorant incolore en lumière naturelle mais de couleur verte en UV (ZnS absorbant à 256 nm). Voici comment orienter son choix :

- Silice : c'est le support le plus courant. Il est conseillé de toujours commencer par celui-là.
- Alumine : on l'utilise généralement pour les composés à caractère basique.
- Cellulose : on l'utilise pour les composés fortement polaires, comme les sucres ou les acides aminés.

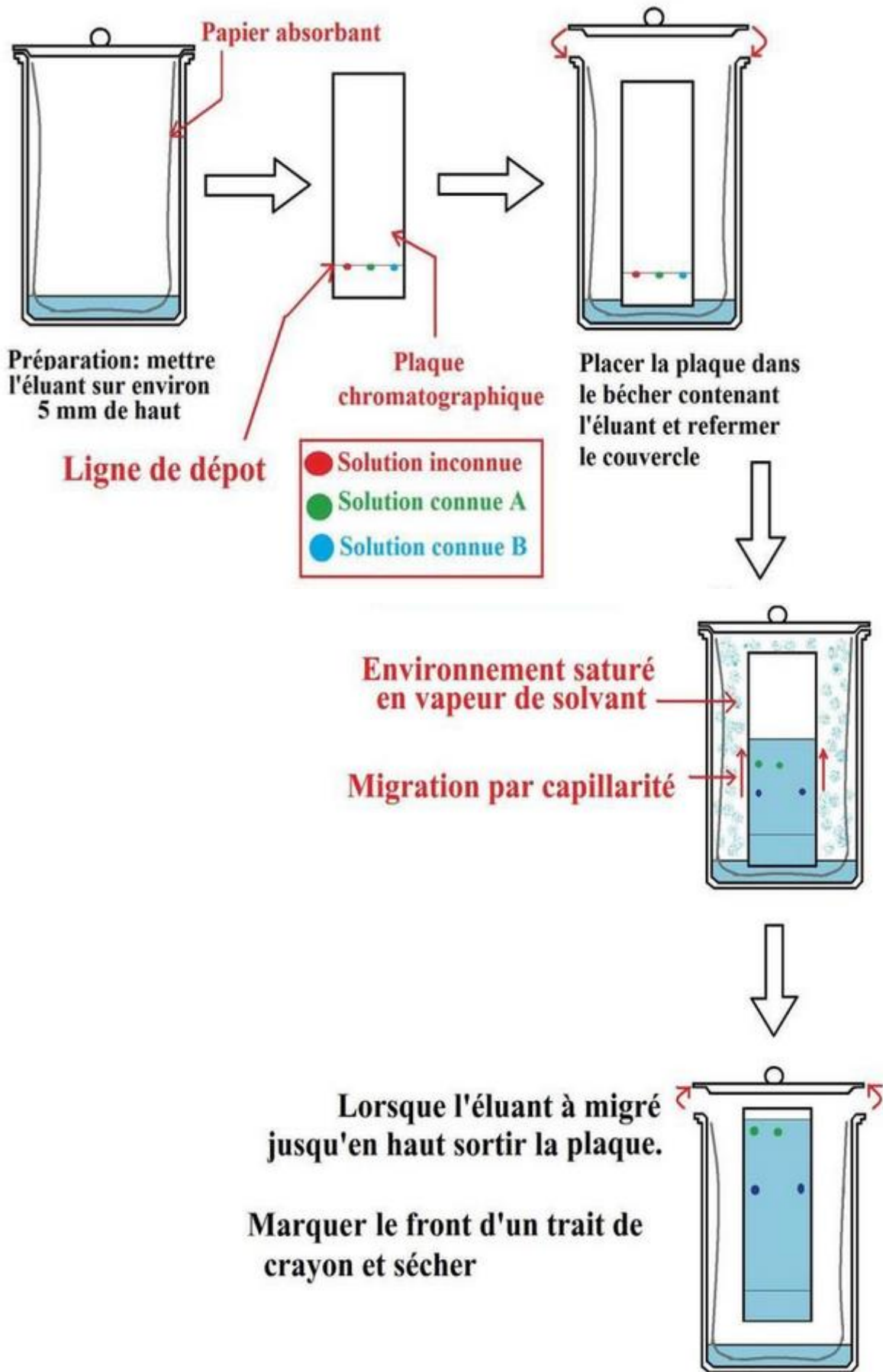
##### Choix de l'éluant

Le choix de l'éluant est essentiel. Il n'est pas toujours fourni avec le mode opératoire et il est important de savoir le choisir. L'éluant est souvent un savant mélange de plusieurs (2 ou 3) solvants dans des proportions bien établies. Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'éluant et le soluté (mélange de composés à séparer):

- **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.

##### Réalisation d'une CCM

La CCM se déroule en trois étapes : préparation de la cuve, préparation de la plaque, et élution. La figure (V.5) résume les étapes de réalisation d'une chromatographie sur couche mince.



**Révélation**

Certains composés sont colorés : il n'est pas nécessaire de les révéler. La plupart sont incolores. Voici quelques méthodes utilisées pour révéler les plaques.

**Révélation UV**

- Si la plaque est fluorescente, sous une lampe UV, toute la plaque apparaît verte sauf là où sont les taches que l'on entoure au crayon.
- Les dérivés aromatiques absorbent dans l'UV. Placer la plaque sous une lampe UV et entourer les taches colorées.

**Révélation à l'iode**

Beaucoup de composés organiques forment des taches jaune-marron en présence d'iode. Dans un flacon, placer la plaque et quelques cristaux d'iodes, puis boucher. Les taches apparaissent.

**V.5.1.6.3. Révélation par atomisation**

Cette technique utilise un atomiseur contenant le révélateur en solution. Selon le produit à révéler, la solution peut-être :

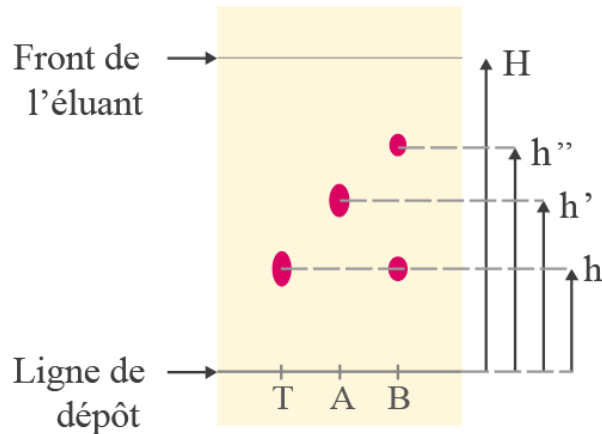
- Ninhydrine pour les acides α-aminés (taches violettes qui brunissent pour disparaître en quelques jours)
- Acide sulfurique à 50% pour à peu près tout (taches noires).
- On utilise aussi des mélanges complexes d'oxyde de molybdène en présence de sulfate de cérium.

**V.5.1.7. Calculs et interprétation**

La position finale de la tache (ou spot) est caractéristique de la molécule. On lui attribue une valeur, le  $R_F$  de Retention factor en anglais ((Retardation factor ou « référence front », « coefficient de migration ») qui a été fort habilement traduit comme Rapport frontal. Ce  $R_f$  est le rapport de la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant.

$$R_f = H/h$$

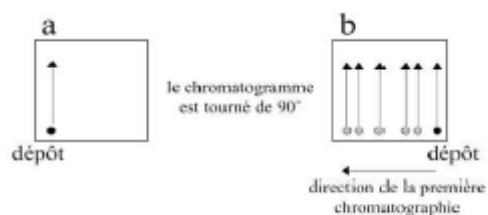
où H = hauteur d'élution du produit et h = hauteur d'élution du solvant.



La figure au-dessus montre comment déterminer le  $R_f$  dans le cas d'une chromatographie liquide ascendante: On mesure la distance  $x$  ( $H$ ) parcourue par la substance à partir de la ligne de dépôt. On mesure également la distance  $y$  ( $h$ ) parcourue par le solvant à partir de la ligne de dépôt, jusqu'au front de solvant. Le rapport  $x / y$  toujours inférieur à 1 représente le rapport frontal de la substance ( $R_f$ ).

### Chromatographie bidimensionnelle

Dans le cas où le mélange contient des solutés de mobilités voisines, on peut augmenter le pouvoir séparateur en réalisant une chromatographie bidimensionnelle : 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.



Chromatographie liquide-liquide bidimensionnelle

Comme indiqué la figure au-dessus, on commence par réaliser la chromatographie de façon classique avec un certain système de solvants. Nous aurons donc une première séparation. La plaque est ensuite tournée à  $90^\circ$  et une nouvelle élution est réalisée avec un autre système de solvants (b).