

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubekr BELKAÏD - TLEMCCEN

Faculté des Sciences

Faculty of Sciences

Département de Chimie

كلية العلوم

Cours : Les différentes méthodes d'analyse chromatographique

Adressé aux étudiants niveau : Master (M1et M2)

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité :

Etabli Par :

Dr. TABET ZATLA Amina

Année : 2024-2025

Faculté des Sciences - Tidjani HADDAM

Tél: 043 21 63 70 / Tél&Fax: 043 21 63 68 / 043 21 63 71

Site Web: www.fs.univ-tlemcen.dz

Email : vdrpg.facscience@gmail.com



FACULTÉ DES SCIENCES

Faculty of Sciences

كلية العلوم



Faculté des Sciences - Tidjani HADDAM

Tél: 043 21 63 70 / Tél & Fax: 043 21 63 68 / 043 21 63 71

Site Web: www.fs.univ-tlemcen.dz

Email: vdrpg.facscience@gmail.com

AVANT-PROPOS

Le présent polycopié de cours que je présente, est destiné aux étudiants des unités d'enseignement et de recherche scientifique et pharmaceutique, en priorité aux étudiants du second cycle (M1 et M2), et même ceux en Licence : chimie, biologie, pharmacie et agro-alimentaire, ainsi qu'au large public de professionnels et de chercheurs.

Il porte essentiellement sur les différentes méthodes de séparations et d'analyses chromatographiques couramment utilisées au laboratoire. D'autant plus qu'un chimiste est toujours confronté au problème de la séparation des différents constituants d'un mélange durant l'analyse de substances inconnues.

Pour cela, un rappel des généralités sur les méthodes de séparation classiques est abordé dans le premier chapitre.

Le chapitre II traite les notions fondamentales de la chromatographie.

Le chapitre III concerne la chromatographie liquide classique (la chromatographie sur couche mince, la chromatographie sur papier, la chromatographie sur colonne),

Le chapitre IV engendre plusieurs parties :

1. Chromatographie liquide haute performance
2. Chromatographie d'adsorption
3. Chromatographie de partage
4. Chromatographie d'échange d'ions
5. Chromatographie d'exclusion
6. Chromatographie d'affinité
7. Chromatographie chirale

Le chapitre V est consacré à la chromatographie en phase gazeuse, le chapitre VI concerne la chromatographie en phase supercritique, et enfin des notions sur l'électrophorèse capillaire seront abordées au chapitre VI.

Chaque chapitre sera complété par quelques exercices avec une brève correction.

Table des matières

| | |
|--|------------|
| AVANT-PROPOS | I |
| Table des matières | II |
| Liste des figures | VII |
| Chapitre I : Généralités sur les méthodes de séparation classiques | 1 |
| 1. Introduction | 1 |
| 2. Filtration | 4 |
| 3. Centrifugation | 5 |
| 4. Distillation | 6 |
| 5. Extraction | 8 |
| 5.1. Extraction Liquide-Liquide : | 9 |
| 5.2. L'extraction solide-liquide | 9 |
| 6. Cristallisation | 10 |
| 6.1. Cristallisation à partir d'une phase vapeur suivie par une condensation solide. | 10 |
| 6.2. Cristallisation par refroidissement: | 10 |
| 6.3. Cristallisation par relargage : | 11 |
| 7. Constantes physique des corps organiques | 11 |
| 7.1.1. Solubilité de la substance dans différents solvants: | 11 |
| 7.1.2. Les points de fusion et d'ébullition: | 12 |
| 7.1.3. Indice de réfraction: | 13 |
| 7.1.4. Pouvoir rotatoire: | 13 |
| 7.1.5. Masse molaire: | 14 |
| 7.1.6. Odeur, couleur et densité : | 15 |
| Chapitre II : La chromatographie | 17 |
| 1. Définition | 17 |
| 2. Historique | 18 |
| 3. Principe de la séparation | 18 |
| 4. Classification des méthodes chromatographiques | 19 |
| 4.1. Classification selon la nature physique des phases. | 19 |
| 4.2. Classification selon le phénomène mis en œuvre: | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 5. Choix de la méthode chromatographique | 21 |
| 6. Grandeurs chromatographiques | 21 |
| 7. Effet de la vitesse d'élution sur l'efficacité de la colonne; Equation de Van Deemter | 25 |
| 8. Optimisation d'une analyse chromatographique | 26 |
| Chapitre III : Chromatographie Liquide Classique | 30 |
| 1. Chromatographie sur couche mince | 30 |
| 1.1. Définition | 30 |
| 1.2. Appareillage | 30 |
| 1.3. Étapes de séparation | 31 |
| 1.3.1. Dépôt de l'échantillon : | 31 |
| 1.3.2. Développement de la plaque CCM: | 31 |
| 1.3.3. Révélation de la plaque CCM: | 32 |
| 1.3.4. CCM bidimensionnelle : | 33 |
| 1.3.5. Paramètres de séparation et de rétention: | 33 |
| 1.4. Applications | 34 |
| 2. Chromatographie sur papier | 35 |
| 2.1. Définition | 35 |
| 2.2. Principe | 36 |
| 2.3. Papier | 36 |
| 2.4. Applications | 36 |
| 3. Chromatographie sur colonne conventionnel | 36 |
| 3.1. Description de la méthode | 37 |
| 3.2. Phase stationnaire | 37 |
| 3.3. Eluant | 37 |
| 3.4. La vitesse d'élution | 38 |
| 3.5. Dimension de la colonne | 38 |
| 3.6. L'opération de remplissage | 39 |
| 3.7. Dépôt de l'échantillon | 39 |
| 3.8. L'alimentation en solvant | 40 |
| 3.9. Analyses des fractions | 40 |
| 3.10. Les inconvénients de la chromatographie sur colonne | 40 |

| | |
|--|-----------|
| Chapitre IV : Chromatographie Liquide Haute Performance | 45 |
| 1. La Chromatographie Liquide Haute Performance | 45 |
| 1.1. Introduction | 45 |
| 1.2. Appareillage | 45 |
| 1.3. Réservoir de solvants | 46 |
| 1.4. Dispositif de dégazage | 46 |
| 1.5. Pompe | 46 |
| 1.6. Injecteur | 47 |
| 1.7. Colonne | 47 |
| 1.8. Détecteurs | 49 |
| 1.8.1. Photomètre UV-Visible | 49 |
| 1.8.2. Réfractomètre différentiel | 49 |
| 1.8.3. Détecteur fluorimétrique | 49 |
| 1.8.4. Détecteur électrochimique | 50 |
| 1.9. Interactions moléculaires entre phase mobile et soluté | 50 |
| 1.10. Force éluant et polarité | 50 |
| 1.11. Applications | 51 |
| 2. Chromatographie d'adsorption | 51 |
| 2.1. L'adsorption | 51 |
| 2.2. La Chromatographie d'adsorption | 51 |
| 2.3. Les adsorbants | 51 |
| 2.4. Phase mobile | 52 |
| 2.5. Applications | 53 |
| 3. La chromatographie de partage | 53 |
| 3.1. Introduction | 53 |
| 3.2. Support | 54 |
| 3.3. Phase stationnaire | 55 |
| 3.4. Phase mobile | 55 |
| 3.5. Applications | 56 |
| 4. La chromatographie d'échange d'ions | 56 |
| 4.1. Définition | 56 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 4.2. | Principe de la méthode | 56 |
| 4.3. | La phase stationnaire | 57 |
| 4.4. | Les supports | 58 |
| 4.5. | La phase mobile | 59 |
| 4.6. | Détection | 60 |
| 4.7. | Applications | 61 |
| 5. | La chromatographie d'exclusion | 61 |
| 5.1. | Définition | 61 |
| 5.2. | Principe de la chromatographie d'exclusion | 61 |
| 5.3. | Phase stationnaire | 62 |
| 5.4. | Caractère et nature des gels | 62 |
| 5.5. | Phase mobile | 63 |
| 5.6. | Détection | 64 |
| 5.7. | Applications de la chromatographie d'exclusion | 64 |
| 6. | La chromatographie d'affinité | 65 |
| 6.1. | Introduction | 65 |
| 6.2. | Etapes d'une chromatographie d'affinité | 65 |
| 6.3. | L'interaction protéine-ligand | 67 |
| 6.4. | Phase stationnaire | 67 |
| 6.5. | Avantage et inconvénient de la méthode | 68 |
| 6.6. | Applications | 68 |
| 7. | Chromatographie chirale | 68 |
| 7.1. | Phases mobiles | 69 |
| 7.2. | Principaux détecteurs | 70 |
| Chapitre V : La chromatographie en phase gazeuse - CPG | | 79 |
| 1. | Introduction | 79 |
| 2. | Principe de la technique et appareillage | 79 |
| 3. | Description de l'appareil CPG | 79 |
| 4. | Gaz vecteur | 80 |
| 5. | Introduction de l'échantillon | 80 |
| 6. | Injecteurs et types des injecteurs | 81 |

| | |
|--|------------|
| 7. Enceinte thermostatée | 84 |
| 8. Colonnes et types des colonnes | 84 |
| 9. Phases stationnaires | 86 |
| 10. Principaux détecteurs | 88 |
| 11. Analyse qualitative/Analyse quantitative | 91 |
| 11.1. Analyse qualitative: | 91 |
| 11.2. Analyse quantitative: | 92 |
| 12. Applications | 92 |
| Chapitre VI : La chromatographie par fluide supercritique | 99 |
| 1. Introduction | 99 |
| 2. Propriétés des fluides supercritiques | 99 |
| 3. Instrumentation | 99 |
| 4. Phase mobile | 100 |
| 5. Phase stationnaire | 101 |
| 6. Comparaison de CFS avec HPLC et CPG | 101 |
| 7. Applications | 101 |
| Chapitre VII : L'électrophorèse capillaire | 103 |
| 1. Définition | 103 |
| 2. Mobilité électrophorétique et électro-osmotique | 104 |
| 2.1. Mobilité électrophorétique | 104 |
| 2.2. Mobilité électro-osmotique | 105 |
| 3. Mobilité apparente | 106 |
| 4. Modes d'injections | 107 |
| 5. Modes de détections | 107 |
| 6. Applications | 107 |
| Références bibliographiques | 109 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| FIGURE 1 : LA DISTILLATION | 2 |
| FIGURE 2 : LA CRISTALLISATION | 2 |
| FIGURE 3 : LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE | 2 |
| FIGURE 4 : METHODES DE SEPARATION SELON LA NATURE DU MELANGE..... | 3 |
| FIGURE 5 : LA FILTRATION | 4 |
| FIGURE 6 : LA CENTRIFUGATION | 5 |
| FIGURE 7 : MONTAGE CLASSIQUE DE DISTILLATION..... | 6 |
| FIGURE 8 : LE ROTAVAPEUR..... | 6 |
| FIGURE 9 : MONTAGE DE LA DISTILLATION FRACTIONNEE DU PETROLE | 7 |
| FIGURE 10 : MONTAGE DE DISTILLATION AZEOTROPIQUE | 8 |
| FIGURE 11 : L'EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE..... | 9 |
| FIGURE 12 : L'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE | 10 |
| FIGURE 13 : APPAREIL DE MESURE DE TEMPERATURE DE FUSION..... | 12 |
| FIGURE 14 : SPECTRE DE MASSE DE LA 1-PHENYL-2-PROPANONE..... | 15 |
| FIGURE 15 : COLONNE AVANT ET APRES LA SEPARATION | 17 |
| FIGURE 16 : REPRESENTATION BIDIMENSIONNELLE (P, T) DU DIAGRAMME DE PHASES D'UN CORPS PUR..... | 19 |
| FIGURE 17 : LES DIFFERENTES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES | 21 |
| FIGURE 18 : CHROMATOGRAMME D'UN CONSTITUANT | 22 |
| FIGURE 19 : LES DIFFERENTS TEMPS DE CHROMATOGRAMME..... | 22 |
| FIGURE 20 : CARACTERISTIQUES DU PIC IDEAL..... | 23 |
| FIGURE 21 : ILLUSTRATION D'UNE SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE | 24 |
| FIGURE 22 : COURBE DE VAN DEEMTER | 26 |
| FIGURE 23 : CHROMATOGRAMME AVANT ET APRES OPTIMISATION | 27 |
| FIGURE 24 : SCHEMA D'UN MONTAGE CCM | 31 |
| FIGURE 25 : SEPARATION DES CONSTITUANTS D'UN MELANGE PAR CHROMATOGRAPHIE CCM | 32 |
| FIGURE 26 : SEPARATION DES CONSTITUANTS DE DEUX MELANGES PAR CHROMATOGRAPHIE CCM | 33 |
| FIGURE 27 : PAPIER AVANT ET APRES CHROMATOGRAPHIE | 35 |

| | |
|--|----|
| FIGURE 28 : COLONNE CLASSIQUE | 39 |
| FIGURE 29 : SCHEMA D'UNE COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE..... | 40 |
| FIGURE 30 : LES COMPOSANTS D'UN CHROMATOGRAPHE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (APPAREIL DIONEX)..... | 45 |
| FIGURE 31 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN SYSTEME DE POMPAGE..... | 47 |
| FIGURE 32 : INJECTEUR A BOUCLE..... | 47 |
| FIGURE 33 : COLONNE CLHP..... | 48 |
| FIGURE 34 : COLONNE DANS UN THERMOS | 48 |
| FIGURE 35 : LES COMPOSANTS D'UN CHROMATOGRAPHE IONIQUE (APPAREIL DIONEX..... | 61 |
| FIGURE 36 : STRUCTURE CHIMIQUE DE DEXTRANE | 63 |
| FIGURE 37 : CHROMATOGRAMME FIGURANT UNE SEPARATION DE TROIS ESPECES (1, 2, 3) ET LA COURBE $\log(M) = f(V_e)$ | 65 |
| FIGURE 38 : PRINCIPE DE SEPARATION DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE | 67 |
| FIGURE 39 : SEPARATION D'UN MELANGE RACEMIQUE | 69 |
| FIGURE 40 : POUVOIR D'ELUTION..... | 69 |
| FIGURE 41 : CLASSEMENT DE POLARITE DE QUELQUES COMPOSES | 70 |
| FIGURE 42 : DETECTEUR SPECTROPHOTOMETRIQUE..... | 71 |
| FIGURE 43 : DETECTEUR REFRACTOMETRIQUE..... | 71 |
| FIGURE 44 : PHOTO D'UN APPAREIL DE CHROMATOGRAPHIE GAZ | 80 |
| FIGURE 45 : PHOTO D'UN INJECTEUR AUTOMATIQUE | 81 |
| FIGURE 46 : INJECTEUR A VAPORISATION DIRECTE..... | 82 |
| FIGURE 47 : INJECTEUR AVEC OU SANS DIVISION..... | 83 |
| FIGURE 48 : INJECTEUR A TEMPERATURE PROGRAMMABLE..... | 84 |
| FIGURE 49 : PHOTO DE COLONNES REMPLIS | 85 |
| FIGURE 50 : COLONNES CAPILLAIRES | 85 |
| FIGURE 51 : DETECTEUR | 88 |
| FIGURE 52 : DETECTEUR A IONISATION DE FLAMME..... | 89 |
| FIGURE 53 : DETECTEUR THERMO-IONIQUE..... | 90 |
| FIGURE 54 : DETECTEUR A CAPTURE D'ELECTRONS | 90 |
| FIGURE 55 : DETECTEUR A PHOTO-IONISATION | 91 |
| FIGURE 56 : CHROMATOGRAMME D'UN ECHANTILLON | 92 |

FIGURE 57 : DIAGRAMME D'EQUILIBRE DE PHASE PRESSION/TEMPERATURE DU CO₂ 100

FIGURE 58 : UNE INSTALLATION D'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE. 104

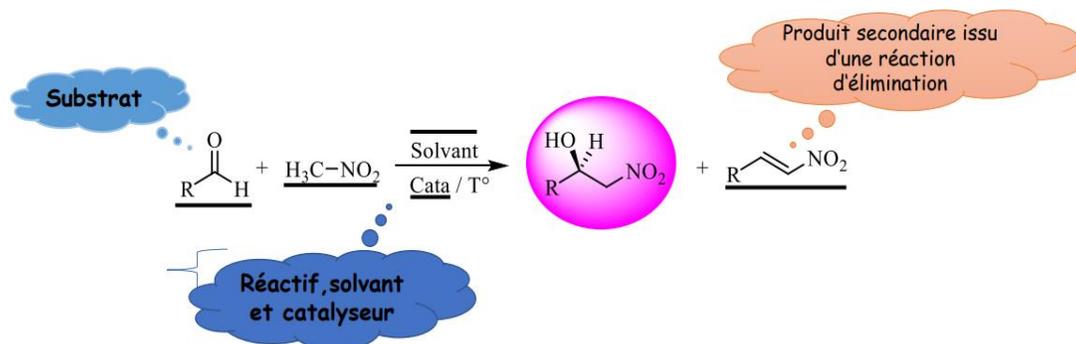
Chapitre I : Généralités sur les méthodes de séparation classiques

1. Introduction

À la fin d'une réaction chimique, le produit obtenu doit être à l'état pur en l'isolant du mélange réactionnel par une séquence d'opérations appelées collectivement « work-up »;

En plus du produit requis, la réaction peut contenir, par exemple, un solvant qui a été utilisé comme milieu de réaction, un excès de réactifs ou encore des produits de réaction indésirables.

Exemple : Réaction de nitroaldolisation de Henry



- ✓ Les techniques et les méthodes de purification sont très importantes car pour déterminer la nature, la composition, voire la structure d'une molécule, il faut que cette dernière soit à l'état pur.
- ✓ De nombreuses méthodes servent à purifier les substances organiques, les anciennes techniques telles que: **la distillation**, **la cristallisation**, **l'extraction**... restent fiables mais les nouvelles techniques telles que **la chromatographie** a connu un développement considérable; la sensibilité et la précision de cette méthode permet une large application en analyse qualitative, quantitative, purification et identification.

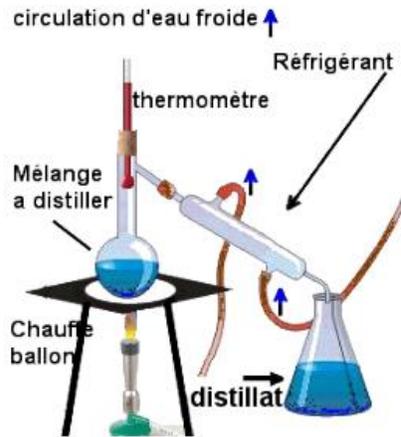


Figure 1 : La distillation



Figure 2 : La cristallisation

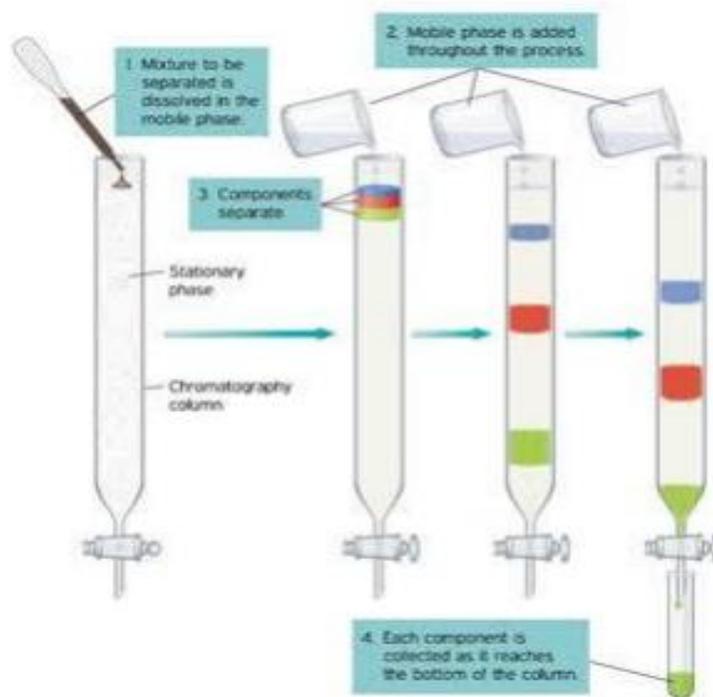


Figure 3 : La chromatographie sur colonne

- ✓ Les premières opérations de purification sont simples. Elles permettent de séparer en fractions homogènes, solides ou liquides des produits qui sont encore des mélanges. Nous avons réuni les principales méthodes de séparation dans les histogrammes suivants selon la nature du mélange réactionnel:

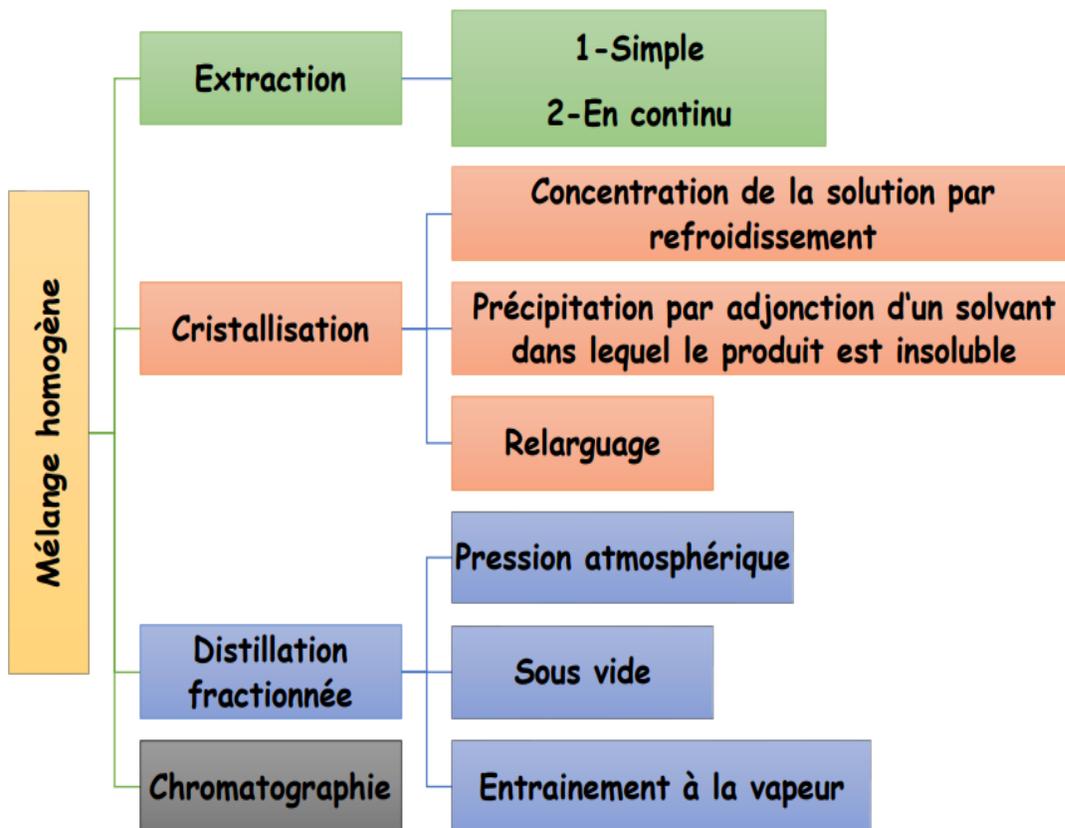
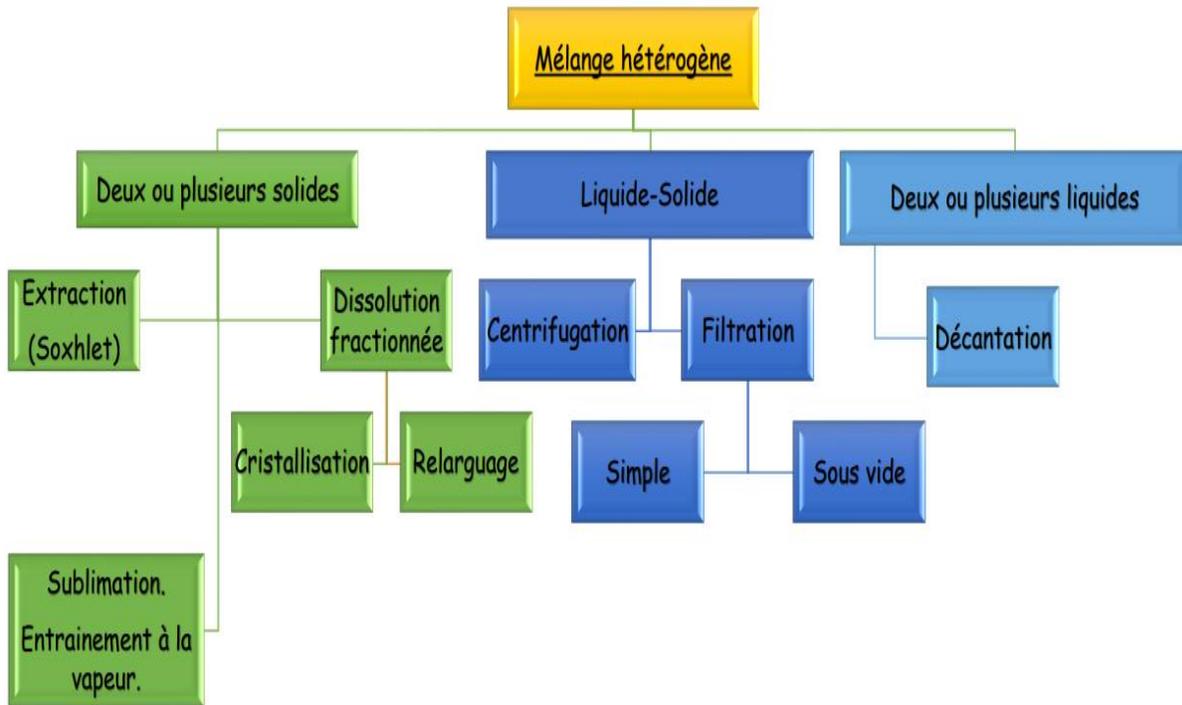
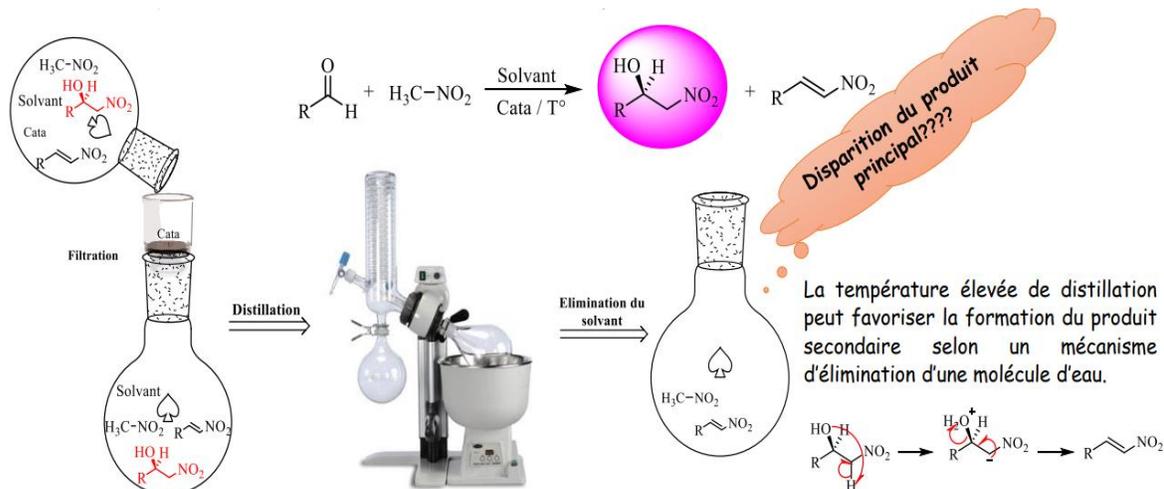


Figure 4 : Méthodes de séparation selon la nature du mélange

- ✓ Le choix des opérations de purification est très important, l'utilisation des procédures irréfléchies peut entraîner la perte du produit essentiel par décomposition lors d'une tentative d'isolement.

Exemple: Réaction de nitroaldolisation de Henry



2. Filtration

- ✓ La **filtration** est une méthode de purification d'un mélange possédant deux phases, l'une est liquide et l'autre est solide par le biais d'un milieu poreux. Le liquide ayant subi la filtration est nommé **filtrat** ou **perméat**, tandis que la fraction retenue par le filtre est nommé **résidu**, **rétenant**.

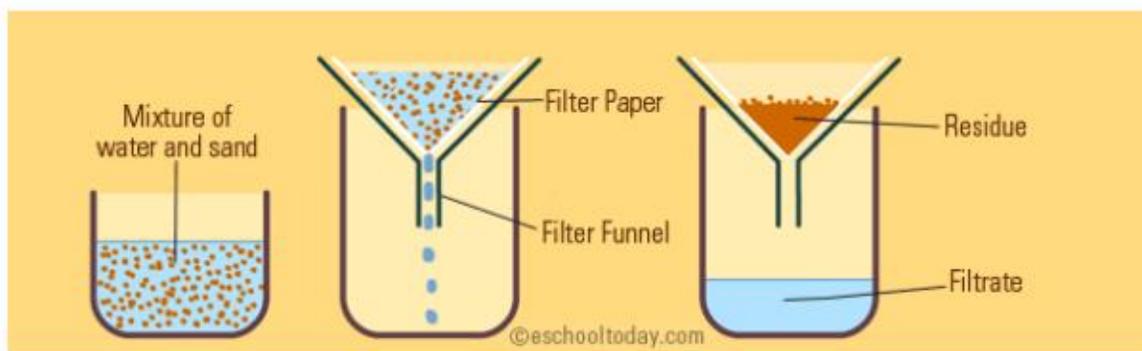


Figure 5 : La filtration

- ✓ Pour les liquides faiblement alcalins ou acides, on utilise des filtres en cellulose. Pour les liquides de forte alcalinité ou acidité, on a recours à des substances minérales: coton de verre, porcelaine poreuse, verre fritté.....



- ✓ Lorsque l'on veut séparer, à chaud, une solution contenant des impuretés solides, on utilise, afin d'éviter une recristallisation dans le filtre, un entonnoir à filtration chaude.

3. Centrifugation

- ✓ La centrifugation est une technique de séparation mécanique qui consiste à appliquer une force centrifuge sur un mélange de deux à trois phases entraînées dans un mouvement de rotation. L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse.

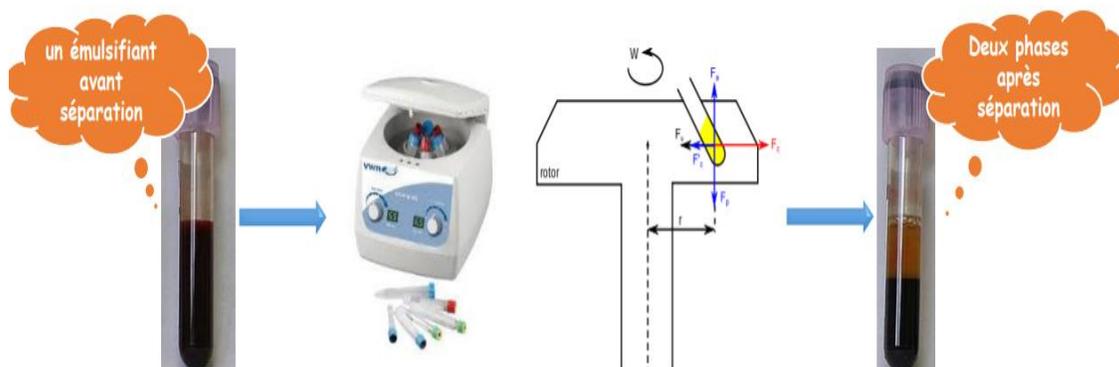


Figure 6 : La centrifugation

- ✓ En pratique, on est parfois gêné par une émulsion persistante. Cette émulsion peut être due à des faibles différences de densité des deux ou plusieurs phases;

par exemple : Eau / Aniline : $d=1/d=1,02$; on peut alors saturer l'eau en chlorure de sodium, ce qui provoque l'augmentation de la densité de l'eau pour avoir une bonne séparation.

4. Distillation

- ✓ La Distillation est une technique de séparation basés sur la différence des points d'ébullition de deux ou plusieurs corps simples. Le mélange liquide est mis à bouillir dans un récipient surmonté d'un réfrigérant. La composition d'une vapeur en équilibre avec le mélange bouillant est différente de celle de ce mélange à purifier, elle est plus riche en produits volatils.

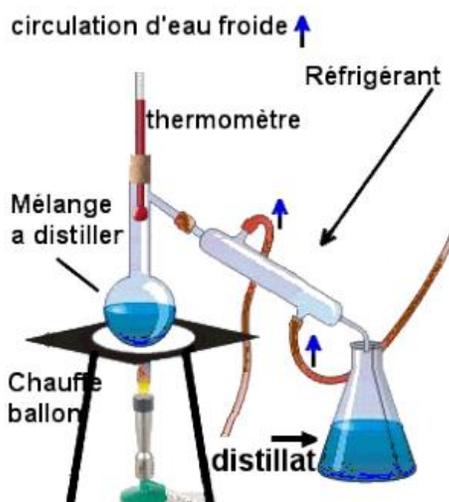


Figure 7 : Montage classique de distillation



Figure 8 : Le rotavapeur

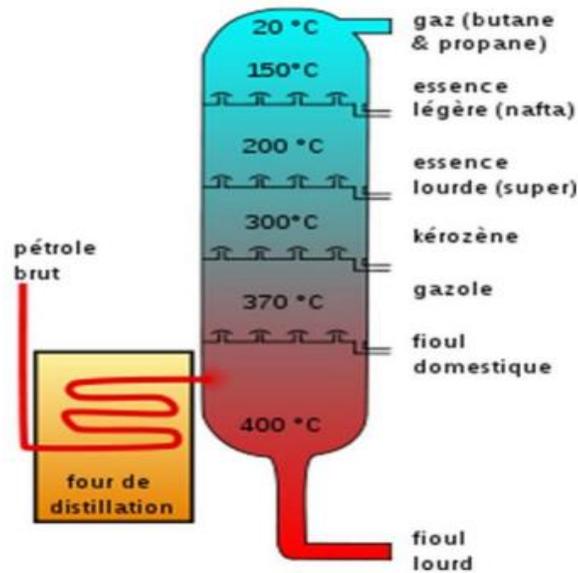


Figure 9 : Montage de la distillation fractionnée du pétrole

- ✓ Si les points d'ébullition sont élevés, on risque la décomposition thermique du produit; il est nécessaire de distiller le mélange réactionnel sous pression réduite en utilisant:
 - Une trompe à vide: la pression passe de 760 mmHg à 15 mmHg selon la température ambiante.



- Une pompe à palette: peut atteindre des vides de l'ordre de 0,01 mmHg, le point d'ébullition d'un liquide est alors abaissé de 200°C à 300°C.



✚ Distillation azéotrope (ou entrainement à la vapeur):

- On fait passer dans une solution ou suspension aqueuse du mélange à séparer, porté à 100°C un courant de vapeur d'eau :

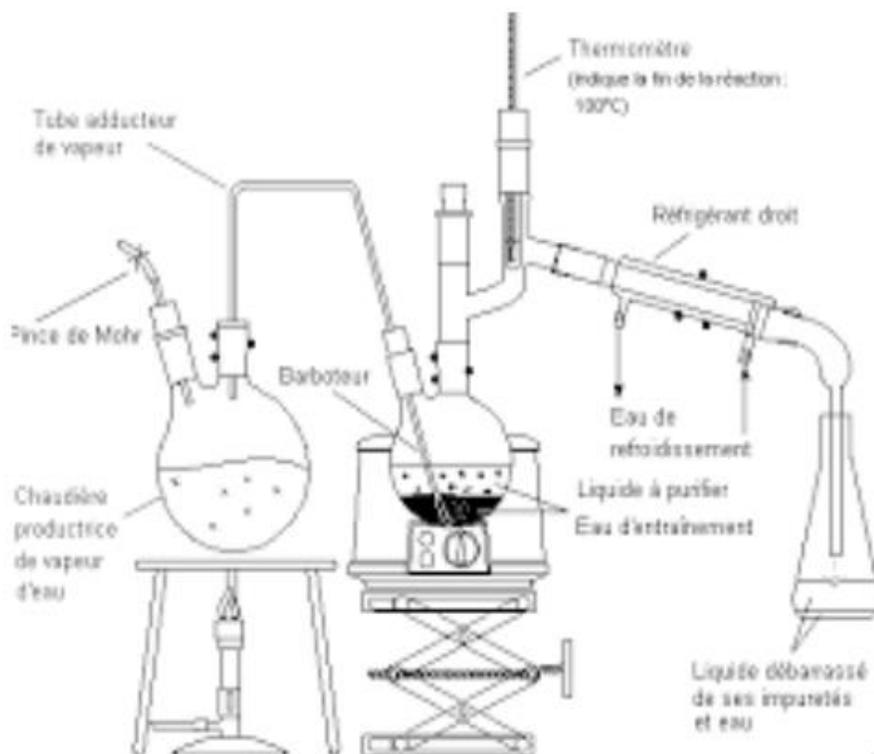


Figure 10 : Montage de distillation azéotrope

- L'azéotrope formé distille en tête à une température inférieure à 100°C, ceci est valable pour les composés dont le point d'ébullition est peu différent de celui de l'eau.

5. Extraction

- ✓ L'extraction consiste à traiter un mélange homogène ou hétérogène de liquides ou de solides par un solvant pur dans le but d'en extraire un constituant solide ou liquide. Quand le mélange est simplement mis en contact avec un solvant approprié, on parle d'extraction discontinue. Quand le mélange de composés est traité par un solvant approprié, continuellement purifié par distillation, on parle d'extraction continue.

5.1. Extraction Liquide-Liquide :

- Pour réaliser l'extraction liquide-liquide, le solvant et le mélange liquide doivent être non miscibles, et le produit à extraire doit être beaucoup plus soluble dans le solvant d'extraction que dans le mélange liquide.
- ✓ L'extraction liquide-liquide **discontinue** s'effectue par l'agitation vigoureuse du solvant et de la solution à extraire dans une ampoule à décanter.



Figure 11 : L'extraction liquide-liquide

- ✓ Pour l'extraction **continue**, la solution à extraire est alimentée par un solvant pur recyclé en continue par distillation.

5.2. L'extraction solide-liquide

- Extraction Solide-Liquide consiste à faire passer une substance d'un solide vers un solvant dans lequel elle est soluble et dont elle sera facilement isolable. Le processus nécessite un long contact du solvant avec le solide préalablement broyé avant extraction.
- Pour que la durée de contact entre le solvant et l'échantillon soit assez longue, on utilise l'extracteur de Soxhlet.



Figure 12 : L'extraction solide-liquide

6. Cristallisation

- La cristallisation est une technique de purification très utilisée en chimie organique; le but principal de cette opération est la purification et l'isolement d'un produit sous forme solide voire cristal. On distingue plusieurs approches:

6.1. Cristallisation à partir d'une phase vapeur suivie par une condensation solide.



6.2. Cristallisation par refroidissement:

L'abaissement de la température de la solution provoque la diminution de la solubilité du produit en solution ce qui induit sa cristallisation.

6.3. Cristallisation par relargage :

L'addition d'un contre-solvant miscible avec le solvant provoque le relargage du produit en solution ce qui induit sa cristallisation. Idéalement, le contre-solvant solubilise les impuretés.

7. Constantes physique des corps organiques

- Tout corps organique possède un ensemble de propriétés physiques et chimiques qui le différencie des autres.
- Les principales propriétés physiques qui caractérisent un composé sont:
 - ✓ Le point de fusion.
 - ✓ Le point d'ébullition.
 - ✓ Comportement sous l'effet de la lumière ou d'autres radiation (Adsorption, réfraction, diffraction et le pouvoir rotatoire).

Remarque :

- On peut déterminer les propriétés physiques et chimiques d'un composé que si celui-ci est homogène.
- Un composé est considéré pur, si les propriétés physiques et chimiques ne varient pas lorsqu'il est soumis à des nouvelles opérations de purification.

7.1.1. Solubilité de la substance dans différents solvants:

- Les substances polaires sont plus solubles dans les solvants polaires que les composés non polaires tels que les hydrocarbures. Les composés organiques ont des parties polaires et des parties non polaires. Leur solubilité dans les différents types de solvants dépend de l'influence relative des parties polaires et non polaires des molécules.
- Pour les composés à une seule fonction tel que les alcools, acides, esters, aldéhydes, cétones, amide et amines, on observe une solubilité faible dans l'eau si la molécule possède plus de quatre carbones; alors que la solubilité de ces mêmes composés est plus grande dans les solvant organiques.
- Les substances ayant au moins deux groupes polaires sont moins solubles dans les solvants organiques et plus solubles dans l'eau tel que: acide succinique, sucres.
- Les sels sont en général solubles dans l'eau mais insolubles dans les solvants organiques, ce qui est l'inverse pour les hydrocarbures.

7.1.2. Les points de fusion et d'ébullition:

- Le point de fusion d'un corps organique représente la température, à une pression donnée, à laquelle ce composé passe de l'état solide à l'état liquide.
- Un composé organique cristallin pur possède, en général, un point de fusion bien défini; c'est-à-dire que l'écart entre le début et la fin de fusion ne dépasse pas 0,5 °C. La présence des petites quantités d'impuretés entraîne habituellement une augmentation remarquable de l'écart des points de fusion et provoque le début de la fusion à une température inférieure au point de fusion de la substance pure. Le point de fusion est donc un critère de pureté valable pour un composé organique.
- Il existe différents appareils permettant de mesurer et d'enregistrer automatiquement les températures de fusion des échantillons cristallins contenus dans des tubes capillaires



Figure 13 : Appareil de mesure de température de fusion

- Le point d'ébullition d'un corps organique représente la température, à une pression donnée, à laquelle ce composé passe de l'état liquide à l'état gazeux. La température d'ébullition, tout comme la température de fusion dépend de la pression: lorsque la pression augmente, la température d'ébullition augmente aussi, par exemple: la température d'ébullition de l'eau est 100°C sous pression de 1,013 bar et de 60°C sous pression de 0,2 bar.
- Ce point peut être mesuré en provoquant l'ébullition du corps pur liquide, par le biais d'un chauffe-ballon et un thermomètre.
- Chaque corps pur possède sa propre température d'ébullition qui le caractérise par conséquent cette dernière doit permettre de l'identifier.

7.1.3. Indice de réfraction:

- Après purification, les liquides ont une température d'ébullition caractéristique mais aussi un indice de réfraction bien précis. C'est un meilleur critère de pureté que la température d'ébullition.
- L'indice de réfraction n d'une substance est le quotient entre la vitesse de la lumière dans le vide et sa vitesse dans le composé. Il varie avec la longueur d'onde de la lumière et avec la température. En pratique, l'indice de réfraction se mesure par rapport à l'air sachons que

$$n(\text{vide}) = 0,00027 \times n(\text{air})$$

- La source lumineuse utilisée est la raie D du sodium $\lambda = 589,3 \text{ nm}$; on peut aussi utiliser la lumière blanche et convertir la valeur obtenue en une valeur relative à la raie D de sodium, on écrit:

$$n_D^{20} \dots\dots \text{température de mesure}$$

$$n_D \dots\dots \text{rayonnement utilisé}$$



- Si la température augmente de 1°C l'indice de réfraction diminue de $4,5 \times 10^{-4}$. La variation d'indice entre deux composés est liée aux modifications de structure.

7.1.4. Pouvoir rotatoire:

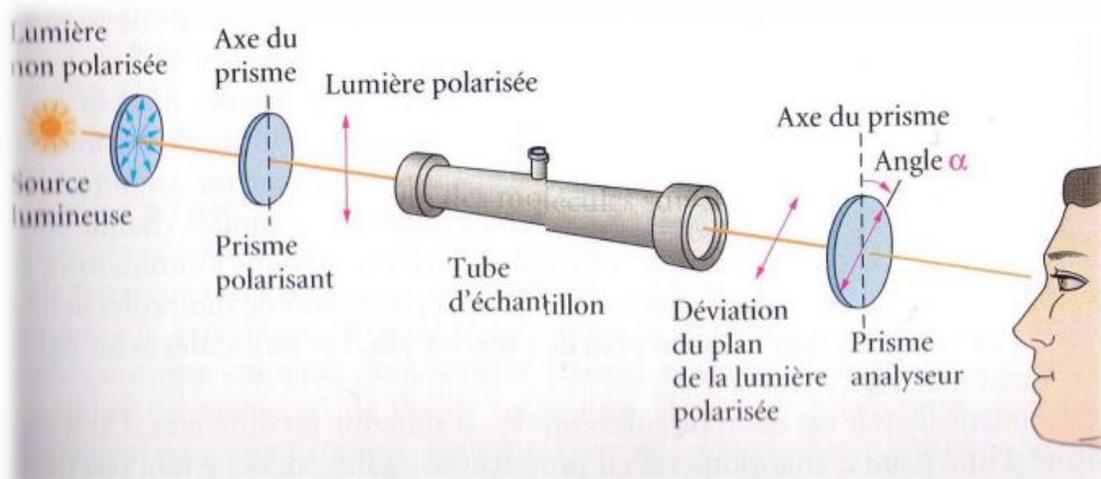
- Si le composé est optiquement actif, on détermine le pouvoir rotatoire. Un composé optiquement actif fait tourner le plan de vibration de la lumière polarisée, le phénomène s'observe au polarimètre qui sert à déterminer le pouvoir rotatoire des composés optiquement actifs.
- A une température T et à une longueur λ , pour un composé et un solvant donné, la valeur de l'angle est proportionnelle à la quantité de matière rencontrée par la lumière, c'est à dire au produit de la concentration par la longueur l de la cuve (loi de Biot).

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \alpha / l \cdot c$$

$[\alpha]_{\lambda}^T$: Pouvoir rotatoire spécifique

l : longueur de la cuve en dm

c : concentration de la substance chirale



7.1.5. Masse molaire:

- La masse molaire peut être déterminée de différentes manières:

1- Mesure par spectrométrie de masse :

- La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification. Elle est fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation ou dans une chambre de collision.
- Les ions moléculaires se fragmentent pour donner des ions fils en suivant des règles de fragmentation connues et caractéristiques des structures des molécules à analyser.
- Le graphique représentant l'intensité des ions en fonction de leur rapport m/z est appelé spectre de masse.

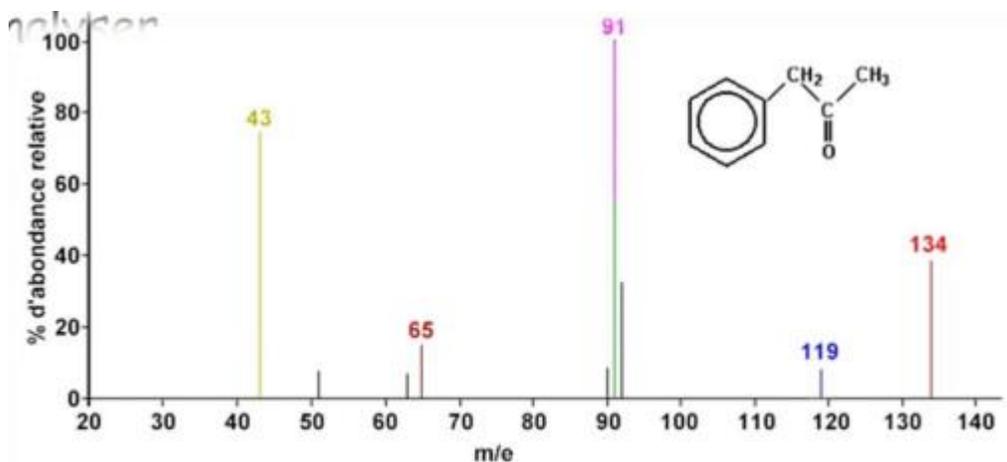


Figure 26. Spectre de masse de la 1-phényl-2-propanone $\text{ArCH}_2\text{COCH}_3$, dont la masse molaire = 134,18 g/mol.

Figure 14 : Spectre de masse de la 1-phényl-2-propanone

2- Mesure de la densité de vapeur:

- Si la substance est volatile, on vaporise une masse m connue et on mesure le volume V de vapeur obtenue, on a ainsi la densité de vapeur $d = m/V$, on applique ensuite la loi d'Avogadro $M = 29 d$.

3- Mesure par cryoscopie :

- La Cryoscopie est l'étude des corps fondée sur l'observation de la température de congélation de leurs solutions, par exemple une solution aqueuse de glycol congelé à température plus basse que celle de l'eau pure. L'abaissement $\Delta\theta$ du point de congélation ou abaissement cryoscopique est donné par la loi de Raoult dans le cas de solutions peu concentrées:

$$\Delta\theta = (K \times \text{masse soluté}) / \text{masse molaire du soluté} \times \text{masse solvant}$$

Avec K = constante cryoscopique caractéristique du solvant

7.1.6. Odeur, couleur et densité :

- **L'odeur** peut être un indice pour déterminer la nature d'un composé organique mais ne pas trop s'y fier, car le sens de l'odorat varie d'un individu à l'autre. On peut aussi avoir des odeurs analogues pour des composés différents.
- **La couleur** peut être un indice de la catégorie du composé, mais des impuretés très colorées souvent présentes peuvent nous faire aboutir à des conclusions erronées.
- **La densité** dans le cas des liquides se détermine précisément à l'aide des pycnomètre ou densimètres de différents modèles.

L'étalonnage du pycnomètre se fait par pesée de l'appareil d'abord vide, puis rempli d'un liquide de densité connu, l'eau en général, pour la substance étudiée on opère de la même façon.

Chapitre II : La chromatographie

1. Définition

La chromatographie est une méthode qui permet de séparer les constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse. C'est une technique de séparation très puissante qui permet de travailler sur des quantités allant jusqu'au μg .

- Le mot chromatographie a été utilisé pour la première fois par le chimiste Tswett vers 1906, lors de la séparation de pigments d'épinard sur une colonne en CaCO_3 . Le mot chromatographie vient du grec: **Khroma** = couleur; **Graphein** = écrire
- Les séparations chromatographiques mettent en œuvre des techniques basés sur des propriétés physico-chimiques des molécules:

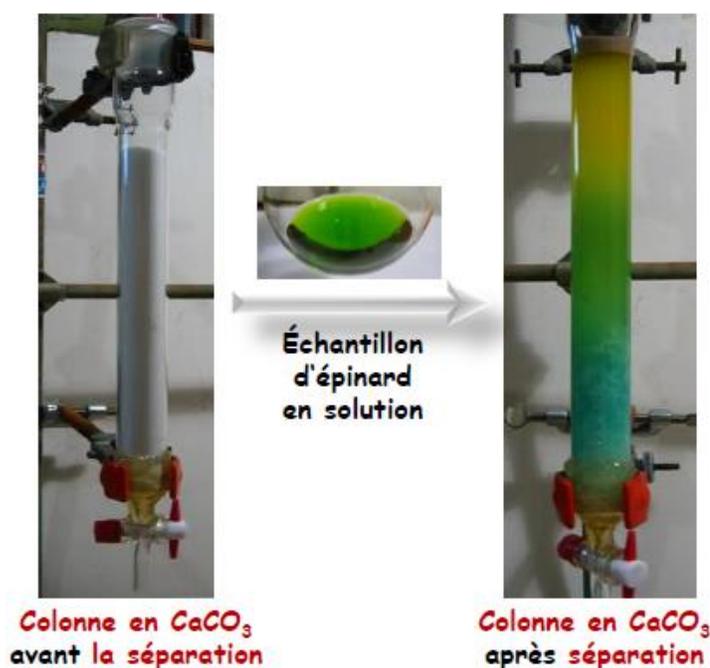


Figure 15 : Colonne avant et après la séparation

- 1- **La solubilité** : tendance d'une molécule à se dissoudre dans un liquide.
- 2- **La volatilité** : tendance d'une molécule à passer à l'état vapeur.
- 3- **L'adsorption** : tendance d'une molécule à se lier à un solide finement divisé.

2. Historique

La chromatographie est une science très ancienne. Aristote décrit les propriétés que possèdent certaines terres pour purifier l'eau de mer. Au **XVI^{ème}** siècle, le strasbourgeois Brunswig purifiait de l'éthanol en faisant passer la vapeur à travers une éponge imprégnée d'huile d'olive et réalisait une expérience de chromatographie gaz-liquide, 400 ans avant la découverte de cette technique. En **1931**, la publication de Kuhn et Lederer sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle apparue. En effet, c'est Kuhn qui, en **1938** reçut le Prix Nobel sur la chromatographie en phase mince.

En **1952**, les travaux de Martin ont mis en évidence la chromatographie d'échange ionique et en **1941** la naissance de la chromatographie de partage par Martin-Synge. En **1955** la chromatographie gaz-liquide sur le marché et en **1965** l'apparition la chromatographie liquide moderne (HPLC). L'excellente séparation des molécules, aussi bien les grosses que les petites rend la chromatographie une technique largement répandue.

3. Principe de la séparation

- Le principe de la chromatographie consiste à **entraîner l'échantillon** à l'aide d'un **éluant** (gazeux ou liquide) appelé ici **phase mobile (PM)**, qui se déplace au contact d'une seconde **phase fixée** sur un support (colonne ou surface plane). Celle-ci, dite **stationnaire (PS)**, est insoluble dans la première.
- Si les différents composés de l'échantillon (**Soluté**) présentent **des affinités différentes** pour le couple **PM/PS**; ils vont être plus au moins ralenti dans leur progression par la phase stationnaire. Sous l'effet antagoniste des **forces de rétention** soluté/PS et des **forces d'entraînement** soluté/PM. Ces composés vont pouvoir être recueillis séparément à l'issue de cette **migration**.
- Chaque composé est caractérisé par un (appelé également **coefficient de partition**) défini comme suit:

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

K dépend de la **température** et de **trois forces d'interaction**: PS/soluté, PM/soluté et PM/PS.

4. Classification des méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon trois modalités différentes:

1. Classification selon la nature physique des phases.
2. Classification selon le phénomène mis en œuvre.
3. Classification selon le procédé opératoire.

4.1. Classification selon la nature physique des phases.

La **phase mobile** est un fluide; soit un liquide, soit un gaz, ou un fluide supercritique et la **phase stationnaire** est soit un solide, soit un liquide. On distingue:

- Chromatographie liquide—solide (CLS)
- Chromatographie liquide—liquide (CLL)
- Chromatographie gaz—solide (CGS)
- Chromatographie gaz—liquide (CGL)
- Chromatographie supercritique (SFC); les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz, par exemple le CO_2 à 50°C et 150 bar.

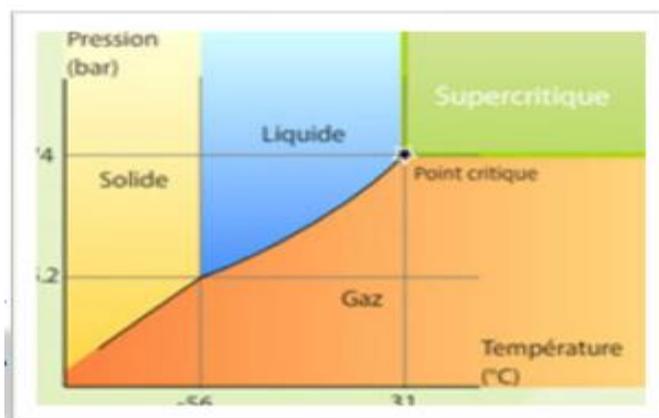


Figure 16 : Représentation bidimensionnelle (P, T) du diagramme de phases d'un corps pur

- Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. On distingue ainsi:

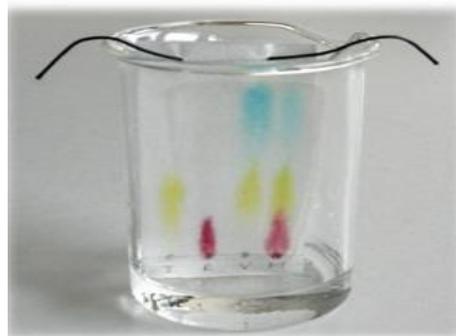
4.2. Classification selon le phénomène mis en œuvre:

- La **chromatographie d'adsorption** (lorsque la **phase stationnaire est un solide**); par extension on pourrait y rattacher la **chromatographie d'affinité**, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).
- La **chromatographie d'échange d'ions**, où la **phase stationnaire porte des groupes fonctionnels** acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.
- La **chromatographie de partage**, lorsque la **phase stationnaire est un liquide non miscible** avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).
- La **chromatographie d'exclusion** où la **phase stationnaire poreuse** se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel.

1) Classification selon le procédé opératoire:

➤ Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distingue :

- La chromatographie sur **colonne**
- La chromatographie sur **papier**
- La chromatographie sur **couche mince**



➤ Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distingue:

- La **chromatographie par développement** (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire).
- La **chromatographie d'élution** (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).

5. Choix de la méthode chromatographique

Le choix entre les différentes techniques chromatographiques dépend de deux facteurs essentiels:

- De la nature physique du soluté: gaz, liquide, solide, macromolécule, espèce organique (polaire ou non polaire), ionique.
- Du but de l'analyse: identification, contrôle de pureté, purification de produits, suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages, quantification...

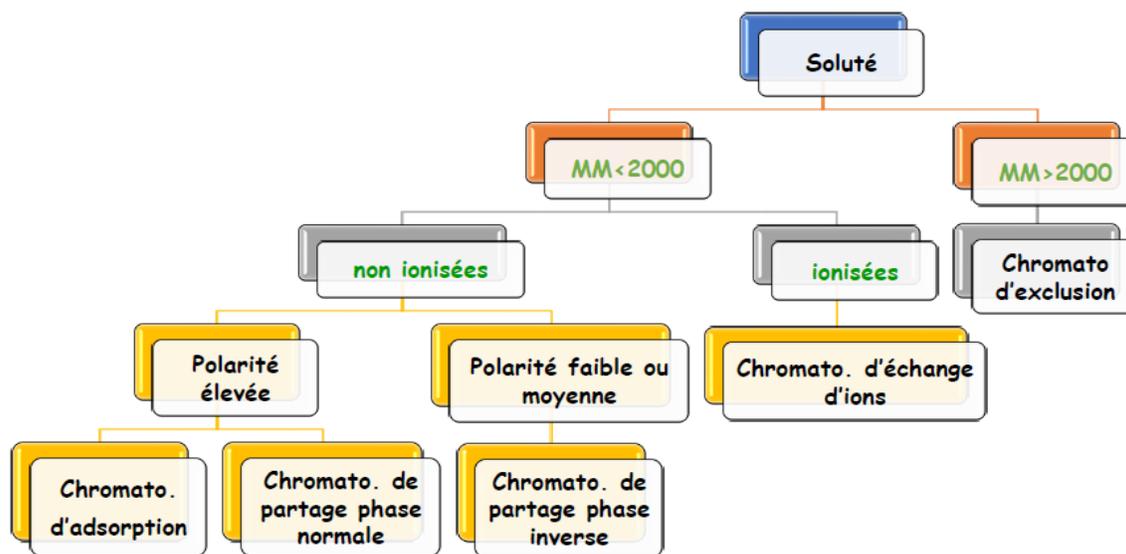


Figure 17 : Les différentes techniques chromatographiques

6. Grandeurs chromatographiques

Tous les instruments chromatographiques comportent une colonne renfermant la phase stationnaire ainsi qu'un détecteur situé en aval pour repérer les changements de composition de la phase mobile au cours de son élution, à chaque séparation correspond un enregistrement appelé « **Chromatogramme** »:

- Le **Chromatogramme**: est une courbe, idéalement, Gaussien en fonction du **temps de rétention** t_R ce dernier présente le temps mis par le soluté pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la phase stationnaire.

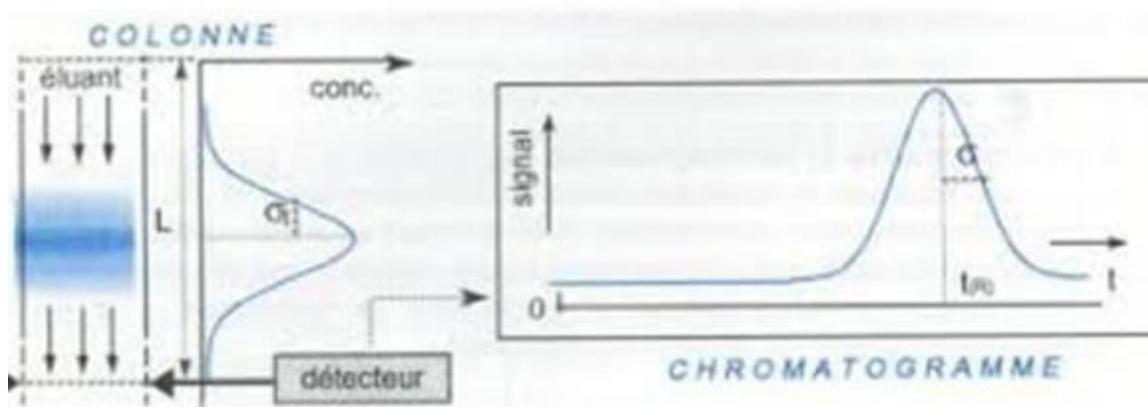


Figure 18 : Chromatogramme d'un constituant

- Le temps de rétention est caractéristique d'une espèce pour des conditions d'analyse données et peuvent servir à **l'analyse qualitative**. La surface et la hauteur d'un pic est fonction de la quantité du constituant. Le temps de rétention est indépendant de la quantité d'échantillon injectée. Il est fonction de la nature et la vitesse de la phase mobile.

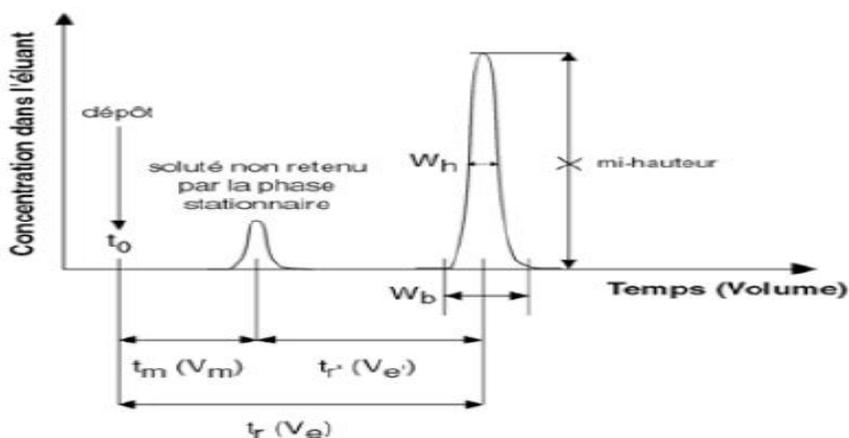


Figure 19 : Les différents temps de chromatogramme

t_0 : début de l'injection

V_m : volume mort de la colonne

t_m : temps mort

V_e : volume d'éluion (ou de rétention V_r) d'un composé

t_r : temps de rétention (d'éluion, t_e) d'un composé

V_e (volume d'élution) = d (débit) x t (temps)

$V_{e'}$: volume d'élution réduit ($V_e = V_{e'} + V_m$)

$t_{r'}$: temps de rétention réduit ($t_r = t_{r'} + t_m$)

W_b : largeur du pic à la base (ω)

W_h : largeur du pic à mi-hauteur (δ)

$$K = \frac{t_{r'}}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Facteur de rétention ou facteur de capacité K

Idéalement $1 < k < 10$ pour les différents solutés d'un mélange

- Un pic d'élution idéal a le même aspect que la représentation graphique de la **courbe de Gauss**. En chromatographie δ désigne la **largeur à mi-hauteur** ($\delta = 2,35 \sigma$) et σ^2 la **variance du pic**. La largeur du pic, ω (ou W_b), est mesurée à **13,5%** de la hauteur, on a $\omega = 4\sigma$.

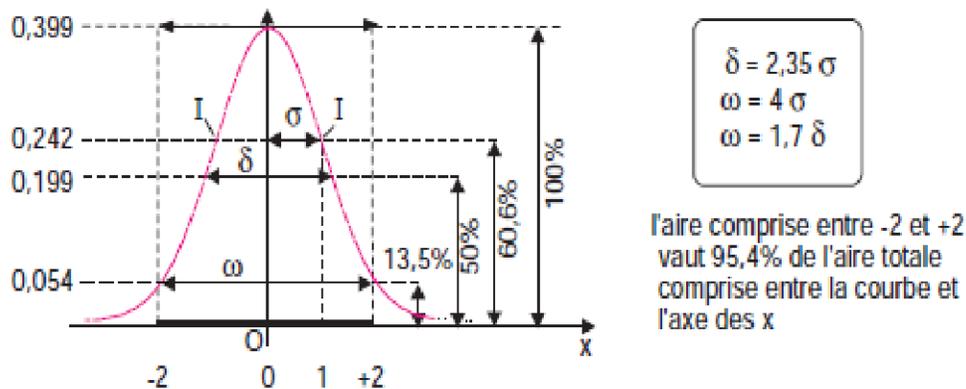


Figure 20 : Caractéristiques du pic idéal

Pour définir chaque composé et comparer les performances des analyses chromatographiques, on utilise divers paramètres en plus des temps de rétention t_R

- Efficacité N**: correspond au nombre de plateaux théoriques de la colonne:

$$N = 16 (t_R^2 / \omega^2) = 5,54 (t_R^2 / \delta^2)$$

Dans leurs études théoriques, les chimistes *Martin* et *Synge* traitent la colonne chromatographique comme si elle était constituée d'une série de plateaux semblables à ceux qui existent dans la distillation fractionnée du pétrole.

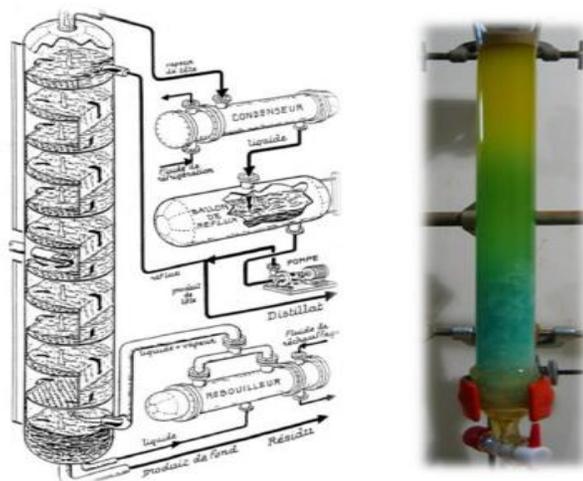


Figure 21 : Illustration d'une séparation par chromatographie sur colonne

- 2- **La hauteur équivalente à un plateau théorique H:** ou (HEPT) pour une colonne de longueur L, elle vaut $H=L/N$
- 3- **Volume d'éluion:** ou (de rétention) V_R ; désigne le volume de phase mobile nécessaire pour faire migrer le soluté d'une extrémité à l'autre de la colonne.
- 4- **Volume mort:** V_m ; correspond au volume de phase mobile dans la colonne.
- 5- **Volume de phase stationnaire:** V_s ; volume occupé dans la colonne par la phase stationnaire.
- 6- **Rapport de phase:** β ; rapport entre le volume mort de la colonne et le volume de phase stationnaire. Caractéristique essentielle de toute colonne: $\beta=V_m/V_s$
- 7- **Facteur de rétention:** (ou de capacité) k : correspond au rapport de la quantité fixée (ms) sur la phase stationnaire et de celle restée dans la phase mobile (mm). Ce paramètre rend compte de la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir un soluté. Il correspond également au rapport des temps passés dans ces deux phases:

$$K = \frac{t_r'}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad \text{ou encore} \quad t_R = t_m(1+K)$$

- 8- **Sélectivité α :** correspond au rapport des facteurs de rétention K; précise l'aptitude de la colonne à séparer deux composés. α est toujours > 1 .

$$\alpha = \frac{K_{(2)}}{K_{(1)}} = \frac{t_{R(2)} - t_m}{t_{R(1)} - t_m}$$

9- **Facteur de résolution R:** traduit la plus ou moins bonne séparation entre deux composés.

On peut y accéder à partir du chromatogramme:

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2}$$

Pour faire apparaître les principaux facteurs qui influent sur le facteur de résolution on utilise souvent l'expression approchée suivante:

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

7. Effet de la vitesse d'élution sur l'efficacité de la colonne; Equation de Van Deemter

L'efficacité d'une colonne est directement liée aux nombres de plateaux théoriques; pour obtenir le nombre maximal de ce dernier **N** dans une colonne, il faut définir les conditions où la hauteur de plateau réduite **H** est minimale ($N=L/H$).

Donc, il faut étudier les différents mécanismes d'élargissement d'un pic de soluté au cours de sa progression au sein d'une colonne chromatographique.

On peut considérer que l'étalement d'un pic de soluté a trois origines:

- **La dispersion des molécules par diffusion longitudinale.**
- **L'existence de « chemins multiples » dus au remplissage.**
- **La résistance au transfert de masse dans chacune des deux phases.**

Le calcul de la variance correspondante à chacun de ces facteurs a été mis en évidence pour la première fois par **Van Deemter**:

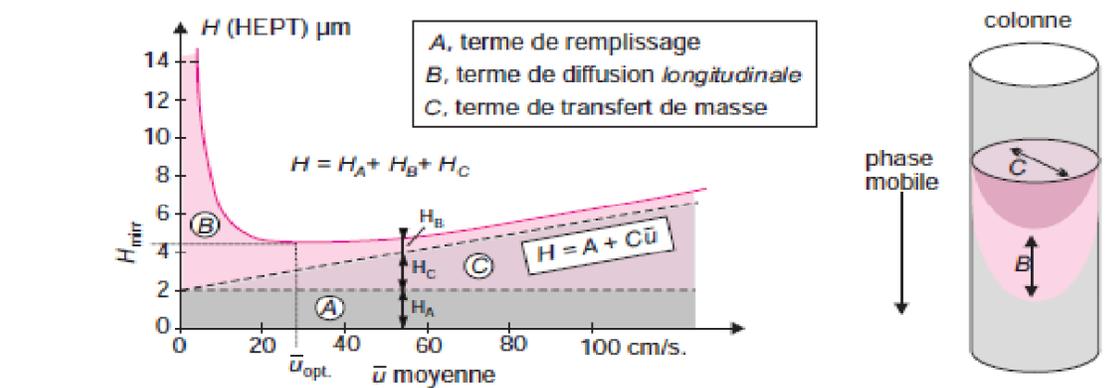


Figure 22 : Courbe de Van Deemter

A : Coefficient de diffusion turbulente ou terme de remplissage

Chemins préférentiels par le soluté, dus à la granulométrie de la phase stationnaire (taille et répartition des particules). **A** est donc lié au diamètre des particules de la phase stationnaire et à la régularité du remplissage.

B : Coefficient de diffusion longitudinale

C'est la migration du soluté des régions les plus concentrées vers les régions plus diluées. Le coefficient de diffusion est plus important dans les gaz que dans les liquides.

C : Coefficient de transfert de masse du soluté entre les deux phases.

U : est la vitesse moyenne de la phase mobile (cm/s)

En conclusion: les colonnes les plus efficaces sont celles régulièrement remplies et bien tassées où le diamètre des particules est le plus faible possible, avec un débit optimal de phase mobile.

8. Optimisation d'une analyse chromatographique

Selon l'expression mathématique de la résolution mentionné précédemment

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

Cette dernière dépend des paramètres chromatographiques suivantes:

1. La racine carrée du nombre de plateaux théoriques N

2. Le facteur de rétention (ou de capacité) k'_2

3. Le facteur de la sélectivité α

Par conséquent, afin d'optimiser une analyse chromatographique et avoir des pics bien séparés, il faut d'abord optimiser ces trois facteurs

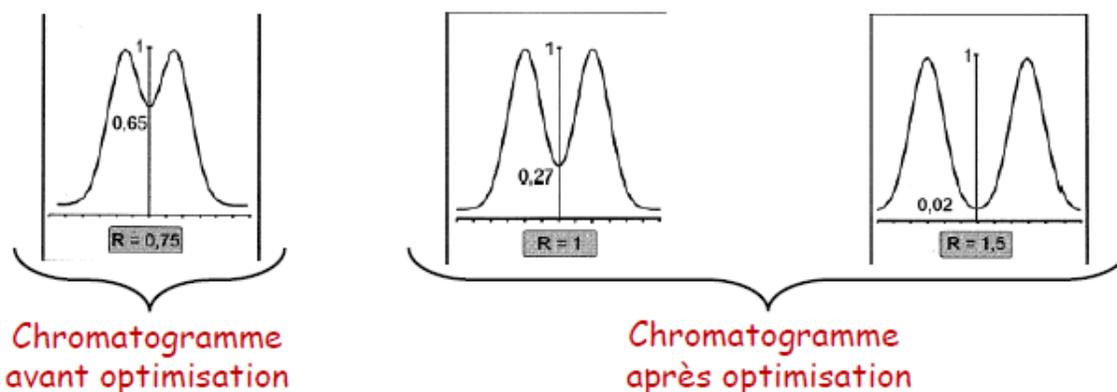


Figure 23 : Chromatogramme avant et après optimisation

1. La racine carrée du nombre de plateaux théoriques :

Pour obtenir un nombre maximal des plateaux théoriques dans une colonne N , il faut définir les conditions où la hauteur de plateau réduite H est minimale ($N=L/H$). Les méthodes permettant de minimiser H sont la diminution:

- a) Du diamètre des particules de la phase stationnaire.
- b) Du diamètre du support.
- c) De la température (CPG).

2. Le facteur de rétention (ou de capacité) k'_2

La séparation peut souvent être améliorée de manière significative en modifiant le facteur de capacité k'_2 . La résolution R augmente avec k'_2 dans les deux cas suivants:

3. Le facteur de la sélectivité α :

Inutile d'optimiser N et k si le facteur de sélectivité α égal 1, plusieurs options sont possibles afin d'augmenter α tout en conservant $1 < k < 10$:

- a) Modifier la phase mobile
- b) Modifier la température de la colonne
- c) Modifier la composition de la phase stationnaire

Exercices

Exercice 1:

Calculer le facteur de séparation entre deux composés 1 et 2 dont les volumes de rétention sont respectivement égaux à 6 et 7 ml. Le volume mort de la colonne utilisé est de 1 mL.

Exercice 2:

Une colonne tubulaire ouverte utilisée pour la séparation d'un mélange a un diamètre intérieur de 0,25 mm. On utilise une vitesse d'écoulement volumétrique de 1,0 mL/min.

Calculer la vitesse d'écoulement linéaire en cm/s à la sortie de la colonne.

Exercice 3:

A une solution aqueuse d'iode de concentration 10g/L, on ajoute 10 mL de tétrachlorométhane (CCl_4). Déterminer la concentration en iode dans le tétrachlorométhane.

Donnée: Le coefficient de partage de l'iode entre les deux solvants: tétrachlorométhane et eau, est égal à 100 à 25 °C.

Exercice 4:

Les coefficients de l'équation de Van Deemter sont déterminés à : $A = 10^{-3}$ cm, $B = 0,144$ cm². s⁻¹, $C = 10^{-3}$ s

- a. Quelle est la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile qui minimise la hauteur d'un plateau théorique?
- b. Quel serait la hauteur minimale équivalente à un plateau théorique de la colonne ?

Correction**Exercice 1:**

$$\alpha = 1,2$$

Exercice 2:

2037 cm/s

Exercice 3:

$$[I_2]_{H_2O} = 0,09 \text{ g/L}; [I_2]_{CCl_4} = 9,9 \text{ g/L}$$

Exercice 4:

a) $u_{opt} = 12 \text{ cm.s}^{-1}$

b) $H_{min} = 0,025 \text{ cm}$

Chapitre III : Chromatographie Liquide Classique

1. Chromatographie sur couche mince

1.1. Définition

La séparation par chromatographie sur couche mince (ou chromatographie planaire) des constituants de l'échantillon est réalisée sur une fine couche (100–200 μm) de phase stationnaire, généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium.

Pour maintenir la phase stationnaire sur le support et assurer la cohésion des particules, un liant organique est incorporé au cours de la fabrication de la plaque.

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique complémentaire de la CLHP; elle présente plusieurs avantages:

- 1- Elle est plus rapide et meilleur marché que la CLHP.
- 2- Elle s'accommode de matrices complexes.
- 3- Elle permet des analyses bidimensionnelles.
- 4- Elle rend possible le lancement de plusieurs analyses simultanément.

1.2. 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 polymèreorganique.

L'échantillon : environ 1 μl 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.

1.3. Étapes de séparation

1.3.1. Dépôt de l'échantillon :

- On commence par déposer un petit volume de l'échantillon en solution diluée, à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache de 1 à 3 mm de diamètre. Ce dépôt est réalisé soit manuellement, soit de manière automatique, avec un capillaire à extrémité plane.

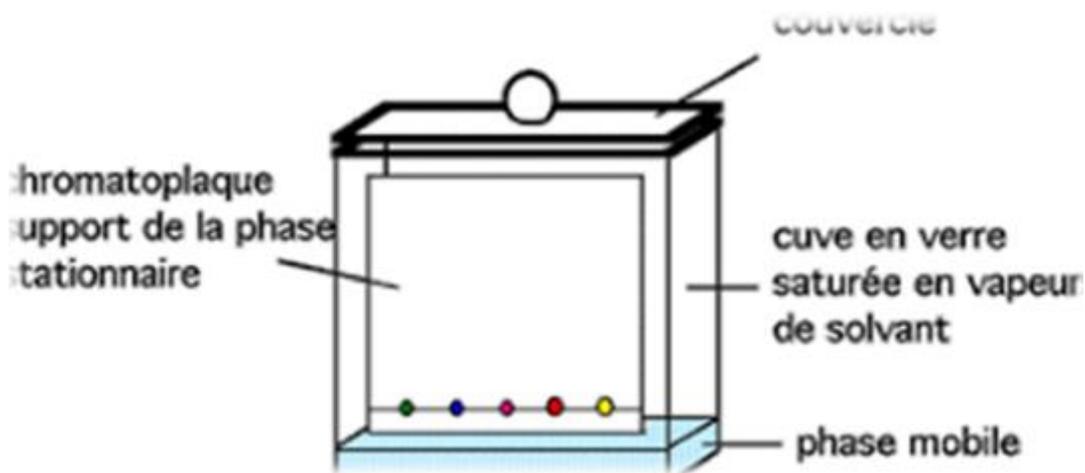


Figure 24 : Schéma d'un montage CCM

- La plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve spéciale munie d'un couvercle, au fond de laquelle se trouve un peu de la phase mobile servant d'éluant. L'endroit où l'échantillon se trouve doit être situé au-dessus du niveau d'immersion.

1.3.2. Développement de la plaque CCM:

- La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Le temps de migration (plusieurs minutes) dépend de divers paramètres.
- Quand le front de solvant a parcouru une distance considérée comme suffisante (quelques centimètres), on retire la plaque de la cuve, on repère la position limite atteinte par la phase mobile et on évapore cette dernière.

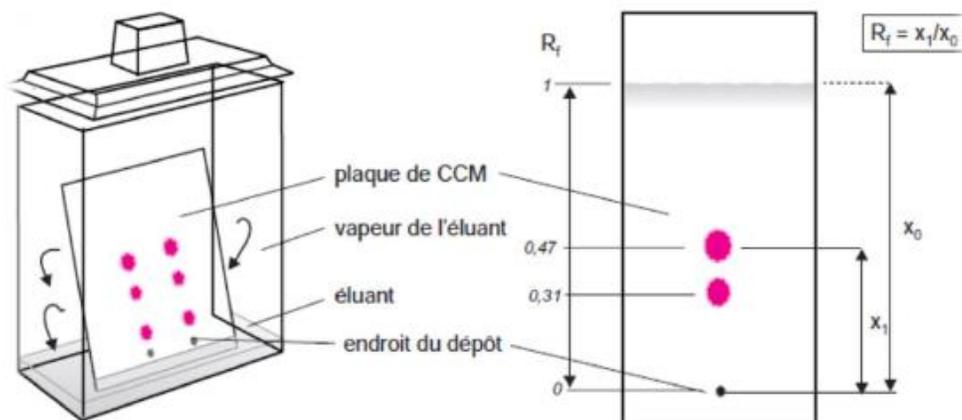


Figure 25 : Séparation des constituants d'un mélange par chromatographie CCM

1.3.3. Révélation de la plaque CCM:

- La localisation des composés après migration se fait sur la plaque par le biais de plusieurs révélateurs, spectroscopiques ou chimiques.
- **Soit à l'aide d'une lampe UV à vapeur de mercure ($\lambda=254$ nm):**
 Tout composé qui absorbe à cette longueur d'onde (tel que les composés aromatiques) apparaît sous forme d'une tache sombre (ou colorée) sur un fond illuminé en vert (due à la présence des sels de zinc sur la phase stationnaire).



- **Soit à l'aide des révélateurs chimiques:** cette méthode consiste à carboniser les composés en chauffant la plaque après l'avoir soumise à une pulvérisation d'acide sulfurique; ou la révélation par immersion dans des réactifs généraux (acide phosphomolybdique, vanilline, Iode, KMnO_4), ou spécifiques (ninhydrine en solution alcoolique pour les acides aminés, par exemple).



1.3.4. CCM bidimensionnelle :

- L'utilisation d'une plaque de forme carrée permet de faire de la chromatographie bidimensionnelle en procédant à deux éluations successives avec deux éluants différents, c'est une expérience qui permet de prouver si un "spot" de la CCM contient en fait deux produits.

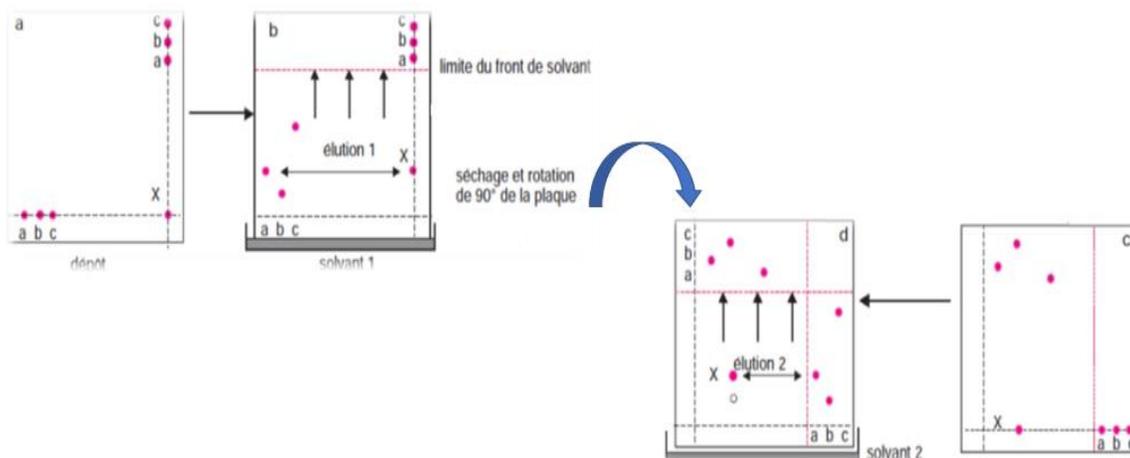


Figure 26 : Séparation des constituants de deux mélanges par chromatographie CCM

- Une application typique de cette méthode est la séparation des acides aminés. Pour n spots, la résolution peut atteindre $(n*n)$ composés.

1.3.5. Paramètres de séparation et de rétention:

Chaque composé est défini par son R_f , (abréviation de « *rapport frontal* »), qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant:

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{x}{x_0}$$

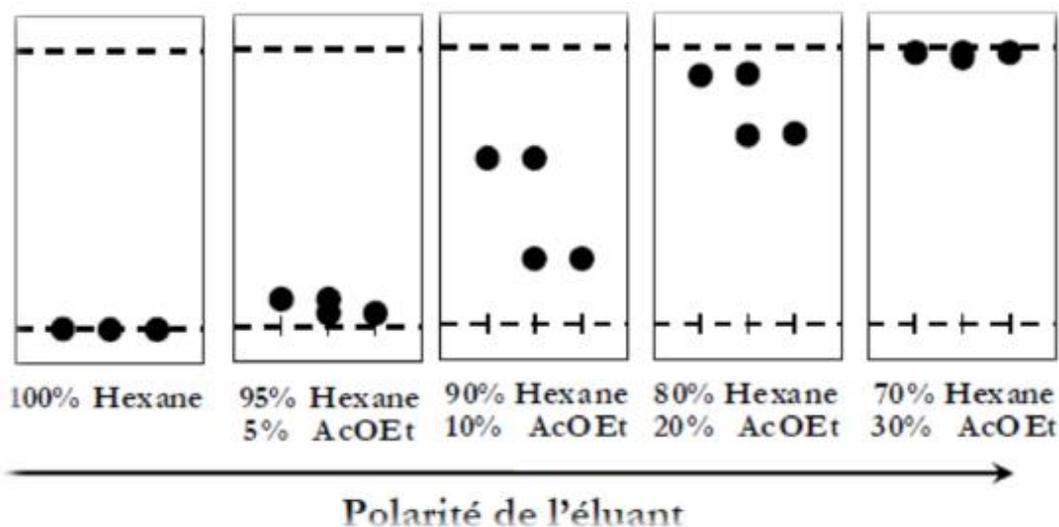
- On définit l'efficacité N et la hauteur d'un plateau théorique de la plaque H pour un composé dont la distance de migration est x et le diamètre du spot ω par les relations suivantes:

$$N = 16 x^2 / \omega^2; \quad H = x / N$$

- Pour calculer le facteur de rétention k d'un composé ou la sélectivité ou la résolution R entre deux composés on fait généralement correspondre les distances de migration sur la plaque aux migrations lues sur un chromatogramme.

$$k = \frac{1}{R_f} - 1 \quad R = 2 \frac{x_2 - x_1}{\omega_2 - \omega_1}$$

- Le choix de la phase mobile est très important pour avoir une résolution satisfaisante entre deux produits, pour faire une séparation de deux produits par chromatographie sur couche mince, on cherche un éluant qui donne le plus grand ΔR_f possible, avec un R_f pour le produit le moins polaire autour de 0,3.



Remarque: On ne peut faire varier le débit de la phase mobile, pour améliorer l'efficacité de la séparation. Un remède consiste à faire des développements multiples en séchant la plaque entre chaque cycle de migration.

1.4. 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.

2. Chromatographie sur papier

2.1. Définition

La chromatographie sur papier (CP) est une chromatographie de partage liquide-liquide qui permet de séparer et d'identifier les espèces chimiques d'un mélange. Actuellement, malgré l'apparition de la CCM et la CLHP, la CP conserve toute sa valeur pour séparer des substances très polaires.

C'est une technique de chromatographie planaire qui possède les mêmes étapes et principes de séparation de la chromatographie sur couche mince; la différence entre les deux techniques c'est la nature de la phase stationnaire.

Cette méthode est basée sur leur différence d'affinité pour deux phases : La phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même, absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle.

La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau.

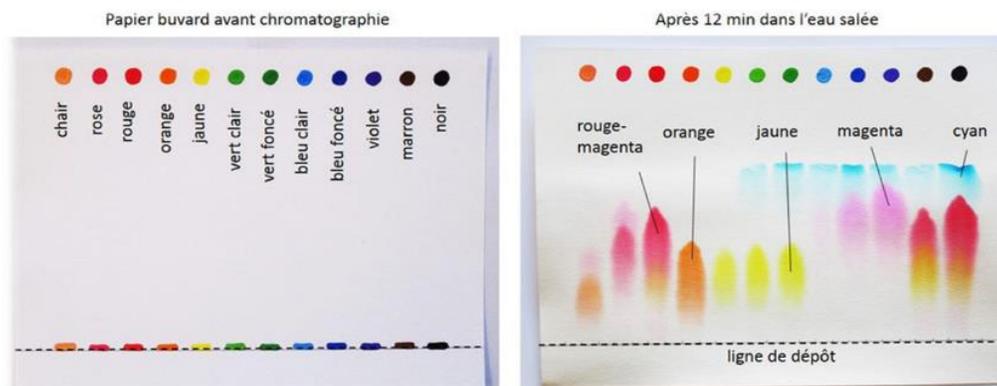


Figure 27 : Papier avant et après chromatographie

2.2. Principe

L'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier et le solvant qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité (la technique ressemble à celle de la CCM). Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement.

Ses plus grands inconvénients par rapport à la chromatographie sur couche mince sont : la durée de développement beaucoup plus longue et une séparation généralement moins **bonne**
Papier

On peut employer du papier filtre ordinaire, mais il est préférable de se procurer du papier conçu pour cet usage, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques physiques sont uniformes. Ce papier est suffisamment épais pour retenir par imprégnation une quantité notable de phase stationnaire qui est en général aqueuse. Les marques principales du papier trouvé dans le commerce sont Whatman, Schleider et Schüll, Durieux, Arches.

Il existe huit catégories de papier Whatman, classés selon leur épaisseur, la texture de leur surface et la vitesse avec laquelle l'eau s'y diffuse. Par exemple, le papier Whatman n°1 est le plus utilisé, mais si on désire une grande vitesse d'écoulement, on emploiera le n°4 ; le papier n°20 est très lent, mais il permet une meilleure séparation, donnant les taches très denses et uniformes.

2.3. Applications

La CP est employée principalement pour l'analyse des composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels.

3. Chromatographie sur colonne conventionnel

Cette technique de chromatographie solide-liquide permet des séparations de quantité de soluté qui peuvent varier de 500 mg à plusieurs grammes tout dépend du diamètre de la colonne et de la quantité de la phase stationnaire utilisés.

3.1. Description de la méthode

La phase stationnaire remplit une colonne de longueur et de section variables. Le mélange, en solution très concentrée, est déposé au sommet de la colonne. La séparation des constituants du mélange résulte de l'écoulement continu d'un éluant à travers la colonne par gravité. Dans la technique classique, l'éluant est un solvant unique mais on peut accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des constituants du mélange.

3.2. Phase stationnaire

Une grande surface spécifique de l'adsorbant est souhaitable pour obtenir de meilleures séparations. Les adsorbants les plus utilisés sont :

- **L'alumine (Al_2O_3)** sous forme acide, basique ou neutre. Cet adsorbant ne peut être employé qu'avec des composés organiques stables (l'alumine acide entraîne la déshydratation des alcools tertiaires, l'alumine basique entraîne l'hydrolyse des esters).

L'alumine est un adsorbant polaire ; le constituant le plus polaire sera le plus fortement fixé et c'est le constituant le moins polaire qui sera élué le premier.

- **Gel de silice (SiO_2)**, se présente sous forme d'une poudre blanche utilisée en particulier pour séparer des composés organiques qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être séparés sur l'alumine. La granulométrie d'un adsorbant employé en chromatographie sur colonne est plus importante que celle d'un adsorbant employé en CCM (80 à 200 μm au lieu de 70 μm).

Les adsorbants suivants sont classés selon l'ordre croissant de leurs forces d'interactions avec les composés polaires : papier, cellulose, amidon, sucres, carbonate de sodium, oxyde de magnésium, gel de silice, alumine, charbon activé.

3.2.1. Eluant

L'éluant généralement employé est un mélange de deux solvants. Le plus souvent, au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les constituants les moins polaires (les moins retenus par l'adsorbant) ; on augmente ensuite la polarité de l'éluant par addition graduelle du solvant le plus polaire ; on élue ainsi les constituants les plus polaires. Il

faut faire des essais sur CCM avec différents éluant pour avoir une bonne séparation entre les produits. Un R_f proche de 0,3 pour le produit le moins polaire.

- **La polarité** de l'éluant est un facteur important. Si l'éluant est suffisamment polaire, les constituants du soluté sont entraînés ; s'il est apolaire, les constituants apolaires (moins retenus) sortiront les premiers et les produits polaires ne migreront que par l'addition d'un solvant polaire (mélanges).
 - La polarité c'est la propriété des molécules de posséder des centres positive et négative séparés, cet arrangement résulte de la nature de sa tomes mis en jeu et de leur configuration.
 - En chromatographie, la définition est élargie et englobe des propriétés telles que la liaison hydrogène et le phénomène de la polarisation.
 - Les composés organiques oxygénée, alcools, cétones, ester..., ont des moments dipolaires plus faibles et forment des liaisons hydrogènes moins facilement que l'eau (solvant très polaire). La polarité relative des solvants est caractérisée par leur constante diélectrique.

➤ **Polarité relative des solvants:**



3.3. La vitesse d'élution

La vitesse d'élution doit être la plus constante possible; elle doit être suffisamment lente pour que le soluté soit plus près de l'équilibre entre les phases mobile et stationnaire. Si la vitesse d'élution est trop faible, les constituants diffusent dans l'éluant. Le chromatogramme présente alors des bandes larges et la séparation est médiocre ; une vitesse d'élution élevée n'est autorisée que dans le cas où les substances à séparer ont des polarités très voisines.

3.4. Dimension de la colonne

La hauteur de la colonne est égale à sept à dix fois le diamètre intérieur de la colonne. Il faut laisser un espace libre d'environ 10 cm au-dessus de l'adsorbant pour faire couler le

solvant. Les colonnes classiques ont à leur base une plaque de verre fritté qui permet l'écoulement libre de l'éluant tout en empêchant le passage de l'adsorbant (Fig 28). On peut utiliser une burette, au fond de laquelle on place du coton.



Figure 28 : Colonne classique

3.5. L'opération de remplissage

L'opération de remplissage de la colonne doit être le plus homogène possible et totalement exempt de toute bulle d'air ou de zone sans phase stationnaire. Les surfaces inférieures et supérieures de l'adsorbant doivent être parfaitement horizontales. Si ces conditions ne sont pas remplies, on aura alors des zones déformées pendant la séparation des composés. Il existe deux modes de remplissage de la colonne.

- ✓ **Remplissage par voie humide:** on prépare dans un bécher, un mélange parfaitement homogène de l'adsorbant et du moins polaire des deux solvants de façon à obtenir une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement (on verse l'adsorbant dans le solvant par petites quantités et en agitant). On verse suffisamment de bouillie et on frappe les parois de la colonne pour favoriser le tassement de l'adsorbant.
- ✓ **Remplissage par voie sèche:** on remplit la colonne au deux tiers avec le moins polaire des deux solvants puis on ajoute l'adsorbant en poudre par petites portions successives.

3.6. Dépôt de l'échantillon

Si l'échantillon est liquide, il est déposé tel quel. Si l'échantillon est solide, on le dissout dans un minimum du moins polaire des deux solvants. On ajuste d'abord le niveau du solvant pour qu'il soit juste au-dessus de la surface supérieure de l'adsorbant. Ensuite, robinet fermé, on coule l'échantillon (pur ou en solution très concentrée) au sommet de la colonne en essayant de le distribuer de la façon la plus uniforme possible sur les bords de la colonne. On ouvre le robinet un court instant de façon que l'échantillon pénètre dans la colonne et soit adsorbé en une zone cylindrique de faible épaisseur au sommet de la colonne.

3.7. L'alimentation en solvant

L'alimentation en solvant s'effectue à l'aide d'une ampoule de coulée. On doit s'assurer, durant l'élution, que la surface de l'adsorbant est toujours recouverte de solvant et n'est jamais au contact de l'air. Lorsque débute l'alimentation en solvant, on règle le débit de l'alimentation de façon qu'il soit le même que celui de l'écoulement au bas de la colonne (vitesse de 5 à 50 gouttes par minute). Le volume de chaque fraction recueillie varie de 1 à 50 mL selon les cas. On collecte les fractions et on les analyse (Fig 29).



Figure 29 : Schéma d'une colonne chromatographique

3.8. Analyses des fractions

Lorsque les composés qui se séparent forment des zones colorées dans la colonne ou sont fortement fluorescents aux U.V, il est facile de les repérer soit directement sur la colonne soit dans les fractions recueillies. La récupération s'effectue alors simplement en réunissant les fractions appropriées et en évaporant le solvant. Si les produits ne sont pas colorés, après une analyse appropriée (HPLC, CCM, IR et UV) réunir les fractions correspondant au produit désiré et évaporer le solvant.

3.9. Les inconvénients de la chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne 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.
- + Il est indispensable de coupler cette chromatographie avec d'autres méthodes de façon à pouvoir détecter les constituants du mélange.
- + Les paramètres influençant la séparation sont : Le diamètre et la hauteur de la colonne
- + La quantité de la phase stationnaire et sa granulométrie
- + Le débit de l'éluant et sa polarité

Exercices

1. Chromatographie sur couche mince

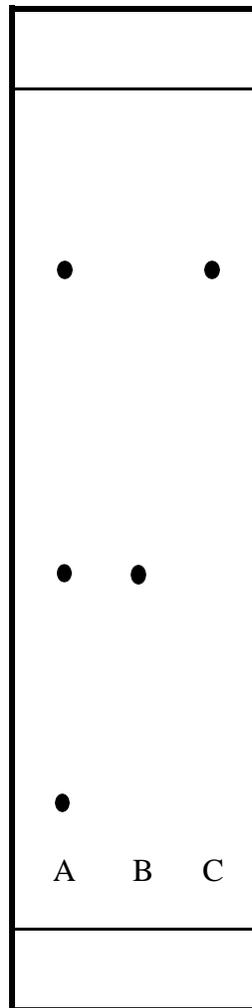
Exercice 1.1:

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 8,3 cm du départ, le composé A à 7,5 cm et le composé B à 2,3 cm. Calculer le R_f des deux composés.

Exercice 1.2:

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 1.3:**

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 1.4 :

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 ?

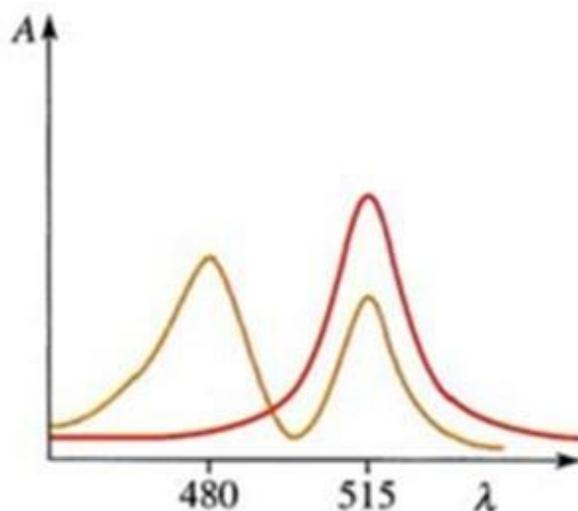
2. Chromatographie sur colonne

Exercice 2.1:

On réalise une chromatographie sur colonne d'un sirop de menthe, puis on recueille deux fractions colorées F1 et F2.

Les spectres d'absorption de ces fractions, ont l'allure ci-après.

Le colorant jaune tartrazine (E102) présente un maximum d'absorption pour la longueur d'onde $\mu_{(E102)} = 420$ nm et le colorant bleu patenté (E131) présente un maximum d'absorption pour la longueur d'onde $\mu_{(E131)} = 625$ nm. La chromatographie a-t-elle permis de séparer complètement les deux constituants ? Justifier.



Corrections**Exercice 1.1:**

Non, le bleu patenté contient le jaune tartrazine

Exercice 1.2:

$$R_{f(A)} = 0,9$$

$$R_{f(B)} = 0,28$$

Exercice 1.3:

Les encres B et C sont pures, l'encre A est un mélange

$$R_f = 0,8$$

Exercice 1.4:

- a) $R_{fA} = 0,5$; $N_A = 6834$; $H_A = 0,004$ mm
b) $R_{fB} = 0,4$; $N_B = 2235$; $H_B = 0,011$ mmb)
c) $R = 2,7$

Exercice 2.1:

- a) Non, A un mélange
b) Le composé un contient le menthol

Chapitre IV : Chromatographie Liquide Haute performance

1. La Chromatographie Liquide Haute Performance

1.1. Introduction

La chromatographie liquide haute performance appelé CLHP est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatil,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.

1.2. Appareillage

Un appareil CLHP (Fig 30) 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).



Figure 30 : Les composants d'un chromatographe liquide à haute performance (Appareil Dionex)

1.3. Réservoir de solvants

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

- a. Maintenir la stabilité de la colonne
- b. Être compatible avec le détecteur
- c. 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 dégazé et filtré 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.

1.4. 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.

1.5. 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'éluant (éluant de composition variable). L'éluant gradué 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

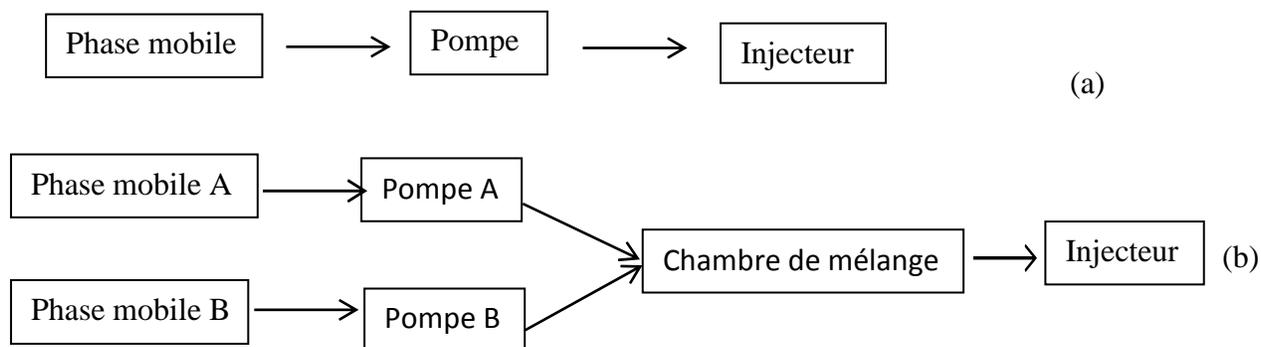


Figure 31 : Représentation schématique d'un système de pompage

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

1.6. 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.



Figure 32 : Injecteur à boucle

1.7. Colonne

Les colonnes CLHP sont généralement courtes et droites en acier inoxydable se caractérisent 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 (Fig 33). 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.



Figure 33 : Colonne CLHP

✓ **Les thermostats des colonnes**

La plupart des appareils commerciaux récents sont équipés de dispositifs de régulations de la température ; qui la contrôle de la température ambiante jusqu'à 150°C (Fig 34). On obtient souvent de meilleurs chromatogrammes en maintenant la température constante à quelques dixièmes de degrés Celsius.



Figure 34 : Colonne dans un thermos

1.8. Détecteurs

1.8.1. 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.

1.8.2. 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.

1.8.3. 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.

1.8.4. Détecteur électrochimique

Cette méthode de détection ne s'adresse qu'à la détection de molécule douée 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 O_2 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.

IV-1-8-4- 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).

1.9. Interactions moléculaires 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.

1.10. 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

1.11. Applications

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

2. Chromatographie d'adsorption

2.1. L'adsorption

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 : forces électrostatiques, forces de liaison d'hydrogène et autre. Pour que cette adsorption soit utilisable à des fins préparatoires, il faut que cette fixation soit réversible. La désorption consiste à remettre, à l'aide d'un éluant approprié la substance en solution par rupture des liaisons précédentes.

2.2. La Chromatographie d'adsorption

La chromatographie liquide solide appelée aussi chromatographie d'adsorption met en œuvre des phases stationnaires ayant des propriétés adsorbants, principalement les gels de silice poreuse et les gels d'alumine. Cette technique est complémentaire à la chromatographie de partage phase en normale. La séparation est fondée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange sur cette phase, donc basée sur l'existence de dipôles dans une structure moléculaire.

2.3. Les adsorbants

Les adsorbants sont sous forme de fines granulométries 3 à 20 μm . La séparation est meilleure, mais plus lente si les grains sont fins. Plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires. La séparation se fait par ordre croissant de leurs forces d'interaction avec les composés polaires. On distingue :

- ✚ Les supports pelliculaires : constitués de billes de verre avec un diamètre moyen de 40 μm recouvertes d'une pellicule d'adsorbant de 2-3 μm d'épaisseur.
- ✚ Les supports entièrement poreux, caractérisés par une grande capacité (100 fois plus grandes que celle des supports pelliculaires)

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 souhaitable car elle permet d'obtenir de meilleures séparations. Les adsorbants les plus couramment utilisés sont :

Silice (SiO₂)

La silice provient de la déshydratation de l'acide silicique, elle se présente sous forme d'une poudre blanche de très fine granulométrie. Le mécanisme de rétention sur cet adsorbant résulte de la présence à la 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.

Alumine (Al₂O₃)

Cet adsorbant est très utilisé car il présente de très bonnes propriétés d'adsorption, il s'obtient par déshydratation de l'hydroxyde Al(OH)₃ ; cet adsorbant est dit basique. L'alumine convient bien pour la séparation de solutés acides (acides carboxyliques).

Les molécules polaires sont toujours plus adsorbées que les molécules non polaires. Les groupements fonctionnels classés selon un ordre de polarité décroissante sont fournis dans la liste ci-dessous :

Amides > amines > acides carboxyliques > alcools > cétones > esters > composés nitrés > éthers > hydrocarbures aromatiques > hydrocarbures non saturés > hydrocarbures saturés.

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.

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

2.4. 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. Plus de 90% des séparations en chromatographie d'adsorption utilisent un mélange hexane ou isooctane avec l'éther isopropylique soit le chlorure de méthylène, acétonitrile et méthanol.

2.5. Applications

La chromatographie d'adsorption s'applique pour la séparation des composés apolaires de masses moléculaires inférieure à 3000.

Elle est très utile pour les isomères, tels que les dérivés du benzène substitués en méta et en para et complémentaire à la chromatographie de partage en phase normale.

3. La chromatographie de partage

3.1. Introduction

La chromatographie de partage fonctionne par partage de solutés entre deux phases non miscibles ; l'une mobile et l'autre stationnaire. La phase stationnaire est un liquide qui imprègne un support en principe inerte ou est greffée par liaison chimique covalente sur ce support. Cette technique s'apparente à l'extraction liquide/liquide basée sur les différences de solubilités dans deux phases non miscibles, mais dans ce cas une des deux phases est immobilisée sur un solide dont les particules ont des diamètres très petits. Il s'établit un équilibre qui dépend de la solubilité relative du soluté dans les deux solvants donc du coefficient de partage.

L'équilibre de répartition du soluté entre les deux phases mobile et stationnaire s'exprime par l'équation:

$$K = C_S / C_M \quad \text{et} \quad K' = V_S / V_M$$

K : coefficient de distribution ou de partage qui dépend de la nature des constituants.

k': facteur de capacité

V_S : volume de la phase stationnaire contenue dans la colonne

V_M : volume de la phase mobile contenue dans la colonne

C_M et C_s : concentrations respectives du soluté dans la phase mobile et dans la phase stationnaire.

La séparation de deux ou plusieurs corps sera d'autant efficace que leurs coefficients de partage respectifs seront différents.

Il y'a deux modes de chromatographie de partage :

Mode a. La phase stationnaire est polaire (mode normal) et la phase mobile est un solvant non polaire.

Si on a deux composés qui sont mal séparé en phase normale, donc on doit augmenter le temps de rétention en diminuant la force de la phase mobile donc diminuer la polarité de la phase mobile.

Mode b. La phase stationnaire est apolaire (mode inverse) et la phase mobile est un solvant polaire.

L'ordre d'élution dépend de la polarité des solutés :

Le temps de rétention augmente avec une augmentation de la polarité du produit étudié.

Si on a deux composés qui sont mal séparé en phase inverse, donc on doit augmenter le temps de rétention en augmentant la force de la phase mobile donc augmenter la polarité de la phase mobile.

Dans le cas d'un échantillon composé de solutés de polarités différentes l'utilisation d'un gradient d'élution est recommandée.

3.2. Support

Ce sont des solides très finement divisés qui présente une très grande surface, afin de retenir sous un petit volume une grande quantité de phase liquide.

Parmi les supports les plus utilisés, on peut citer :

- ✚ Le gel de silice terre diatomées
- ✚ La poudre de cellulose et un certain nombre de polymères synthétiques dérivés du vinylbenzène

3.3. Phase stationnaire

On peut subdiviser la chromatographie de partage en chromatographie liquide-liquide et liquide-phase greffée ; la différence réside dans la manière dont on fixe la phase stationnaire sur les particules du support. Dans la chromatographie de partage liquide-liquide, le liquide est fixé par adsorption physique sur la surface du support, alors qu'il est attaché par liaison chimique dans la chromatographie à phase greffée. On a développé l'usage de phase stationnaire chimiquement liées (greffées) en raison de leur plus grande stabilité.

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

Phases greffées polaires (phase normale)

La présence de fonctions particulières sur le greffage (-CN, -NH₂,...) peut apporter une sélectivité intéressante. De plus, il est possible de travailler avec un gradient de force éluant, donc d'analyser en une seule fois des mélanges contenant des composés de polarités très différentes. En chromatographie à phase normale, le constituant le moins polaire est élué le premier ; l'augmentation de la polarité de la phase mobile réduit son temps d'élution.

Phases greffées apolaires (phase inverse)

Ce sont les supports les plus couramment utilisés, principalement avec un greffage alkyl (octadécylsilane ou -ODS ou -C18). 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'élution.

3.4. Phase mobile

L'éluant doit être immiscible à la phase stationnaire. La polarité de la phase mobile a une grande influence sur le coefficient de partage des solutés, elle est constituée d'un mélange : Eau/ solvant organique, en proportion variable.

La phase aqueuse : l'eau est le solvant le plus polaire

Le solvant organique : Il existe un grand nombre mais les plus employés sont l'acétonitrile et le méthanol. Il est parfois intéressant de modifier la polarité de la phase mobile en lui ajoutant, en mode normale, une substance plus polaire ou en mode inverse une substance moins polaire.

Le pouvoir éluant croissant des solvants est le suivant:

Ether de pétrole → cyclohexane → tétrachloroéthène → trichloroéthane → dichlorométhane → étherdiéthylique → trichlorométhane → éthanoate d'éthyle → pyridine → propanone → éthanol → eau → acide éthanoïque.

3.5. Applications

De nombreux pesticides de polarité variée peuvent être analysés par chromatographie de partage en phase inverse. Elle convient également à la séparation de molécules très polaires, mal séparés par chromatographie d'adsorption.

4. La chromatographie d'échange d'ions

4.1. Définition

La chromatographie ionique (CI) est une technique analytique qui permet l'analyse qualitative (par séparation des espèces présentes) et quantitative des espèces ioniques présentes dans un échantillon liquide dépourvu de matières en suspension.

4.2. Principe de la méthode

En chromatographie ionique le mécanisme de séparation se produit par échange d'ions entre une phase stationnaire, qui porte des groupements fonctionnels chargés et une phase mobile. Des gels de silice chimiquement modifiés à l'état solide remplissent une colonne d'acier et servent de phase stationnaire.

Un échangeur d'ions est une substance, généralement poreuse, sur laquelle est greffé (fixé), par liaison covalente, un groupement chimique ionisable. Cette partie chargée peut interagir fortement avec des ions présents dans le mélange chromatographié. Ainsi des molécules chargées peuvent s'adsorber réversiblement sur l'échangeur d'ions, et être ensuite désorbées de la résine, en modifiant la composition ionique du solvant. On peut résumer le processus comme suit : dépôt des substances sur la colonne choisie en fonction des charges des molécules et de la résine, élution des molécules généralement en augmentant de façon graduelle la force ionique et enfin régénération de l'échangeur d'ions (par lavage avec une solution de pH permettant de remettre les charges dans leur valeur initiale).

4.3. La phase stationnaire

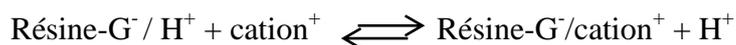
La phase stationnaire dans la chromatographie ionique est une résine (polymère insoluble préparé sous formes de billes) échangeuse d'ions contenant des groupements chargés positivement ou négativement permettant la rétention des espèces dont on désire obtenir la séparation. Le soluté ionique ou ionisable interagit avec les groupes de charges opposées de la phase stationnaire.

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 :

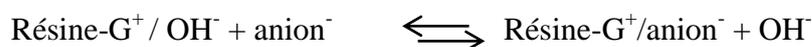
1. Les échangeurs de cations portent des groupements chargés négativement (-)

Résine anionique (échangeur de cations) : l'échange se fait suivant l'équation



2. Les échangeurs d'anions portent des groupements chargés positivement (+)

Résine cationique (échangeur d'anions): l'échange se fait suivant l'équation

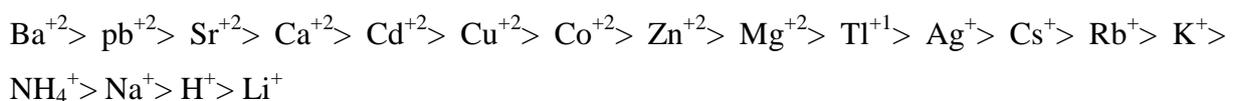


Chaque type d'échangeur se divise en deux groupes :

- a. Échangeur fort : reste pleinement chargé entre pH 3 et 10
- b. Échangeur faible : reste chargé dans une gamme de pH restreint

Le groupement sulfonate $-\text{SO}_3^-$ est un échangeur cationique fort. L'affinité de la résine sulfonate pour un cation augmente avec la charge de celui-ci et entre anions de même charge, l'affinité augmente avec le Z de l'élément.

L'ordre d'affinité pour un groupement sulfonate est :



L'acide carboxylique ($\text{G}^- = \text{COO}^-$) chargé à partir de pH 4,5 est un échangeur cationique faible. Le groupement ammonium quaternaire $-\text{NR}_3^+$ est un échangeur anionique fort car leur

capacité d'échange est constante et indépendante du pH.

L'ordre d'affinité pour l'ammonium quaternaire est :

Citrate > SO_4^{2-} > oxalate > I^- > NO_3^- > Br^- > SCN^- > Cl^- > formiate > acétate > OH^- > F^-

On utilise les échangeurs d'anions forts pour séparer des acides faibles (acides carboxyliques) et les échangeurs faibles pour séparer des acides forts. Le même type de raisonnement s'applique aux échangeurs de cations. En général la résine préfère les ions porteurs de la plus grande charge et pour les ions de plus petite dimension. Le pH agit sur la rétention, surtout pour des échangeurs anioniques ou cationiques faibles.

Exemple :

- ✓ Diminuer le pH, diminue l'ionisation des échangeurs des cations faibles.
- ✓ Augmenter le pH, peut diminuer l'ionisation d'échangeurs des anions faibles.
- ✓ Echangeurs anioniques ou cationiques forts, pas d'influence du pH sur temps de rétention.

4.4. Les supports

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

Les caractéristiques des supports sont :

- **Porosité** : le support est un polymère plus ou moins réticulé. La porosité dépend du taux de pontage : un polymère très réticulé a des pores de petite taille et convient pour des petites molécules.
- **Granulométrie** : le support est commercialisé sous forme de grains de diamètre variant de 30 à 800 μm (chromatographie basse pression) celui des colonnes HPLC a une granulométrie de 5-10 μm (supports totalement poreux) ou légèrement supérieure (supports pelliculaires, en couche de 1 μm sur des billes de verre). Les échanges sont d'autant plus rapides et efficaces que les grains sont petits.
- **Capacité de rétention** : c'est la quantité maximale d'ions que peut fixer l'échangeur d'ions, exprimée en mEq/g (milliéquivalent par gramme) de résine sèche ou en mEq/mL de poids de résine humide. Elle dépend de la densité du support en groupements fonctionnels et il faut en tenir compte pour ne pas trop charger une

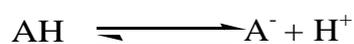
colonne. L'affinité d'un échangeur pour un ion donné dépend de plusieurs facteurs:

- a. De la charge des groupements fonctionnels, qui elle-même dépend :
 - + De leur nature (pK_a)
 - + Du pH de la solution : un tampon maintient le pH constant tout au long de l'analyse. Il maintient une charge identique sur la résine. L'ion du tampon utilisé, ayant le signe contraire à la charge de la résine, est présent au moment du dépôt de l'échantillon (conditionnement)
 - + De la densité de charge de l'ion considéré, qui dépend: de la nature de l'ion (pK_a, pH_i)
 - + De la taille de l'ion (l'ion est d'autant plus fixé qu'il est chargé, ou/et qu'il est petit)
 - + De la concentration des ions : Les concentrations agissent sur la position de l'équilibre. Une concentration élevée en ions, même de faible affinité, pourra éluer l'ion fortement retenu.
- b. De l'accessibilité des groupements fonctionnels (porosité et granulométrie)

4.5. La phase mobile

La phase mobile est une solution aqueuse de force ionique donnée (généralement un tampon de pH). On peut éluer avec une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou avec un gradient de pH et (ou) de force ionique, pour décrocher successivement les différents ions fixés sur l'échangeur. 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. Le pH est le paramètre principal de rétention.

Pour un acide faible, une augmentation de pH se traduit par :



Par un déplacement de l'équilibre vers la gauche, l'acide AH étant peu (ou pas) retenu. Avec les acides aminés, on utilise une colonne échangeuse de cations (polystyrène sulfoné). On se place initialement dans des conditions de pH ($\ll 2$) pour lesquelles tous les acides aminés sont sous la forme



Si on injecte sur la colonne des solutions tampon de pH croissant, les acides aminés

seront élués en fonction de leur pH_i . En effet, quand le pH de la phase mobile est égal au pH_i l'acide aminé se trouve sous forme de switterion non chargé, donc non retenu.



4.6. Détection

Un détecteur de conductivité est souvent utilisé avec ce type de chromatographie vu la nature ionique des analytes. Chaque ion peut donner un signal de conductivité, selon sa concentration en solution et sa conductivité. Une colonne de neutralisation ou de suppression de l'éluant est habituellement combinée à ce type de détecteur afin de supprimer la conductivité de l'éluant sans affecter celle de soluté donc transforme les ions de l'éluant en une espèce moléculaire peu dissociée.

La détection par ampèremètre est appropriée pour les solutés, dont les produits d'oxydation se déposent à la surface des électrodes de mesure. Il s'agit notamment d'hydrates de carbone (sous forme ionique à des valeurs élevées de pH) ainsi que la plupart des composés sulfurés comme les thiols. La détection photométrique concerne la plupart des acides et amines aromatiques ou hétérocycliques comme l'acide benzoïque, l'aniline ainsi que les nitrates, les iodures et sulfites.

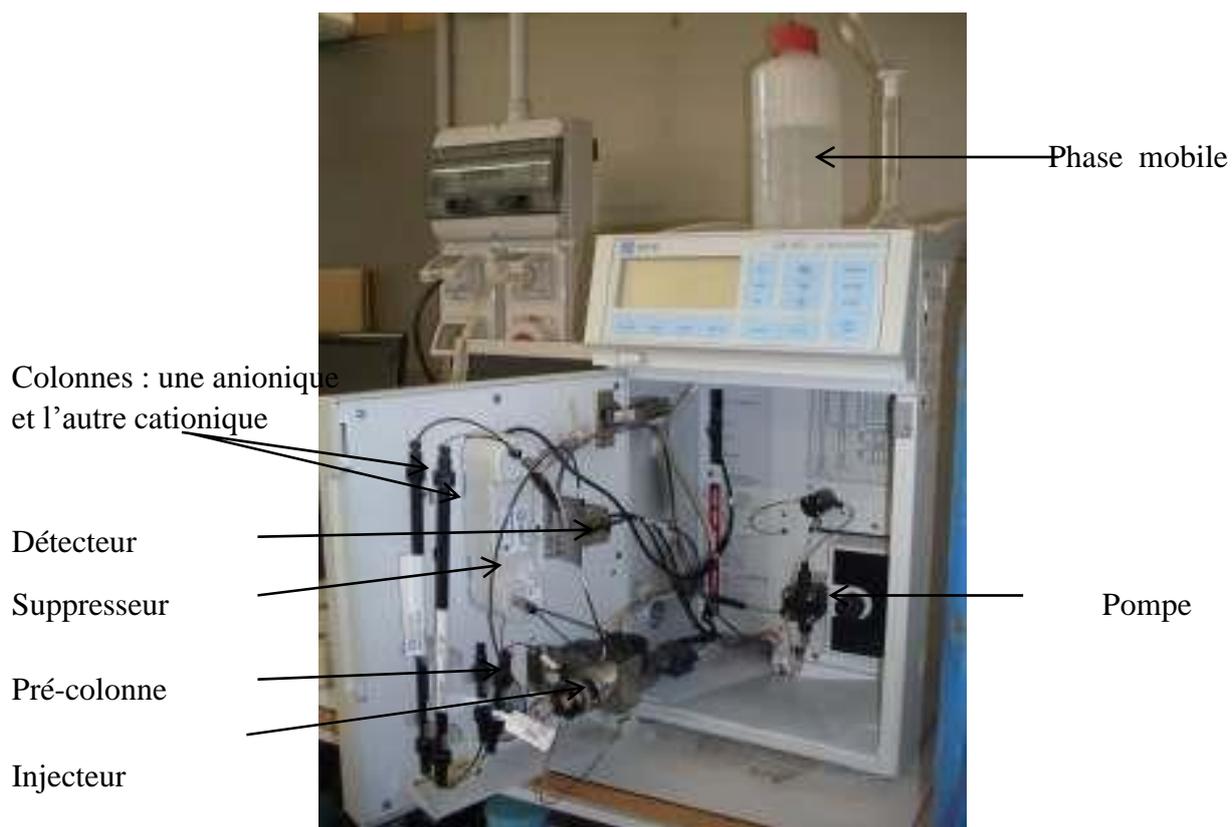


Figure 35 : Les composants d'un chromatographe ionique (appareil Dionex)

4.7. Applications

La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour séparer des molécules ionisables, quelle que soit leur taille: ions minéraux (tous les cations alcalins, alcalino-terreux ou métalliques), acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés. C'est une méthode analytique de référence en analyse des eaux, et est adaptée aux milieux biologiques.

5. La chromatographie d'exclusion

5.1. Définition

La chromatographie d'exclusion est aussi appelée tamisage moléculaire permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme.

5.2. Principe de la chromatographie d'exclusion

Dans cette technique de chromatographie on utilise des granules de gels poreux, dont les pores ont une taille voisine de celle des molécules des composés. La séparation résulte de la différence de taille qui est fondée sur la possibilité de soluté à pénétrer ou de ne pas pénétrer à

l'intérieur des pores de la phase stationnaire (limite d'exclusion). Les molécules de l'échantillon ; certains sont assez petites pour pénétrer dans la matrice poreuse, tandis que les plus grandes restent dans le volume interstitiel de la phase stationnaire. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

Les molécules de taille supérieure à celle des pores des billes de Sephadex sont totalement exclues du gel et ne se répartissent que dans le volume extérieur aux billes. Ils ont donc un trajet plus court à parcourir pour arriver en bas de la colonne. Elles sortent les premières, à un volume d'éluion (V_M ou V_0) appelé volume mort de la colonne.

Les molécules de taille inférieure à celle des pores des billes de Sephadex peuvent pénétrer librement dans les billes et se répartissent dans l'ensemble des liquides de la colonne (volume de liquide à l'intérieur des pores des billes plus volume de liquide à l'extérieur des billes ou phase mobile). Les pores dans les billes du gel sont assez grands afin de permettre la pénétration complète des petites molécules, mais ne laissent pas pénétrer toutes les molécules à partir d'une certaine taille.

Les molécules de taille intermédiaire pénètrent un peu dans les billes, en fonction de leur taille et de leur forme; elles pénètrent d'autant moins qu'elles sont plus grosses, et elles sont éluées dans l'ordre des masses molaires décroissantes. Les molécules de masse molaire intermédiaire sortent à des V_e intermédiaires et sont effectivement séparées.

5.3. Phase stationnaire

Les phases stationnaires sont constituées par des polymères réticulés organiques ou minéraux, sous forme de grains sphériques de 3 à 10 μm de diamètre avec des pores compris entre 4 nm et 200 nm et sous forme de billes ou de perles parfaitement calibrées. Mis en leur présence le solvant pénètre à l'intérieur de chaque particule et provoque leur gonflement.

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 utilisé pour séparer des espèces non polaires.

5.4. Caractère et nature des gels

- ✓ **Gels mous** : Ce sont des 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.

- ✓ **Gels de Dextrane** (Sephadex) : Ces gels sont obtenus à partir du dextrane polyholoside polymérisé obtenu après culture de bactéries dans des solutions de saccharose. Le dextrane est donc formé de molécules de glucose reliées entre elles par des liaisons α -1,6 glucosidiques. Ces molécules sont insolubles dans l'eau, mais la présence de nombreux groupes hydroxyles les rendent particulièrement hydrophiles. Ces gels permettent d'obtenir des séparations de molécules dont les masses vont de 700 à 800000.

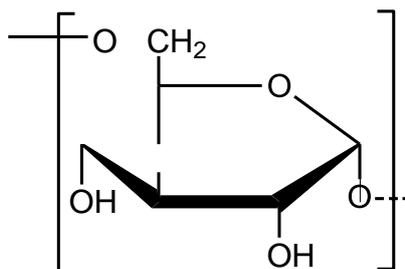


Figure 36 : Structure chimique de dextrane

- ✓ **Gels de polystyrène** (styrigel) : Ils sont obtenus par polymérisation des dérivés du vinyl benzène ou styrène (PS-DVB) en présence d'un agent réticulant le divinyl benzène. Ils ne doivent pas être utilisés avec des solvants polaires. Ces molécules sont hydrophobes ; ils permettent la séparation des substances peu polaires tels les lipides.
- ✓ **Gels semi-rigides** : Ils sont produits par polymérisation, ce sont des dérivés du vinylbenzène (DVB) en présence d'agent réticulant. On les utilise principalement avec des solvants organiques.
- ✓ **Aérogels** : Ce terme désigne des substances qui ne gonflent pas ; ce sont des gels de silice donc des verres (poudre de verre très fine de granulométrie contrôlée et de porosité bien déterminée). Ils ont évidemment des sites d'adsorption (groupements hydroxyles) qui peuvent retarder excessivement les espèces polaires. On modifie alors chimiquement la silice. Diamètre des pores : 10 à 150 nm.

5.5. Phase mobile

La phase mobile doit surtout être capable de mouiller la phase stationnaire 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. Les solvants les plus couramment utilisés sont : Eau, chloroforme, trifluoroéthanol. Cette méthode chromatographique est pratiquement indépendante de la nature du solvant donc on n'utilise pas de gradient d'éluion puisqu'il n'y a pas d'interaction soluté/phase mobile.

Le volume d'élution dans la colonne est décomposée en deux parties : Le volume interstitiel ou volume mort V_I (extérieur aux pores laissés libre entre les grains du gel) et le volume V_P le volume totale des pores.

V_I : volume nécessaire pour transporter une grosse molécule

$V_e = V_I + V_P$ est le volume de la phase mobile correspondant pour une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores

Les volumes d'élution $V_e = V_I + KV_P$ pour éluer les molécules de tailles intermédiaires K représente le degré de pénétration d'une espèce présente dans un volume V_P .

- ✚ Si $K = 0$, le soluté est totalement exclus.
- ✚ Si $0 < K < 1$, le soluté est partiellement inclus. Le taux d'inclusion augmente avec K .
- ✚ Si $K = 1$, le soluté est totalement inclus dans le gel.
- ✚ Si $K > 1$, le soluté est non seulement inclus, mais aussi adsorbé par le gel.

5.6. Détection

Le détecteur le plus employé est le réfractomètre différentiel ; d'autres détecteurs sont parfois ajoutés au réfractomètre.

5.7. Applications de la chromatographie d'exclusion

Les applications de la chromatographie d'exclusion sont diverses, on peut citer, à titre d'exemple la séparation de polymère ou de macromolécules de poids moléculaires élevé d'origine biologique (fractionnement des polymères et les protéines), la caractérisation des pétroles bruts et la séparation des polyélectrolytes et des biopolymères dans le domaine biochimique.

Cette technique est également appliquée au fractionnement de mélanges de macromolécules et à la détermination (approximative) de la masse molaire des protéines. IL existe une relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire. Dans ce dernier cas, il faut d'abord étalonner la colonne avec des protéines de masse molaire connue, tracer le courbe $\log(M)$ en fonction du volume d'élution, puis effectuer une détermination graphique.

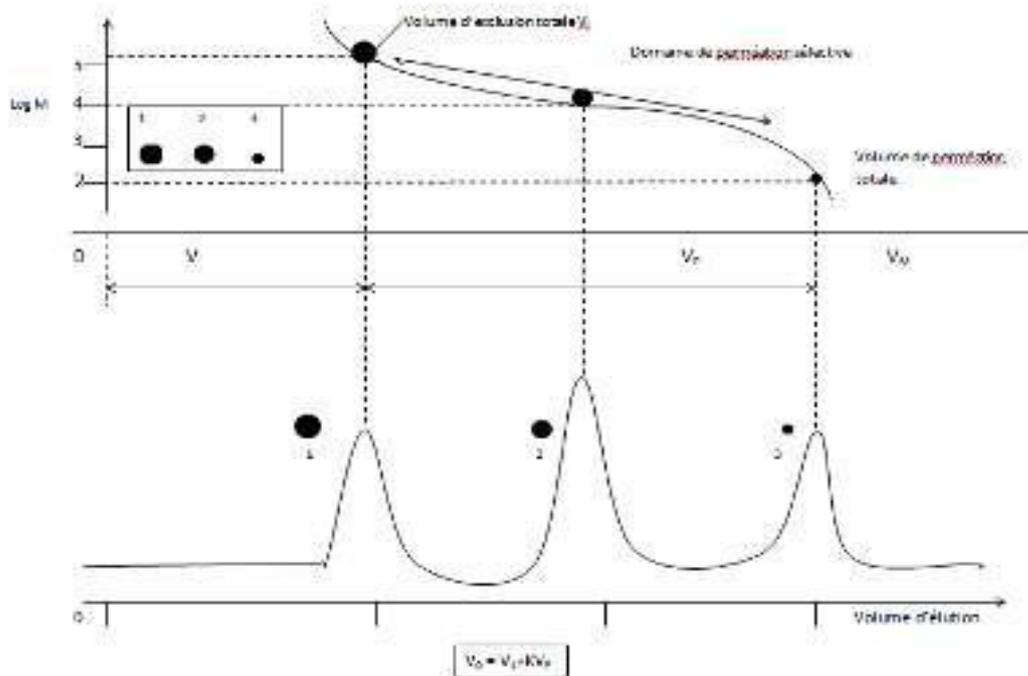


Figure 37 : Chromatogramme figurant une séparation de trois espèces (1, 2, 3) et la courbe $\log(M) = f(V_e)$

6. La chromatographie d'affinité

6.1. Introduction

Ce mode de chromatographie connaît depuis 1970 un développement sans précédent et est appelé à prendre une place encore plus grande avec l'essor des biotechnologies. Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser.

Trois types d'affinité sont utilisés :

- Affinité enzyme–substrat
- Affinité ligand – récepteur
- Affinité antigène-anticorps

Très souvent la molécule fixée sera sur le substrat, le ligand ou l'anticorps, ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement.

6.2. Etapes d'une chromatographie d'affinité

Quand une solution contenant un mélange de protéines traverse la colonne, la protéine d'intérêt se liera au ligand immobilisé, alors que les autres protéines ne s'y lieront pas et

sortiront de la colonne on peut récupérer la protéine désirée sous une forme très pure en modifiant les conditions d'éluion pour faire en sorte que la protéine se détache du ligand.

1. Etape de fixation

Un ligand biospécifique est fixé par liaison covalente à une matrice (dextrane, agarose) sans perdre son affinité pour le produit à analyser. Le mélange de molécules contenant le composé à purifier est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.

2. Etape de purification

En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.

3. Etape d'éluion

La molécule est finalement décrochée de la colonne et recueillie. Cette étape peut être réalisée de différentes façons :

- + Tampons de pH différent de celui ayant permis la charge donc changement de l'état d'ionisation de la molécule donc on a désorption
- + Tampon de pH ionique différent de celle ayant permis la charge donc changement de conformation de la molécule.
- + Compétition avec un ligand libre (libération de la molécule d'intérêt par compétition pour les sites de fixation).

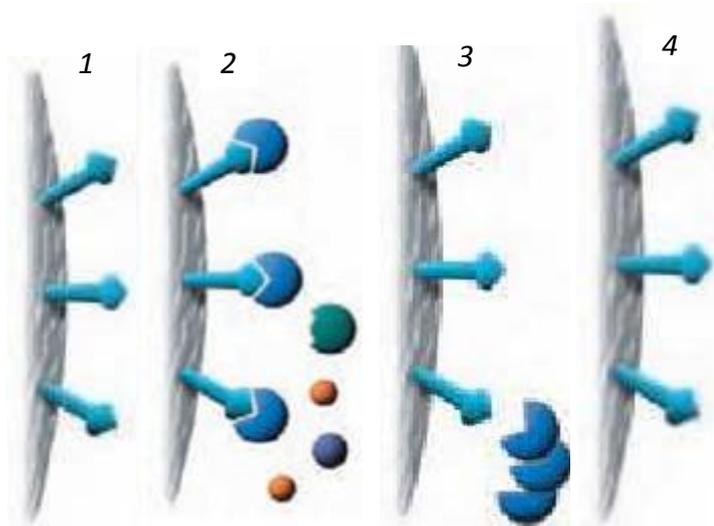


Figure 38 : Principe de séparation de la chromatographie d'affinité

6.3. L'interaction protéine-ligand

La liaison d'une protéine P à un ligand L peut être représentée par cette équation :



Où k_d représente la constante de dissociation (une mesure de l'affinité protéine-ligand).

Quand le ligand est couplé à une matrice M, l'équation devient :



La liaison du ligand sur la matrice ne doit pas interférer dans l'interaction protéine-ligand.

Le k_d' devrait varier entre 10^{-4} M et 10^{-10} M.

La quantité de protéine retenue sur la colonne (P-L-M) dépendra:

- Du K_d' (l'interaction est trop faible si la valeur est supérieure à 10^{-4} M)
- De la concentration de protéine dans l'extrait
- Du degré de liaison du ligand à la matrice donc de la concentration de L-M

6.4. Phase stationnaire

Le principe consiste à utiliser une phase stationnaire constituée d'un support (silice, polymère) sur lequel a été greffée une molécule organique particulière qui présente une affinité sélective pour certains constituants d'un mélange dont on cherche à les isoler. Ceux-ci

vont être sélectivement adsorbés ou tout au moins retenus sur la colonne, tandis que les autres composants sont très rapidement élués. Un changement de la phase mobile (pH, force ionique ou ajout d'un compétiteur) permet ensuite d'éluier les substances intéressantes. Le gel d'affinité est constitué d'un effecteur fixé par covalence à un support (carboxyméthylcellulose, Sephadex, gel de polyacrylamide) par l'intermédiaire d'un bras de fixation (espaceur), le plus souvent constitué d'une chaîne carbonée de longueur variable.

6.5. Avantage et inconvénient de la méthode

L'avantage de cette technique est sa très grande sélectivité potentielle, à tel point que son utilisation peut parfois permettre une purification suffisante en une seule étape, ce qui est rarement le cas avec les autres types de chromatographie.

L'inconvénient de cette technique provient de la nécessité de posséder un ligand adapté, lui-même suffisamment purifié, de son inadaptation à la purification de grandes quantités de molécules. En effet, la capacité est fonction du nombre de sites disponibles sur la résine : lorsque ceux-ci sont saturés, les molécules en surnombre ne seront pas purifiées.

6.6. Applications

La chromatographie d'affinité est utilisée pour purifier des produits présents dans ses mélanges biologiques, purifier la forme active d'un produit de son dérivé inactif et séparer des traces de molécules biologiques de grandes quantités d'impuretés

7. Chromatographie chirale

Un Composé organique dont la formule développée révèle l'existence d'un centre asymétrique, conduit généralement à un mélange des deux énantiomères possibles *R* et *S*. Si on chromatographie ce composé sur une colonne dont la **phase stationnaire est chirale**, c'est-à-dire possédant des centres asymétriques identiques et correspondant à un seul énantiomère (*R* ou *S*), on observe sur le chromatogramme deux pics. Ces pics résultent des interactions réversibles entre les énantiomères du composé et l'énantiomère de la phase stationnaire.

Les phases stationnaires sont des résines optiquement actives ou des gels de silice greffés avec des cyclodextrines (enchaînements cycliques de 5 à 7 molécules de glucose) par l'intermédiaire d'un « bras » ayant plusieurs atomes de carbone.

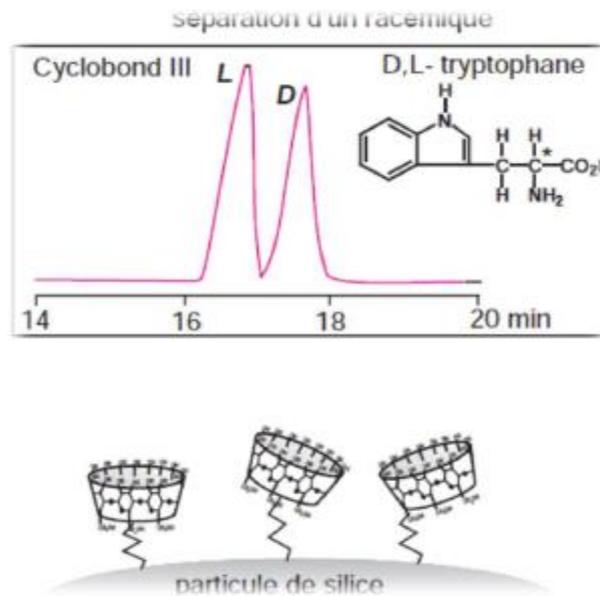


Figure 39 : Séparation d'un mélange racémique

7.1. Phases mobiles

Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire dans ce cas la chromatographie est dite *en phase normale*, dans le cas contraire elle est dite *en phase inverse*.

Avec une phase stationnaire apolaire (une couche paraffinique C8 et C18), l'ordre d'élution est opposé à celui des phases normales (phase stationnaire polaire). Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus.

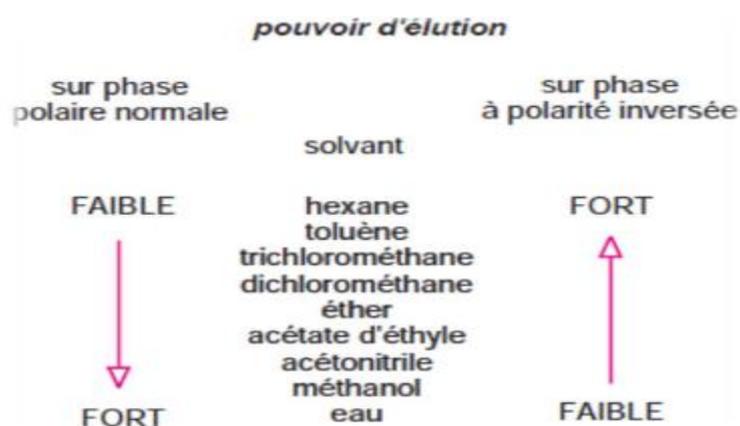


Figure 40 : Pouvoir d'élution

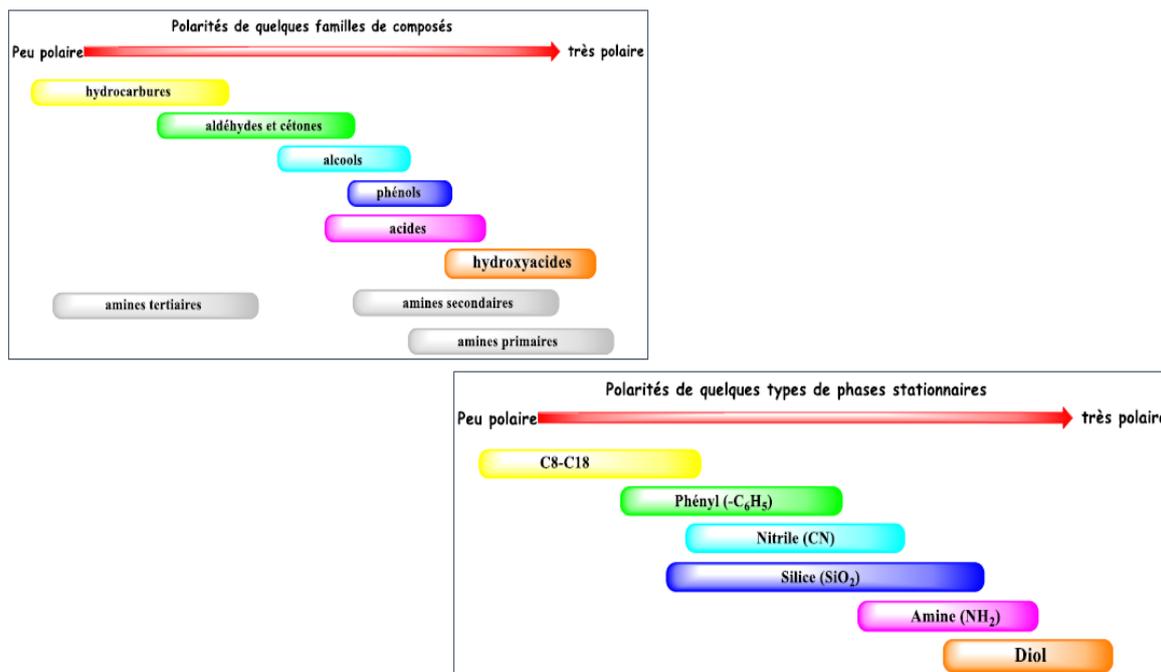


Figure 41 : Classement de polarité de quelques composés

7.2. Principaux détecteurs

En chromatographie, un détecteur doit réunir un certain nombre de qualités: donner pour chaque composé détecté une réponse proportionnelle à sa concentration instantanée, être sensible et avoir peu de bruit de fond et être stable dans le temps. Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés: **absorption**, **fluorescence** et **indice de réfraction**.

1. Détecteurs spectrophotométriques

La détection est basée sur la loi de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$): l'absorbance A de la phase mobile est mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde λ ou plusieurs longueurs d'onde dans l'UV ou le visible.

La détection UV est une détection sélective utilisée pour les composés contenant des groupements chromophores.

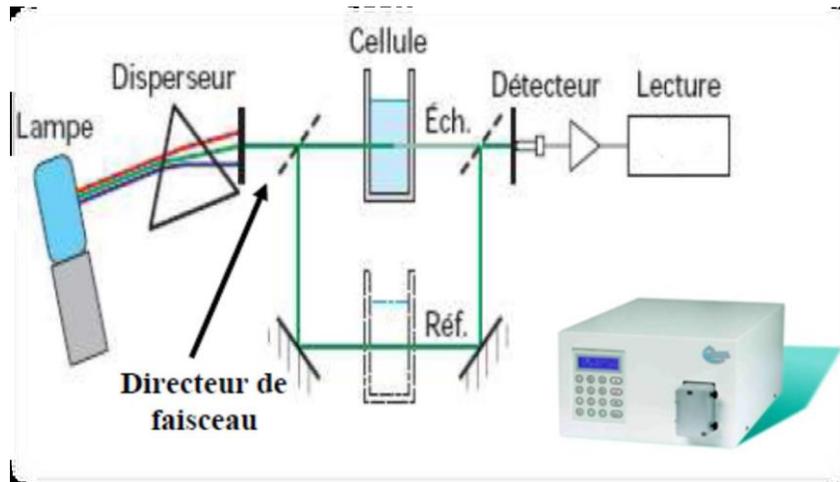


Figure 42 : Détecteur spectrophotométrique

2. Détecteur spectrofluorimétrique

Les composés fluorescents réémettent sous forme de radiations lumineuses une fraction plus ou moins grande du rayonnement de la source auquel ils sont soumis.

L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration de la substance. Les détecteurs de fluorescence sont utilisables pour les composés naturellement fluorescents.

3. Détecteur réfractométrique

Ce type de détecteur comporte un réfractomètre différentiel qui a pour objet de mesurer en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne. La sensibilité optimale correspond à un maximum d'écart entre les indices de réfraction des effluents et de la phase mobile.

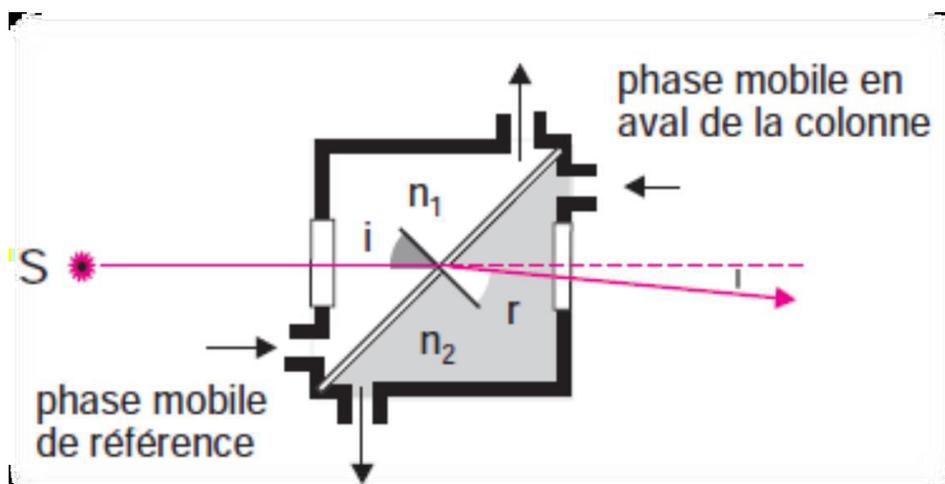


Figure 43 : Détecteur réfractométrique

Exercices

1. La Chromatographie Liquide Haute Performance

Exercice 1.1:

Les appareils actuels de CLHP peuvent utiliser des colonnes de 300 μm de diamètre interne pour lesquelles le débit optimum conseillé est de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$.

- 1) Montrer par un calcul simple que ce débit conduit pratiquement à la même vitesse linéaire de la phase mobile que pour une colonne de même type mais d'un diamètre de 4,6 mm pour laquelle le débit conseillé est de 1 mL/min.
- 2) La séparation d'un échantillon comportant 16 HPA (hydrocarbures polyaromatiques) a été effectuée sur une colonne de type C18 ($L= 25 \text{ cm}$, $d= 300 \mu\text{m}$). Le débit de la phase mobile (acétonitrile/eau) est de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. L'un de ces HPA a un temps de rétention de 48 min.
- 3) Calculer le volume de rétention de ce composé. Que peut-on en conclure?

Exercice 1.2:

Les temps de rétention de 2 herbicides A et B d'un mélange à séparer sont respectivement égaux à 10,60 et 11,53 min sur une colonne de 25,0 cm. Une espèce non retenue passe sur la colonne en 1,20 min. Les largeurs (à la base) des pics de A et B sont respectivement égales à 1,05 et 1,15 min.

Calculer

- 1) La résolution de la colonne
- 2) Le nombre moyen de plateaux théoriques dans la colonne
- 3) La hauteur équivalente à un plateau théorique
- 4) La longueur de la colonne nécessaire pour obtenir une résolution de 1,5
- 5) Le temps requis pour éluer la substance B sur cette colonne.

2. La chromatographie de partage

Exercice 2.1 :

- 1) Lorsqu'en chromatographie liquide, l'eau entre dans la composition de l'éluant, travaille-

t-on en phase inverse ou en phase normale ? Justifier votre réponse.

- 2) Pour une séparation en chromatographie en phase inverse, donnez l'ordre d'élution des substances chimiques suivantes : pentane, pent-1-ène, penta-1-ol et penta-1,2- diol.

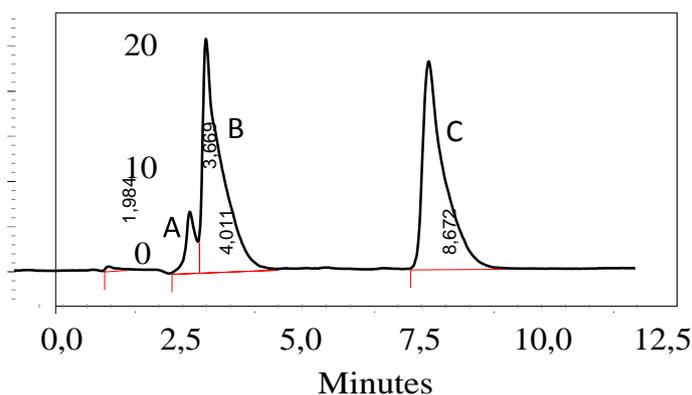
Exercice 2.2 :

On se propose de doser l'aspartame, la caféine, la saccharine et l'acide benzoïque dans diverses boissons par CLHP. Proposer un type de phase stationnaire pour ce dosage.

Exercice 2.3 :

La séparation suivante a été obtenue par CLHP Shimadzu LC 8A. Les conditions opératoires sont les suivantes:

| | |
|---|---|
| phase stationnaire greffée C ₁₈ Supercosil™ LC-18 | taille de particule: 5µm |
| longueur de colonne: 25 cm | température: 20°C |
| débit: 1mL/min | teneur en eau: 50% teneur en méthanol: 50% |
| pression en tête de colonne: 50.105 Pa | |

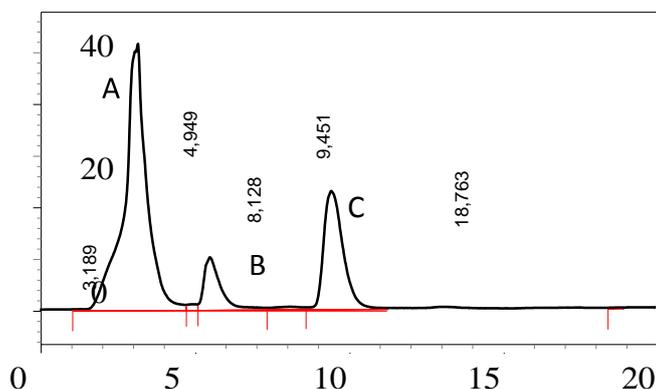


| Produit | Largeur à mi-hauteur $\omega_{1/2}$ (min) |
|---------|---|
| A | 0,04 |
| B | 0,52 |
| C | 0,61 |

- 1) Quel est le type de polarité de phase la utilisée ? Justifiez votre réponse.
- 2) A partir du chromatogramme déterminer :
 - a. L'efficacité pour les composés A, B et C
 - b. L'efficacité moyenne de la colonne
 - c. Le volume mort V_m de la colonne
 - d. Les facteurs de rétention k'_A , k'_B et k'_C des composés A, B et C.
 - e. La sélectivité α de la séparation.
 - f. La résolution R de la séparation.
 - g. La résolution de Purnel (RP) de la séparation.
 - h. Si la colonne mesure 30 cm, calculez le temps de rétention du dernier composé, toutes choses égales par ailleurs.

Exercice 2.4 :

A quels pics correspondent les composés suivants : benzène, éther diéthylique et *n*-hexane. Les conditions expérimentales sont: la colonne à 4 mm de diamètre, 150 mm de long. Le débit est de 1mL/min. La phase stationnaire C18 est constituée de greffons de chaînes aliphatiques à 18 carbones. L'élution est faite par un mélange isocratique de méthanol (60%) et d'eau (40%).



3. La chromatographie d'échange d'ions

Exercice 3.1

Un mélange de trois acides-aminés : l'arginine, la cystéine et l'acide aspartique, est soumis à une chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$). Les pH isoélectriques de l'arginine, la cystéine et l'acide aspartique sont respectivement : 3,00 ; 5,0 ; 10,8 à 25°C. On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à pH

2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7 et à 11.

Quel est l'ordre d'élution des acides aminés? (On considérera que les interactions acide aminé-résine sont uniquement d'ordre électrostatique).

Exercice 3.2 :

Un mélange de trois acides aminés : acide aspartique ($pH_i = 2,87$), Arginine ($pH_i = 10,76$) et Leucine ($pH_i = 6$), est soumis à une chromatographie sur colonne échangeuse de cations. L'élution est effectuée à l'aide d'un tampon à $pH = 6$.

Dans quel ordre peut-on prévoir la sortie de ces acides aminés ?

Un mélange de trois acides aminés : acide aspartique ($pH_i = 2,87$), Arginine ($pH_i = 10,76$) et Leucine ($pH_i = 6$), est soumis à une chromatographie sur colonne échangeuse de cations. L'élution est effectuée à l'aide d'un tampon à $pH = 6$.

Dans quel ordre peut-on prévoir la sortie de ces acides aminés ?

4. La chromatographie d'exclusion

Exercice 4.1 :

On veut séparer par chromatographie de perméation de gel, un mélange de 4 étalons de polystyrène dont les masses moléculaires sont de 9 200, 76 000, $1,1 \times 10^6$ et 3×10^6 daltons. On dispose de 3 colonnes dont les domaines de perméation sont les suivants :

A : 70 000 à 4×10^5 Da; B : 10^5 à $1,2 \times 10^6$ Da; C : 10^6 à 4×10^6 Da

Comment peut-on séparer ces 4 polymères en une seule opération, sachant qu'on peut mettre bout à bout deux colonnes?

Exercice 4.2 :

L'analyse d'un mélange contenant des protéines en chromatographie d'exclusion stérique adonné les résultats suivants avec un débit de $0,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

| MM (Da) | Volume de rétention (cm^3) |
|------------------|--|
| $2,4 \cdot 10^5$ | 2,6 |
| $1,5010^5$ | 3,7 |
| 73000 | 3 |
| 18000 | 3,4 |
| 12500 | 3,6 |
| 3000 | 4 |
| 600 | 4,1 |

Quelle est la masse moyenne en poids d'une molécule dont le temps de perméation est de 6,4 min?

Exercice 4.3 :

Une colonne de filtration sur gel a un rayon r de 0,80 cm et une longueur l de 20 cm.

- Calculer le volume de la colonne.
- Le volume de la phase mobile en dehors des particules du gel est de 18,1 ml et le volume total de la phase mobile est de 35,8 ml. Déterminer le coefficient K pour un soluté élué à 27,4 mL.

Corrections**Exercice 1.1:**

1. $u_1/u_2 = 1,06$ (même vitesse)
2. $V_r = 0,192$ mL une économie de solvant

Exercice 1.2:

1. $R = 0,84$
2. $N_{\text{moy}} = 1609$
3. $H = 0,15$ mm
4. $L_2 = 80$ cm
5. $tr_B = 20,99$ min

Exercice 2.1 :

1. Phase inverse (eau solvant polaire, phase mobile polaire donc la phase stationnaire doit être apolaire)
2. L'ordre d'élution : penta-1,2-diol, penta-1-ol, pent-1-ène et le pentane.

Exercice 2.2 :

Une phase stationnaire C18

Exercice 2.3 :

- 1) La phase stationnaire apolaire (groupement C_{18}) La phase mobile polaire
- 2) a) $N_A = 46611$; $N_B = 330$; $N_C = 1120$
b) $N_{\text{moy}} = 16022$
c) $V_m = 1,984$ mL
d) $k'_A = 0,849$; $k'_B = 1,021$ et $k'_C = 3,370$
e) $\mu_{A-B} = 1,2$; $\mu_{B-C} = 3,3$
f) $R_{A-B} = 0,71$; $R_{B-C} = 4,8$
g) $PR_{A-B} = 0,38$; $PR_{B-C} = 4,5$

h) $t_{rC} = 9,5$ min

Exercice 2.4:

A : éther diéthylique

B : benzène

C : *n*-hexane.

Exercice 3.1

A pH=2, les acides aminés sont chargés positivement, retenus sur la résine.

A pH=7, l'arginine et la cystéine chargés négativement seront élués. L'acide aspartique retenu

A pH=9, l'acide aspartique sera élué en dernier.

Exercice 3.2

L'acide aspartique est élué le premier. Leucine est ensuite éluee.

L'Arginine 6 reste dans la colonne.

Exercice 4.1 :

En mettant bout à bout les colonnes C et A les quatre étalons de polystyrène seront séparés : on obtiendra donc 4 pics distincts.

Exercice 4.2 :

MM= 5000 Da

Exercice 4.3 :

a) $V_t=40,2$ mL

b) $K=0,52$

Chapitre V : La chromatographie en phase gazeuse - CPG

1. Introduction

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dans le domaine industrielle ou la recherche scientifique, son développement est dû, principalement, à plusieurs avantages:

- À son extrême sensibilité
- À sa polyvalence
- À la rapidité de mise au point des analyses nouvelles
- Aux possibilités d'automatisation

Cependant, l'utilisation de la CPG se fait sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. Ce qui présente l'inconvénient majeur de cette technique puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et suffisamment volatils. On distingue deux types de CPG selon la phase stationnaire :

- **La chromatographie gaz-liquide:** la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.
- **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.

2. 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. Lorsqu'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 (Fig 44) présente schématiquement les principaux éléments.

3. Description de l'appareil CPG

Un appareil de CPG réunit les compartiments suivants: **injecteur**, **colonne**, **détecteur** et un **four** thermostaté qui permet de porter la colonne à une température bien déterminé.

La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé **gaz vecteur**. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande reproductibilité des temps de rétention.



Figure 44 : Photo d'un appareil de chromatographie gaz

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur. Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre.

4. Gaz vecteur

- On utilise comme phase mobile l'un des trois gaz suivants: l'**hélium**, le **diazote** ou le **dihydrogène**. Ils proviennent soit d'un cylindre sous pression soit d'un générateur (électrolyse de l'eau pour H_2 et séparation de l'air pour N_2),
- Ce gaz vecteur doit être exempt de traces d'hydrocarbures, de vapeur d'eau et de dioxygène qui se comportent comme des impuretés nuisibles pour certaines phases stationnaires polaires et qui réduisent la sensibilité des détecteurs.

5. Introduction de l'échantillon

- Une très petite quantité d'échantillon en solution (**0,5 ml**), est introduite dans l'appareil avec une micro seringue dont il existe de nombreux modèles adaptés aux divers injecteurs et colonnes.

- Pour mieux maîtriser la reproductibilité des résultats on adapte un *injecteur automatique* grâce au quelles mouvements de la seringue sont automatisés. Associé à porte-échantillons, il devient possible de programmer la séquence cyclique de prélèvement de l'échantillon, de son introduction très rapide dans l'injecteur et du rinçage de la seringue.



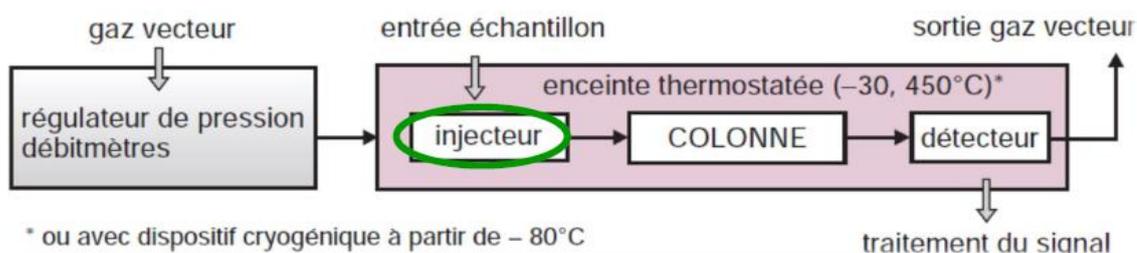
Figure 45 : Photo d'un injecteur automatique

6. Injecteurs et types des injecteurs

L'injecteur est la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe. Il a deux autres fonctions: *vaporiser* et *entraîner en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur*. Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes aux quels ils sont réunis.

On distingue trois types d'injecteurs:

- 1- *Injecteur à vaporisation directe.*
- 2- *Injecteur avec ou sans division.*
- 3- *Injecteur à température programmable.*



1- Injecteur à vaporisation directe

Il consiste en un tube métallique doublé d'un chemisage de verre (appelé *insert*), balayé par le gaz vecteur et chauffé à la température moyenne d'ébullition des composés à chromatographier.

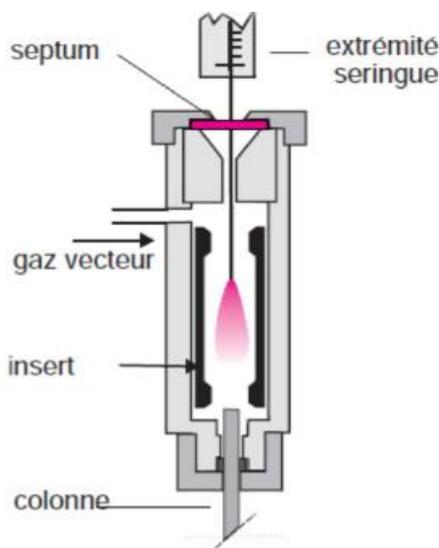


Figure 46 : Injecteur à vaporisation directe

L'aiguille de la micro seringue contenant l'échantillon traverse l'une des extrémités de l'injecteur obturée par une pastille d'élastomère siliconé (le *septum*). L'autre extrémité est raccordée à la colonne également chauffée. La totalité de l'échantillon introduit, immédiatement vaporisé, part dans la colonne en quelques secondes.

Cette méthode convient pour les colonnes remplies et les grosses colonnes capillaires, quand le débit de gaz vecteur atteint au moins 8 ml/min.

2- Injecteur avec ou sans division.

Pour les *colonnes capillaires*, à faible capacité d'échantillon, les plus petits volumes qu'il est possible de prélever avec une micro seringue (0,1 ml) peuvent saturer la colonne. On utilise alors des injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, *avec* ou *sans division* (encore appelés *split* ou *splitless*).

Un courant de gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation où il se mélange à l'échantillon injecté. Une vanne de fuite, couramment réglée entre 50 et 100 ml/min, divise ce débit en deux fractions dont la plus importante est éliminée du corps de l'injecteur.

Ce type d'injecteur peut également fonctionner en mode *splitless*. Dans ce mode d'introduction réservé aux échantillons en solution très diluée, on injecte lentement le contenu de la micro seringue en laissant la vanne 2 en position fermée durant 0,5 à 1 minute afin que les composés vaporisés avec le solvant se concentrent dans les tous premiers décimètres de la colonne. L'ouverture de la vanne 2 élimine de l'injecteur l'excès d'échantillon.

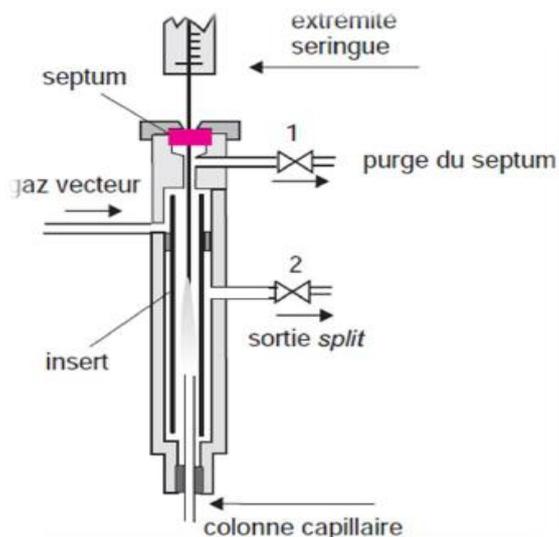


Figure 47 : Injecteur avec ou sans division

3- Injecteur à température programmable.

Cet injecteur encore appelé PTV, (*Programmed Temperature Vaporizer*), est de conception analogue à celle de l'injecteur split/splitless. Cependant la température de la chambre d'injection peut être programmée, de 20 à plus de 300°C

Ses trois principaux modes de fonctionnement sont l'injection à froid en mode split, l'injection à froid en mode splitless et l'injection avec élimination du solvant.

Dans *l'injection avec division, à froid*, l'échantillon est introduit dans la chambre de vaporisation froide. Comme l'échantillon n'est pas instantanément vaporisé, le solvant et les différents composés pénètrent dans la colonne dans l'ordre de leur point d'ébullition.

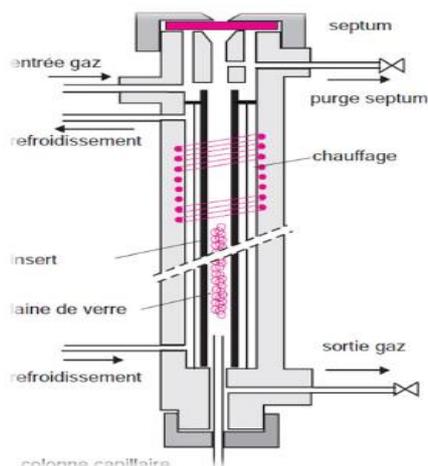


Figure 48 : Injecteur à température programmable

L'*injection sans division, à froid*, est utilisée pour l'analyse de traces.

Dans le mode *injection avec élimination de solvant*, l'échantillon est introduit dans l'injecteur froid. Après injection, la vanne de fuites est ouverte pour éliminer tout le solvant. Puis l'injecteur est ensuite chauffé pour permettre le transfert des composés lourds dans la colonne.

7. Enceinte thermostatée

Le chromatographe comporte une enceinte qui permet de chauffer la colonne jusqu'à plus de 400°C. Elle doit avoir une faible inertie thermique pour permettre une montée contrôlée et rapide en température (rampe pouvant aller jusqu'à 100°C/min) et une excellente stabilisation. En adjoignant une vanne cryogénique alimentée par N₂ ou CO₂ liquides, l'enceinte peut être régulée à basse température.

8. Colonnes et types des colonnes

Il existe deux types de colonnes, **les colonnes remplies** (ou colonnes à garnissage) et **les colonnes capillaires**. Pour les colonnes remplies, la phase stationnaire est immobilisée par imprégnation ou par réaction chimique avec le support poreux. Pour les colonnes capillaires, une faible épaisseur de phase stationnaire est soit déposée, soit greffée sur la surface interne de la colonne.



Figure 49 : Photo de colonnes remplies

1- Colonnes remplies:

Ces colonnes, d'un diamètre de 3, 18 ou 6, 35 mm et de 1 à 3 m de long, sont fabriquées à partir d'un tube d'acier ou de verre dont la paroi interne est traitée pour éviter d'éventuels effets catalytiques sur l'échantillon. Elles supportent un débit de gaz vecteur allant de 10 à 40 ml/min. Elles contiennent un support poreux et inerte. Ce type de colonne n'est pas adaptées aux analyses de traces.

2- Colonnes capillaires:

Elles sont généralement en *silice fondue* de grande pureté, le diamètre interne de ces colonnes varie de 100 à 530 μm . Avec une longueur peut aller jusqu'à 100 m pour. Elles comportent un revêtement extérieur brun de polyimide, polymère thermiquement stable ($T_{\text{max}}=370^{\circ}\text{C}$), pour les rendre moins fragiles et pouvoir les enrouler sur elles mêmes grâce à un support métallique adapté.

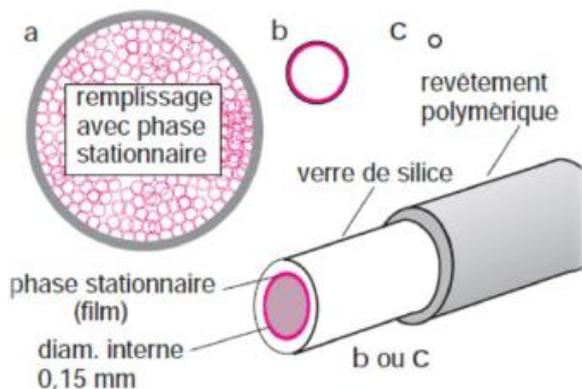


Figure 50 : Colonnes capillaires

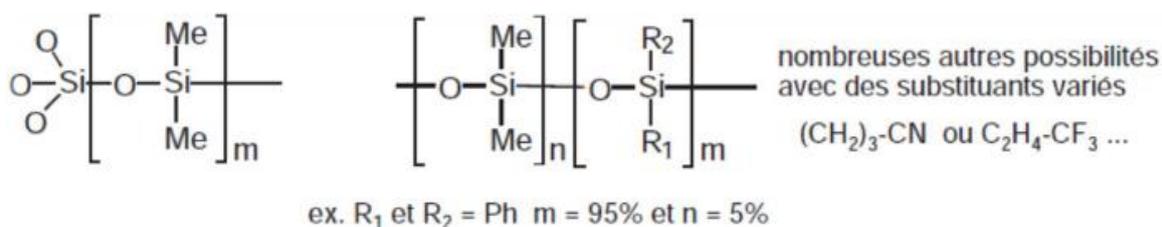
9. Phases stationnaires

On distingue quatre types de phase stationnaires:

1- Phase stationnaire de type polysiloxanes:

Les polysiloxanes (également connus sous le nom de gomme silicone) correspondent à la répétition d'un motif de base comportant deux chaînes carbonées par atome de silicium.

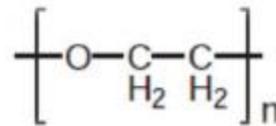
Les grandes firmes mondiales en commercialisent une vingtaine de diverses compositions avec des chaînes alkyle ou aryle pouvant comporter en plus des fonctions (ex. cyanopropyle, trifluoropropyle). Les monomères, combinés en diverses proportions, permettent de moduler les propriétés des phases stationnaires tel que la polarité et le domaine de stabilité. **Grâce à leur gamme de température très étendue, ce sont, pour les colonnes capillaires, les phases les plus utilisées.**



3- Phase stationnaire de type Polyéthylène glycols (PEG):

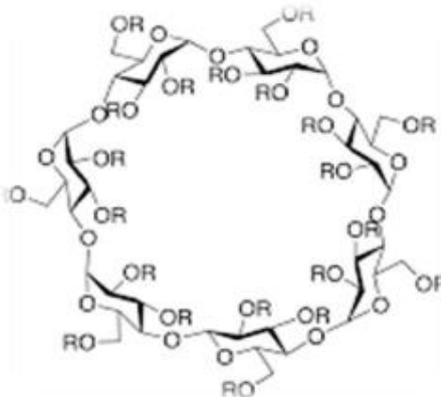
Les représentants les plus connus de ces familles sont les **Carbowax**, polymères polaires (1500 < M < 20000) qui peuvent être utilisés en mode déposé, imprégné ou greffé.

Ce sont généralement des phases polysiloxanes contenant entre 10 et 20% en masse de molécules de **β-cyclodextrine** (polysaccharide chiral) incluses dans le polymère de base.



4- Phase stationnaire chirale:

On utilise ce type de colonne lorsqu'on s'intéresse à **la pureté optique des analytes**. Si un composé organique, par exemple, comporte un **carbone asymétrique**, les énantiomères **R** et **S** n'auront pas tout à fait la même affinité pour la phase stationnaire chargée en cyclodextrine ce qui se traduira par des temps de rétention différents.



Donc un composé chimiquement pur à l'état de racémate donnera naissance à deux pics égaux, chacun correspondant à un seul énantiomère.

5- Phase stationnaire solide:

Ces phases sont constituées par des matériaux adsorbants divers: **silice ou alumine désactivées par des sels minéraux, tamis moléculaires 5 Å, verres ou polymères poreux, carbone graphité**. On les utilise pour séparer les composés gazeux ou très volatils. Les colonnes à phase graphite, par exemple, ont été développées pour la séparation de N₂, CO, CO₂ et des hydrocarbures très légers.

10. Principaux détecteurs

Certains détecteurs sont universels, c'est-à-dire qu'ils sont sensibles à pratiquement tous les composés élués, d'autres sont beaucoup plus sensibles à un type particulier de molécules.

Tous les détecteurs donnent une réponse qui dépend de la concentration molaire ou massique du soluté dans le gaz vecteur. On distingue cinq types de détecteurs:

- 1- Détecteur à conductibilité thermique (TCD).
- 2- Détecteur à ionisation de flamme (FID).
- 3- Détecteur thermoionique (NPD).
- 4- Détecteur à capture d'électrons (ECD)
- 5- Détecteur à photo-ionisation (PID)

1- Détecteur à conductibilité thermique (TCD):

Ce détecteur, mis au point dès les débuts de la chromatographie en phase gazeuse, 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 par le biais de deux thermistances placées en parallèle.

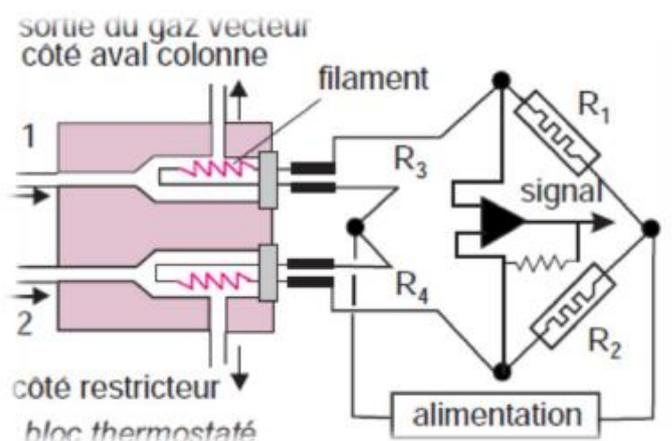


Figure 51 : Détecteur

Le détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) présente l'avantage de ne pas détruire les substances analysées. Mais son principal inconvénient provient de sa faible sensibilité.

2- Détecteur à ionisation de flamme (FID):

Considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques. Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans la flamme d'un petit brûleur alimentée par un mélange d'**hydrogène** et d'**air**. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées, responsables du passage d'un courant ionique extrêmement faible ($10^{-12}A$) entre deux électrodes. L'extrémité du brûleur sert d'électrode de polarisation. La seconde électrode, de forme annulaire, entoure la flamme.

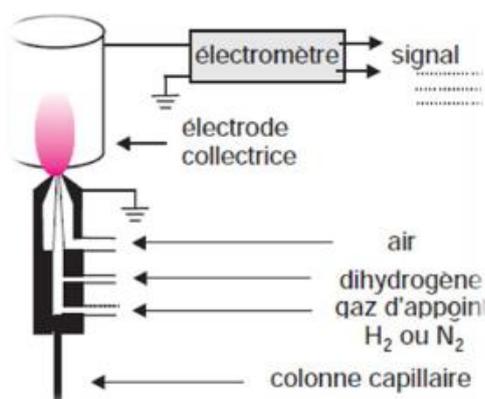


Figure 52 : Détecteur à ionisation de flamme

Le signal est amplifié par un électromètre en une tension mesurable. Pour les composés organiques, l'intensité du signal est sensible au *débit massique* de l'échantillon.

3- Détecteur thermo-ionique (NPD):

Ce détecteur est très sensible aux composés azotés (N) ou phosphorés (P). Il comporte un petit cylindre en céramique dopée avec un sel alcalin (ex. Sulfate de rubidium) auquel on applique une tension électrique pour entretenir un petit plasma (800°C) alimenté par combustion d'un mélange air/hydrogène. À la différence du FID la flamme est plus petite.

Les composés contenant N ou P donnent des fragments de décomposition transformés en ions négatifs. Ces ions sont recueillis sur une électrode collectrice.

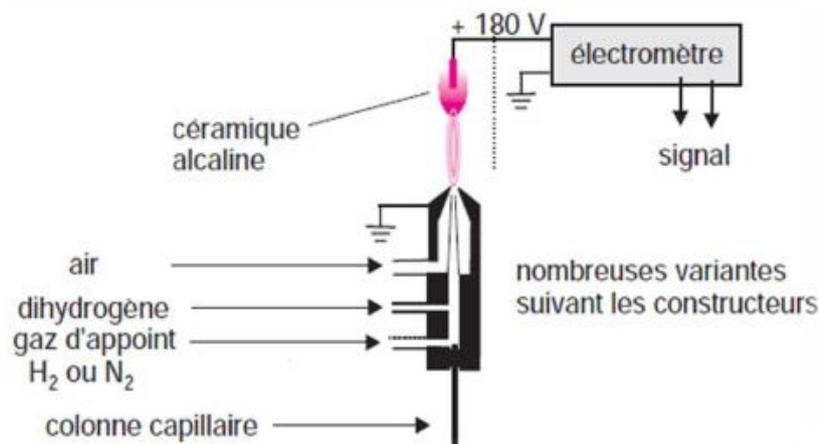


Figure 53 : Détecteur thermo-ionique

4- Détecteur à capture d'électrons (ECD):

Ce détecteur considéré comme sélectif car il est beaucoup plus sensible aux dérivés **halocarbonés**. Un courant d'azote, ionisé par un flux d'électrons généré au moyen d'une source radioactive de faible énergie circule entre deux électrodes. Si des molécules de soluté, contenant un halogène (F, Cl ou Br), traversent la zone entre les deux électrodes, elles captent une partie des électrons pour former des ions négatifs lourds, donc moins mobiles.

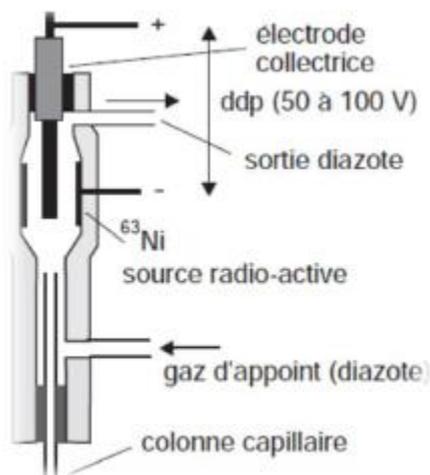


Figure 54 : Détecteur à capture d'électrons

L'intensité recueillie suit une loi exponentielle décroissante du type $I = I_0 \exp[-kc]$. La présence d'une source radioactive dans ce détecteur le soumet à une réglementation particulière. Il est souvent utilisé dans l'analyse des pesticides chlorés.

5- Détecteur à photo-ionisation (PID):

Ce détecteur assez sélectif, convient aux **hydrocarbures ainsi qu'aux dérivés contenant S ou P**. Le principe consiste à irradier le composé élué avec une lampe UV émettant des photons très énergétiques (de 8,4 à 11,8 eV). La photo-ionisation se produit quand l'énergie du photon est supérieure à l'énergie de 1^{re} ionisation du composé.

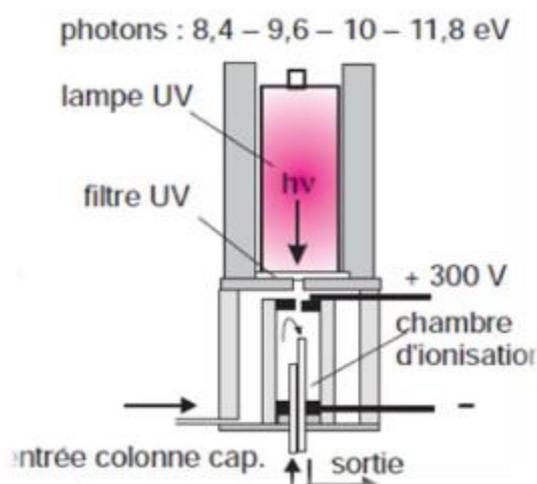


Figure 55 : Détecteur à photo-ionisation

La collecte des électrons libérés par une électrode reliée à la borne d'un électromètre permet des mesures de concentrations. Il s'agit d'un détecteur qui peut fonctionner à plus de 400°C et qui n'est pas destructif, l'ionisation étant réversible et ne touchant qu'une faible fraction des molécules de chaque composé.

11. Analyse qualitative/Analyse quantitative

11.1. Analyse qualitative:

Le nombre de pics obtenus sur un chromatogramme correspond au nombre de composants présents dans l'échantillon.

Chaque molécule présente dans cet échantillon est caractérisée par un temps de rétention, ce dernier est reproductible à 1% si l'ensemble des facteurs dont il dépend est choisi avec soin.

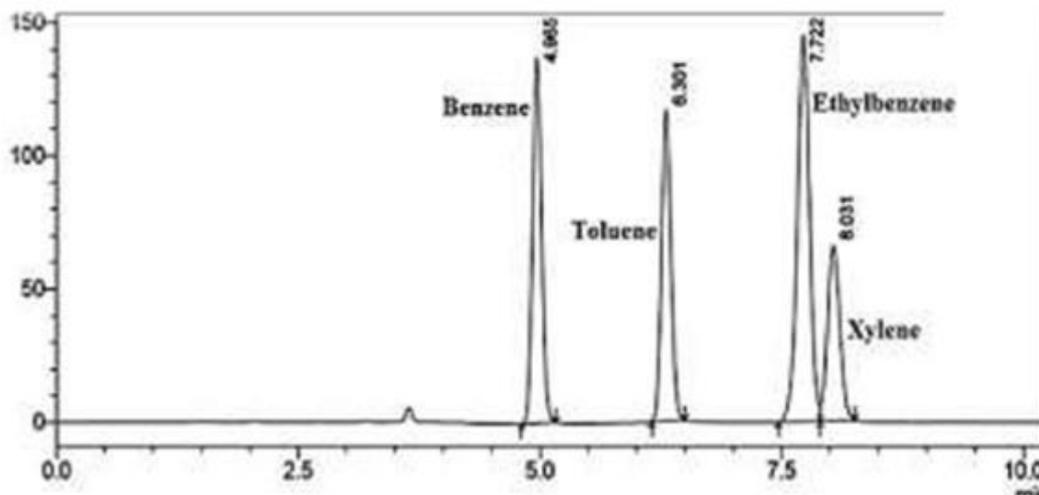


Figure 56 : Chromatogramme d'un échantillon

Le temps de rétention dépend des facteurs suivants:

1. Débit du gaz vecteur.
2. Dimension et température de la colonne.
3. Nature de la phase stationnaire.

11.2. Analyse quantitative:

La théorie montre que la surface des pics est proportionnelle à la quantité de produit injecté, autrement dit, chaque constituant du mélange fait apparaître un signal (pic) dont la surface est d'autant plus grande que la concentration de ce constituant dans le mélange est plus grande.

La présence d'un seul pic sur le chromatogramme prouve que le produit est pur, ou que les différents constituants du mélange ne sont pas séparés sur la phase stationnaire utilisée.

Les phases stationnaires se différencient par leur polarité. Tandis que sur **les phases apolaires, les constituants du mélange sortiront dans l'ordre de leurs températures d'ébullition croissantes respectives.**

12. Applications

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.

Exercices**Exercice 1 :**

Deux espèces chimiques, A et B sont séparées par chromatographie gazeuse isotherme, à l'aide d'une colonne de 2,00 m ayant 5000 plateaux théoriques au débit de 15,0 ml/min. Le pic de l'air non absorbé apparaît au bout de 30 s ; le pic de A apparaît au bout de 5 min et celui de B au bout de 12 min. Calculer le volume mort V_M de la colonne, et les volumes de rétention V_A et V_B ?

- Calculer les volumes réduits V'_A et V'_B ?
- Calculer les coefficients de rétention k'_A et k'_B ?
- Quelles sont les largeurs à la base des pics A et B ?
- Quelle est la valeur de H pour cette colonne ?
- Déterminer la valeur de la sélectivité α de cette séparation ?
- Calculer la résolution R de la séparation ?
- Commenter brièvement les valeurs de k' et de R ?

Exercice 2 :

Un mélange de six iodures d'alkyle est séparé par chromatographie gazeuse à l'aide d'une colonne remplie de poudre de brique réfractaire enrobée d'huile de silicone (longueur $L = 365$ cm). La colonne est chauffée de telle sorte que sa température croisse linéairement durant toute l'opération. Le tableau donne les résultats relevés.

| Pic | Identité | t_R (min) | ω (min) | Température (°C) | Surface (cm ²) |
|-----|---|-------------|----------------|------------------|----------------------------|
| 1 | Air | $t_M = 0,5$ | Petite | 55 | Petite |
| 2 | CH ₃ I | 6,60 | 0,55 | 100 | 13,0 |
| 3 | C ₂ H ₅ I | 9,82 | 1,00 | 127 | 12,0 |
| 4 | Iso-C ₃ H ₇ I | 11,90 | 1,04 | 139 | 10,0 |
| 5 | <i>n</i> -C ₃ H ₇ I | 13,04 | 1,08 | 148 | 7,2 |
| 6 | CH ₂ I ₂ | 19,10 | 1,60 | 193 | 2,0 |

- Calculer la résolution entre les pics 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 ?
- la séparation vous convient-elle ?

(c) Quelle longueur de colonne aurait il fallu pour que la résolution des pics 4 et 5 ait été de $R' = 1,5$?

Exercice 3 :

Le chromatogramme suivant a été obtenu pour un mélange de chaînes droites d'hydrocarbures : C_nH_{2n+2} . Le pic M est dû à un corps non absorbé ; le pic A est celui de C_3H_8 ; le pic F est celui de $C_{20}H_{42}$. La colonne mesure 120 cm de longueur et est utilisée à température constante avec un débit de gaz de $50,0 \text{ cm}^3/\text{min}$. On trouve les données concernant les temps de rétention et la largeur des pics dans le tableau 12-2.

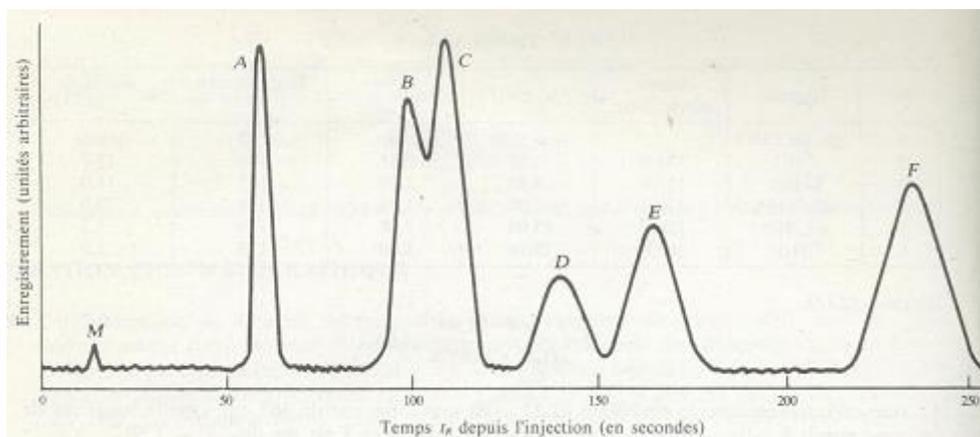


Fig. 12-2

Tableau 12-2

| Pic | M | A | B | C | D | E | F |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t_R, s | 15 | 60 | 100 | 110 | 140 | 165 | 235 |
| $\omega (s)$ | petit | 9,00 | 15,00 | 16,50 | 21,00 | 24,75 | 35,25 |
| Aire, cm^2 | petit | 0,900 | 1,200 | 1,650 | 0,610 | 1,040 | 1,900 |

- Trouver le nombre de plateaux théoriques N_A en se basant sur le pic A ?
- Calculer la résolution entre les pics B-C, D-E ?
- Quelle longueur de colonne aurait il fallu pour que la résolution des pics B et C ait été de $R' = 1,5$?
- En déduire la nouvelle résolution des pics D et E ?
- Déterminer le t_R de F sur une colonne de longueur déterminée au (d) et conclure ?

Exercice 4 :

Un mélange d'alkyles de bromes est séparé par CPG. Les paramètres de la colonne sont : $L = 150$ cm, $T = 140^\circ\text{C}$, gaz vecteur He, débit = $20\text{ cm}^3/\text{min}$, détection FID. Le chromatogramme a été obtenu avec un mélange de composition inconnue, néanmoins, on sait que le pic F est dû à du $n\text{-C}_5\text{H}_{11}\text{Br}$. Le tableau résume les données pour les différents pics.

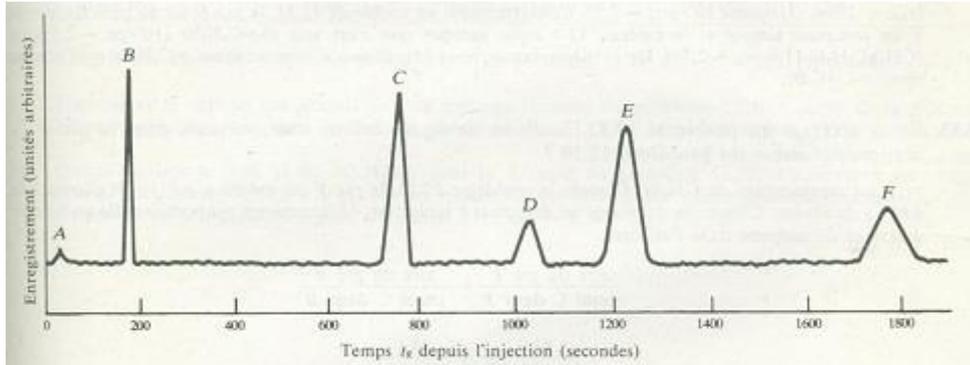


Fig. 12-3

Tableau 12-3

| Pic | A | B | C | D | E | F |
|---------------------|------------|------|-------|------|------|-------|
| t_R, s | $t_M = 25$ | 177 | 750 | 1029 | 1222 | 1775 |
| $\omega (\text{s})$ | 1,7 | 11,8 | 54,5 | 68,6 | 81,5 | 118,3 |
| Aire, cm^2 | 0,01 | 18,1 | 101,1 | 26,5 | 98,9 | 61,0 |

- (a) Quelle peut être la longueur de la colonne minimale pour que les pics D et E puissent être résolus avec moins de 1% de recouvrement ?
- (b) Déterminer le nombre de plateaux théoriques N , pour les pics B, C, D, E et F ?
- (c) Commenter la valeur de N_C ?

Corrections**Exercice 1 :**

(a) Formule $V_i = t_i \cdot D$

$$V_M = 0,5 \cdot 15 = 7,5 \text{ ml}, V_A = 5 \cdot 15 = 75 \text{ ml}, V_B = 12 \cdot 15 = 180 \text{ ml}$$

(b) Formule $V'_i = t'_i \cdot D$ soit $V'_i = V_i - V_M$

$$t'_A = 5 - 0,5 = 4,5 \text{ min}, t'_B = 12 - 0,5 = 11,5 \text{ min}$$

$$V'_A = 4,5 \cdot 15 = 67,5 \text{ ml et } V'_B = 11,5 \cdot 15 = 172,5 \text{ ml}$$

Ou $V'_A = 75 - 7,5 = 67,5 \text{ ml et } V'_B = 180 - 7,5 = 172,5 \text{ ml}$

(c) Formule $t_R = t_M(k'+1)$ ou $k' = t'_R/t_M$

$$k'_A = 4,5/0,5 = 9 \text{ et } k'_B = 23$$

(d) Formule $N = 16 (t_R/\omega)^2$ donc $\omega = 4 \cdot t_R/\sqrt{N}$

$$\omega_A = 4 \cdot 300/\sqrt{5000} = 17,0 \text{ sec et } \omega_B = 4 \cdot 720/\sqrt{5000} = 40,8 \text{ sec}$$

(e) Formule $H = L/N$

$$H = 200/5000 = 0,04 \text{ cm/plateau}$$

(f) Formule $\alpha = t'_B/t'_A = k'_B/k'_A$

$$\alpha = 11,5/4,5 = 23/9 = 2,56$$

(g) Formule $R = 2 (t_B - t_A)/(\omega_B + \omega_A)$

$$R = 2 (720 - 300)/(40,8 + 17,0) = 14,5$$

(h) Pour k' les valeurs sont élevées. Composés retenus donc temps de rétention long et surement élargissement des pics.

Valeur de R très importante. La résolution de la séparation est très bonne, mais le compromis entre le temps de rétention et la résolution n'est surement pas optimisé. Il est préférable de baisser le temps d'analyse et de perdre un peu en résolution.

Exercice 2 :

(a) Formule $R = 2 (t_B - t_A) / (\omega_B + \omega_A)$

$$R_{2-3} = 2 (9,82 - 6,6) / (0,55 + 1) = 4,15$$

$$R_{3-4} = 2 (11,9 - 9,82) / (1 + 1,04) = 2,04$$

$$R_{4-5} = 2 (13,04 - 11,9) / (1,04 + 1,08) = 1,08$$

$$R_{5-6} = 2 (19,1 - 13,04) / (1,6 + 1,08) = 4,52$$

(b) Les pics 4 et 5 sont mal résolus.

(c) Comme R est proportionnel à \sqrt{L} , alors, $R'/R = \sqrt{(L'/L)}$

$$\text{Ainsi, } (1,5/1,08) = \sqrt{(L'/365)} \quad L' = 365 \cdot (1,5/1,08)^2 = 704 \text{ cm}$$

Exercice 3 :

(a) Formule $N = 16 (t_R/\omega)^2$

$$N_A = 16 (60/9)^2 = 711 \text{ plateaux}$$

(b) Formule $R = 2 (t_B - t_A) / (\omega_B + \omega_A)$

$$R_{B-C} = 2 (110 - 100) / (15 + 16,5) = 0,63 \text{ mal résolus.}$$

$$R_{D-E} = 2 (165 - 140) / (21 + 24,75) = 1,09 \text{ mal résolus.}$$

(c) Comme R est proportionnel à \sqrt{L} , alors, $R'/R = \sqrt{(L'/L)}$

$$\text{Ainsi, } (1,5/0,63) = \sqrt{(L'/120)} \quad L' = 120 \cdot (1,5/0,63)^2 = 680 \text{ cm}$$

(d) On peut déduire R_{D-E} avec une colonne de 680 cm

$$\text{Ainsi, } (R'/1,09) = \sqrt{(680/120)} \quad R' = 2,6$$

(f) On a $t_R = 235 \text{ sec} = 3,9 \text{ min}$ sur une colonne de 120 cm

$$\text{Ainsi, sur une colonne de 680 cm, } t_R = 235 \cdot (680/120) = 1331,7 \text{ sec } t_R = 22,2 \text{ min}$$

Trop long donc peut être changée la nature de la colonne.

Exercice 4 :

(a) Formule $R = 2 (t_B - t_A) / (\omega_B + \omega_A)$

$$R_{D-E} = 2 (1222 - 1029) / (68,6 + 81,5) = 2,57$$

Or R est proportionnel à \sqrt{L} et une séparation avec un recouvrement de 1 % correspond à une $R = 1,5$

Alors, $(1,5/2,57) = \sqrt{(L/150)}$ $L = 51$ cm

(b) Formule $N = 16 (t_R/\omega)^2$

$$N_B = 16(177/11,8)^2 = 3600 \text{ plateaux et } N_C = 3030 ; N_D = 3600 ; N_E = 3600 ; N_F = 3600$$

(c) Le pic C a la plus petite valeur de N. Il est probable qu'il corresponde à un mélange non séparé de deux alkyles de brome ou plus (un pic non résolu doit avoir une valeur plus grande de ω et un N plus faible).

Chapitre VI : La chromatographie par fluide supercritique

1. Introduction

La chromatographie par fluide supercritique (CFS) est utilisée pour la séparation des composés thermolabiles et/ou de masses moléculaires élevées. Le matériel de conception hybride entre CPG et CLHP. On peut utiliser soit les colonnes capillaires de la CPG soit les colonnes classiques de CLHP. La CFS met en œuvre un fluide porté au-delà du point critique.

Les propriétés de ces phases mobiles supercritiques permettent à cette technique d'atteindre entre autres de grandes efficacités par unité de temps, des sélectivités importantes et un couplage possible avec les détecteurs de la CPG. La CFS peut être qualifiée de technique verte par son utilisation majoritaire du dioxyde de carbone.

2. Propriétés des fluides supercritiques

Un fluide supercritique se forme lorsqu'une substance est chauffée au-dessus de sa température critique. L'utilisation de fluides supercritiques comme phases mobiles en chromatographie présente certains avantages liés à leurs propriétés physiques intermédiaires entre celles des liquides et des gaz. En raison de ses propriétés le fluide supercritique combine les avantages des gaz du point de vue de la cinétique du transfert de masse (faible viscosité, forte diffusivité, perte de charge limitée) et ceux des liquides en termes de solubilité.

3. Instrumentation

Les appareils de chromatographies par CFS ressemblent à ceux de la CLHP, pour assurer le débit du fluide supercritique on utilise une pompe à piston. Le liquide passe ensuite dans un serpentin chauffé pour élever sa température au-dessus du point critique afin de le transformer en fluide supercritique. On utilise une grande variété de colonnes HPLC ou CPG et des détecteurs UV ou par fluorescence. Contrairement à la CPL, la CFS autorise le couplage avec le détecteur à ionisation de flamme (DIF) de la CPG, lorsque l'on est confronté à la séparation d'un mélange complexe de solutés non volatils solubles dans le CO₂ supercritique et non aisément détectables (cas des hydrocarbures saturés des

échantillons pétroliers), on peut donc envisager de mettre en œuvre la CFS associée aux détecteurs de la CPG.

4. Phase mobile

L'originalité des fluides supercritiques réside, en la possibilité de changer leur masse volumique et de manière non linéaire avec la pression (l'augmentation de masse volumique modifie les facteurs de capacités et donc les temps d'élution).

- Faire un gradient de pression en HPLC comme faire un gradient de température en CPG
- Un double gradient de P et T en CFS permet d'agir sur la sélectivité

Le dioxyde de carbone à l'état supercritique est le composé le plus utilisé parce que son point critique a pour coordonnées $T_C = 31^\circ\text{C}$ et $P_C = 7\,400\text{ kPa}$ (Fig 57.). Si la pression et la température sont toutes deux supérieures, on passe dans le domaine de l'état supercritique, dans des conditions qui techniquement sont assez faciles d'accès. De plus ce composé est atoxique, inflammable, transparent dans l'ultraviolet, inodore et non corrosif. En effet, le CO_2 peut être facilement recyclé et purifié pour les applications à l'échelle préparatrice grosses consommatrices de solvants.

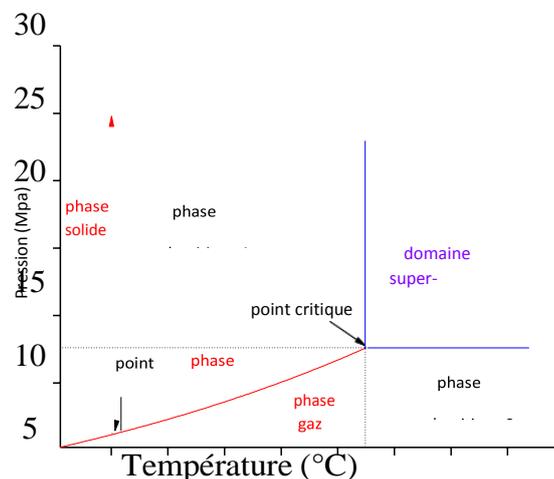


Figure 57 : Diagramme d'équilibre de phase pression/température du CO_2

- ✚ On utilise également : le monoxyde de diazote N_2O , $T_C = 36^\circ\text{C}$ et $P_C = 7\,100\text{ kPa}$
- ✚ l'ammoniac NH_3 , $T_C = 132^\circ\text{C}$, $P_C = 11\,500\text{ kPa}$.

Dans le cas des composés polaires difficiles à éluer par le CO_2 pur, un modificateur polaire est ajouté à la phase mobile en proportion modérée.

5. Phase stationnaire

On utilise en CFS les mêmes géométries de colonnes et la même variété de phases stationnaires qu'en CPL, y compris la grande majorité des phases stationnaires chirales (à l'exclusion des phases stationnaires fonctionnant uniquement avec un éluant aqueux, incompatibles avec la CFS) et, exceptionnellement, des colonnes capillaires de la CPG dont la phase stationnaire est greffée.

des sélectivités importantes sont observées en raison des interactions entre les solutés, la phase stationnaire et la phase mobile que l'on peut faire varier par l'ajout de faibles quantités de modificateurs polaires à la phase supercritique ; la CFS s'apparente donc à la chromatographie de partage sur phase normale, même si la plupart des phases stationnaires employées en CPL, y compris celles de la phase inverse et de la chiralité, peuvent être employées.

6. Comparaison de CFS avec HPLC et CPG

- + La CFS complète l'HPLC et la CPG
- + Le pouvoir d'éluion de la phase mobile est déterminé par la température et la pression
- + Vitesse de la phase mobile pratiquement plus grande.

7. Applications

Les procédés de chromatographie supercritique permettent de :

- + Réaliser des analyses chromatographiques équivalentes à la technologie en phase liquide (HPLC) sans utiliser de solvant.
- + Analyser de soluté de masse moléculaire + élevées \square 1000 avec une résolution meilleure HPLC.
- + Analyser des lipides, et les matières grasses
- + Séparer des molécules très proches chimiquement (type énantiomères, composés chiraux)
- + Purifier de larges quantités d'échantillons tout en réduisant les manipulations et consommations de solvants
- + Séparer les énantiomères dans le domaine pharmaceutique

Exercices

Exercice 1 :

Décrivez l'effet de la pression sur les chromatogrammes supercritiques.

Exercice 2 :

Quels sont les effets des modifications suivantes sur le temps d'élution en chromatographie en phase supercritique ?

- a) Augmentation du débit, à température et pression constantes.
- b) Augmentation de la pression, à température et débit constant
- c) Augmentation de la température, à pression et débit constants

Exercice 3 :

Quelles propriétés d'un fluide supercritique sont importantes en chromatographie ?

Corrections

Exercice 1 :

Augmentation de la pression induit la diminution de t_r des solutés

Exercice 2 :

- a) diminution du t_r
- b) diminution du t_r
- c) augmentation du t_r

Exercice 3 :

La masse volumique, la viscosité et la vitesse de diffusion des solutés dans le milieu.

Chapitre VII : L'électrophorèse capillaire

1. Définition

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative plus récente que la chromatographie. Elle se caractérise par un grand pouvoir de séparation, et par la possibilité de quantifier aussi bien les petites molécules que les biomolécules (protéines) difficilement séparées par la CLHP. Elle repose sur la migration dans un champ électrique et au contact d'un support approprié, des espèces présentes dans l'échantillon en solution, porteuses ou non d'une charge électrique globale. Le capillaire est en verre de silice de très faible diamètre (10 à 100 μm), ouvert à ses extrémités, sa paroi interne est chargée négativement, principalement par l'ionisation des groupes silanol. Ce capillaire, d'une longueur L variant entre 40 et 100 cm, est rempli d'un électrolyte tampon et soumis à un champ électrique continu. La différence de potentiel appliquée peut atteindre 600 V/cm, mais l'intensité ne doit pas dépasser une centaine de microampères, pour que la puissance dissipée reste inférieure à 3W. Afin de limiter l'échauffement du capillaire celui-ci doit néanmoins être placé dans une enceinte thermostatée. L'électrolyte est un mélange soigneusement filtré et dégazé. Un détecteur est placé à la distance de l'extrémité amont du capillaire près du compartiment cathodique. Le signal obtenu est à la base de l'obtention de l'électrophorégramme qui donne des renseignements sur la composition de l'échantillon, ne sont détectées que les espèces qui se dirigent vers la cathode (Fig 58.).

L'électrophorégramme : ressemble à un chromatogramme mais avec des pics plus étroits

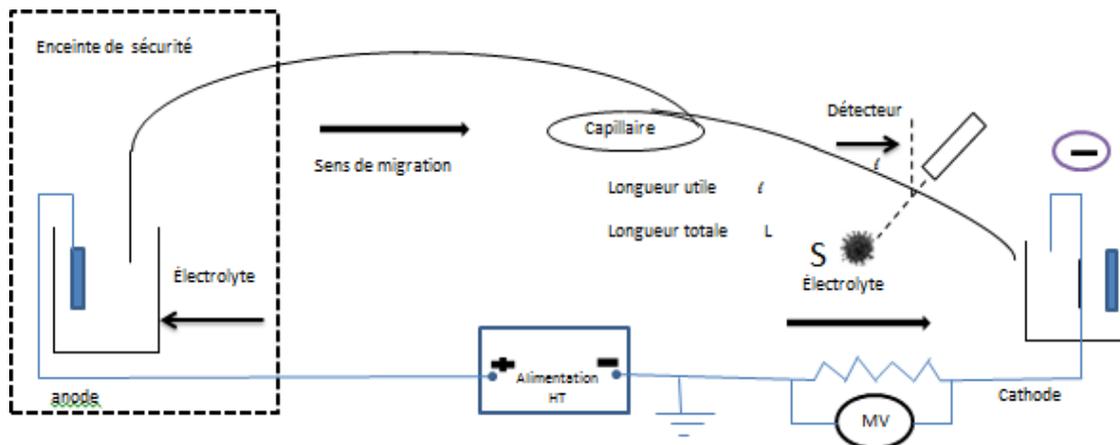


Figure 58 : Une installation d'électrophorèse capillaire.

2. Mobilité électrophorétique et électro-osmotique

En électrophorèse, les constituants d'un mélange se séparent dans le temps par effet de deux facteurs principaux appelés mobilité électrophorétique et flux ou écoulement électro-osmotique, qui sont définissables pour les ions, les molécules, les particules.

2.1. Mobilité électrophorétique

Tout composé porteur d'une charge électrique se déplace dans un électrolyte supposé immobile, vers l'électrode de signe opposé à une vitesse qui dépend des conditions de l'expérience et de sa mobilité (migration) électrophorétique propre μ_{EP} . Ce paramètre accessible est défini à partir de la vitesse de migration électrophorétique du composé et du champ électrique E :

$$\mu_{EP} = v_{EP}/E = v_{EP} L/V \quad 1$$

L : longueur du capillaire

V : ddp appliquée entre les extrémités du capillaire

v_{EP} : vitesse de migration

μ_{EP} : mobilité électrophorétique

On affecte à la mobilité μ_{EP} le signe (+) ou le signe (-) selon la nature de la charge portée. Elle est nulle pour une espèce globale sans charge.

Le nombre de plateaux théoriques N dans une colonne d'électrophorèse capillaire est donné par la relation :

$$N = \frac{\mu EP}{2D} V \quad 2$$

D est le coefficient de diffusion du soluté (cm²/s)

Il faut appliquer des tensions élevées pour obtenir de bonnes séparations et augmenté la résolution avec le nombre de plateaux théoriques

2.2. Mobilité électro-osmotique

Le second facteur qui contrôle la migration des solutés est l'écoulement de l'électrolyte appelé flux électro-osmotique caractérisé par sa mobilité électro-osmotique définit μ_{EOS} qui apparait par effet de la paroi interne du capillaire. La paroi de la silice est en effet tapissée de groupement de groupement silanols qui se déprotonent si le pH est supérieur à 2 pour former une couche polyanionique de type Si-O⁻ :

✓ Cas où les espèces à analyser sont chargées positivement :

Les cations présents dans la solution tampon vont se fixer sur les groupements silanols chargés négativement pour former une couche fixe chargée positivement. Dès qu'un champ électrique est appliqué, c'est cations sont attirés vers la cathode entraînant avec eux le tampon créant ainsi le flux électro-osmotique. Ce déplacement de l'électrolyte produit par la charge des ions et le potentiel appliqué, peut être contrôlé en modifiant la tension, le pH, ou en introduisant des additifs.

Les molécules sont séparées de la façon suivante :

- ✚ Les cations migrent dans la même direction que l'EOF, les anions sont attirés vers l'anode (+)
 - ✚ Les neutres migrent à une vitesse intermédiaire entre celles des espèces anioniques et celles des espèces cationiques et ne seront pas bien séparés. Plus le rapport masse/charge est élevé, plus la vitesse de migration électroosmotique est élevée en valeur.
- ✓ Cas où les espèces à analyser sont chargées négativement :

On procède à l'ajout d'une amine quaternaire dans le tampon et on inverse la polarité. L'amine quaternaire crée une couche fixe chargée positivement sur la paroi du capillaire. Sous l'effet d'une différence de potentiel les anions solvatés vont se déplacer de la cathode

vers l'anode. On définit la mobilité électro-osmotique par :

$$\mu_{E0S} = v_{E0S} / V = v_{E0S} L / V \quad 3$$

v_{E0S} est déterminée à partir du temps de parcours que met un marqueur neutre pour parcourir la distance effective du capillaire. On choisit une molécule organique, non polaire au pH de l'électrolyte utilisé et facilement détectable par absorption dans l'UV.

$$v_{E0S} = l / t_{mn} \quad 4$$

l : distance effective du capillaire

t_{mn} : temps de migration que met un marqueur neutre

3. Mobilité apparente

En fonction de ce qui précède, chaque ion a donc une vitesse apparente de migration v_{app} qui dépend de la vitesse électrophorétique et de la vitesse du flux électro-osmotique:

$$v_{app} = v_{EP} + v_{E0S} \quad 5$$

v_{app} est aisément calculable à partir de l'électrophorégramme à partir de

$$v_{app} = l / t_m \quad 6$$

t_m : temps de migration d'un composé

La mobilité électrophorétique est définie par la relation :

$$\mu_{app} = v_{app} / V = v_{app} L / V \quad 7$$

En combinant le flux électro-osmotique de l'électrolyte et la mobilité apparente il est donc possible de calculer la mobilité électrophorétique vraie des espèces porteuses de charges:

$$\mu_{EP} = \mu_{app} - \mu_{E0S} \quad 8$$

4. Modes d'injections

Pour introduire un micro volume d'échantillon, qui ne doit pas dépasser 1 % de la longueur utile du capillaire deux procédés sont utilisés :

- L'injection hydrostatique

Elle consiste à plonger l'extrémité du capillaire dans l'échantillon en solution (également un électrolyte) et à provoquer une aspiration à l'autre extrémité.

- L'injection par électromigration

Elle Consiste à immerger pendant un certain temps l'extrémité du capillaire dans l'échantillon porté à un potentiel (50 mV/ cm) dont on choisit la polarité par rapport à l'autre extrémité.

5. Modes de détections

Après l'analyse les solutés peuvent être détecté par :

- ✚ Détection UV/VIS
- ✚ Détection par fluorescence
- ✚ Détection électrochimique. Réalisable en insérant de minuscules électrodes dans le capillaire.
- ✚ Détection par spectrométrie de masse

6. Applications

L'électrophorèse capillaire est utilisée dans la séparation des protéines et des acides nucléiques biochimies et biologie moléculaire. Elle est comparable à la chromatographie liquide quant aux performances, elle complète utilement cette dernière pour les séparations de protéines, d'enzymes, de sucres et d'oligonucléotides. La sensibilité est très grande. La quantité requise d'échantillon est très faible et la consommation de réactifs ou de solvants est négligeable.

Exercice

On considère une installation d'électrophorèse capillaire comportant un capillaire de verre de silice non traitée, à paroi "négative", de longueur totale $L = 1$ m et de longueur effective (ou utile) $l = 90$ cm. La tension appliquée aux bornes du capillaire est de 20 kV. Le détecteur est situé du côté de l'extrémité cathodique du capillaire. L'électrolyte est un milieu tampon de pH 5. Dans ces conditions, le temps de migration t_m d'un composé présent dans l'échantillon est de 10 min.

- Peut-on déduire la charge nette de ce composé
- Calculer la mobilité électrophorétique apparente μ_{app} de ce composé.
- Sachant qu'un composé neutre a un temps de migration t_m de 5 min, déduire la valeur de la mobilité électro-osmotique apparente μ_{EOS} .
- Calculer la mobilité électrophorétique apparente μ_{EP} de ce composé. En déduire le signe de sa charge nette.
- Que se passerait-il si on utilisait un capillaire à paroi traitée pour le rendre neutre?

Correction

- Non, tous les composés sont entraînés par le flux-osmotique
- $\mu_{app} = 7,4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
- $\mu_{EOS} = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
- $\mu_{EP} = -7,4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
- Les espèces qui portent une charge (+) migrent vers la cathode.

Références bibliographiques

- [1] **G. Mahuzier**, M. Hamon. Abrégé de chimie analytique, *Tome 2*, 2^{ème} édition Masson Paris (1990).
- [2] **F. Rouessac**, A. Rouessac, Analyse Chimique, 7^{ème} édition Masson Paris (2005).
- [3] **Skoog**, West, Holler, Crouch, Chimie Analytique, 8^{ème} édition Bruxelles (2013).
- [4] **F. Rouessac**, A. Rouessac, Analyse Chimique, 6^{ème} édition Masson Paris (2004).
- [5] **Z. Kabouche**, Cours et exercices de Chromatographie, OPU Constantine (2010).
- [6] **P. Petitjean**, O. Henin, S. Ellias, G. Gruau. Application de l'électrophorèse capillaire au dosage des anions et des cations majeurs en solution dans les eaux douces naturelles, cahiers techniques de géosciences Rennes N°2 (2001).
- [7] **Jean-Louis CUQ**, Chromatographie liquide, université Montpellier (2007)
- [8] **I. Lurie**, Micellar electrokinetic capillary chromatography of the enantiomers of amphetamine. methamphetamine and the hydroxyphenethylamine precursors. *J. Chromatogr.*, 605, p. 269-275 (1992).
- [9] **N. Younan**, Méthodes de Séparation (2011).
- [10] **D. Christophe, P. Michel**, Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques. Bourgogne (2003).
- [11] **L. Lokiec**, Techniques biochimiques de contrôle et d'analyse des aliments
- [12] **G. Steve**, La chromatographie et l'électrophorèse