

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche Scientifique

Université M'hamed Bougarra Boumerdès



Faculté Des Sciences

Département De Chimie

Cours de la matière :

Techniques de séparation de phases et chromatographie

Destiné aux étudiants de troisième année

Licence Chimie Analytique

Préparé par : Dr ZIATI Mounir

Année universitaire 2022-2023

Table des matières

Avant-propos	
I- RAPPEL SUR LES TECHNIQUES DE SEPARATION	1
I-1 Filtration sous vide et l'essorage	1
I-2 Distillation	2
I-3 Décantation	4
I-4 Extraction et lavage	4
I-5 Evaporation rotative.....	5
I-6 Recristallisation	5
II- GENERALITES SUR LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE ...	7
II-1 Historique	7
II-2 Définition	7
II-3 Principes généraux de la chromatographie	8
II-4 Présentation schématique d'une chromatographie	8
II-5 Classification des méthodes chromatographiques	10
III- CHROMATOGRAPHIE PLANAIRE	13
III-1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	13
<i>III-1-1 Définition</i>	<i>13</i>
<i>III-1-2 Principe</i>	<i>13</i>
<i>III-1-3 Principaux éléments d'une séparation chromatographique par CCM ...</i>	<i>13</i>
<i>III-1-4 Description d'une analyse par CCM selon l'ordre chronologique</i>	<i>14</i>
<i>III-1-5 Applications de la CCM</i>	<i>15</i>
III-2 Chromatographie sur papier	16
<i>III-2-1 Définition</i>	<i>16</i>
<i>III-2-2 Papier</i>	<i>16</i>
IV- CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE	18
IV-1 Définition	18
IV-2 Description et principe	18
IV-3 Adsorbant	19
IV-4 Eluant	19
IV-5 Dimensions de la colonne	19
IV-6 Vitesse d'éluion	20
IV-7 Remplissage de la colonne	20

IV-8 Dépôt des produits à analyser	21
IV-9 Elution	21
V- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	23
V-1 Définition	23
V-2 Avantages de la CPG	23
V-3 Appareillage de la CPG	24
<i>V-3-1 Source du gaz</i>	<i>24</i>
<i>V-3-2 Système d'injection de l'échantillon</i>	<i>25</i>
<i>V-3-3 Four</i>	<i>27</i>
<i>V-3-4 Colonne</i>	<i>27</i>
<i>V-3-5 Phase stationnaire</i>	<i>30</i>
<i>V-3-6 Détecteurs</i>	<i>32</i>
V-4 Application de la CPG	36
<i>V-4-1 Identification des produits</i>	<i>37</i>
<i>V-4-2 Analyse quantitative</i>	<i>37</i>
VI- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE	41
VI-1 Définition	41
VI-2 Avantages	41
VI-3 Principe	41
VI-4 Les différents éléments constitutifs d'un système HPLC	42
<i>VI-4-1 Phase mobile</i>	<i>42</i>
<i>VI-4-2 Réservoir de solvant</i>	<i>43</i>
<i>VI-4-3 Pompes</i>	<i>43</i>
<i>VI-4-4 Injecteurs</i>	<i>44</i>
<i>VI-4-5 Colonnes</i>	<i>45</i>
<i>VI-4-6 Phase stationnaire</i>	<i>46</i>
<i>VI-4-7 Détecteurs</i>	<i>47</i>
VII- INFORMATIONS APPORTEES PAR LE TRACE CHROMATOGRAPHIQUE	50
VII-1 Grandeurs fondamentales	50
<i>VII-1-1 Grandeurs de rétention</i>	<i>50</i>
<i>VII-1-1-1 Temps de rétention</i>	<i>51</i>
<i>VII-1-1-2 Volume de rétention</i>	<i>51</i>

<i>VII-1-1-3 Facteur de rétention (facteur de capacité)</i>	53
<i>VII-1-2 Coefficient de distribution (constante de Nernst)</i>	54
<i>VII-1-3 Facteur de sélectivité (Facteur de séparation)</i>	56
<i>VII-1-4 Résolution d'une colonne</i>	57
<i>VII-1-5 Plateaux théoriques</i>	58
<i>VII-1-6 Efficacité d'une colonne</i>	59
<i>VII-1-7 Optimisation de la séparation</i>	60
<i>VII-1-8 Perte de charge</i>	63
<i>VII-1-9 Cinétique d'échanges (facteurs influents sur la hauteur équivalente à un plateau théorique « H »)</i>	66
Références bibliographiques.....	72

Résumé :

Les techniques de séparation telle que la chromatographie sont utilisées dans divers domaines, tels que la chimie fine, la parfumerie, l'œnologie, l'industrie pétrolière, la biologie, l'industrie des matières plastiques, etc.

C'est une technique d'analyse qualitative et quantitative dans laquelle l'échantillon contenant une ou plusieurs substances est entraîné par un courant de phase mobile, qui peut être liquide, gaz ou fluide supercritique, le long d'une phase stationnaire, qui peut être du papier, de la gélatine, de la silice, un polymère, de la silice greffée etc. Chaque substance se déplace à une vitesse donnée, dépendant de ses caractéristiques (polaire, non polaire, ionique, ...), et de celles des deux phases. Elle permet de déterminer la composition d'un mélange par comparaison à des espèces chimiques de référence, de confirmer ou d'infirmer la présence d'une ou plusieurs espèces chimiques dans une substance.

La chromatographie est aussi utilisée pour connaître la concentration de chaque composé d'un mélange (qualité et quantité) et même leur structure quand elle est couplée (Chromatographie gazeuse-spectroscopie de masse, chromatographie liquide-résonnance magnétique nucléaire, chromatographie liquide-infrarouge).

Avant-propos

Ce polycopié de cours rassemble de manière condensée les informations essentielles concernant de nombreuses techniques de séparation telles que la filtration, la distillation, la chromatographies, etc. Il correspond à un cours que je dispense au département de chimie. Il est illustré par la présentation de nombreuses notions qui permettent d'apprécier les développements théoriques. Conçu pour les étudiants de 3^{ème} année licence chimie analytique, il s'adresse également à ceux des filières scientifiques : des sciences alimentaires et de biologie mais aussi aux responsables de laboratoires de synthèse pharmaceutiques et d'analyse biologiques.

La séparation des constituants d'un mélange, et notamment celle de composés de propriétés physiques et chimiques très proches, reste un problème très important qu'il faut souvent résoudre préalablement.

Les méthodes chromatographiques passées en revue dans ce polycopié sont classées suivant trois critères :

- 1- La nature physique de la phase mobile,
- 2- Le phénomène mis en jeu et
- 3- Le procédé utilisé.

Le polycopié est composé de sept chapitres :

- I- Rappel sur les techniques de séparation
- II- Généralités sur la technique chromatographique
- III- Chromatographie planaire
- IV- Chromatographie sur colonne
- V- Chromatographie en phase gazeuse
- VI- Chromatographie liquide a haute performance
- VII- Informations apportées par le tracé chromatographique

I- RAPPEL SUR LES TECHNIQUES DE SEPARATION

La synthèse organique suit en général les étapes suivantes :

- Synthèse
- Séparation des produits
- Caractérisation du produit pur
- Purification
- Evaluation du rendement

A l'issue de cette synthèse, on obtient souvent un mélange de produits. Il est alors nécessaire de mettre en œuvre des techniques permettant de séparer et d'extraire le produit désiré du mélange réactionnel. Il faut ensuite s'assurer que le produit final est bien le produit recherché. Il faudra donc connaître les méthodes permettant d'identifier un produit et d'en contrôler la pureté. Si le produit n'est pas pur, on pourra procéder à une purification. Une fois le produit est obtenu, on en détermine la quantité de matière pour évaluer le rendement de la synthèse.

I-1 Filtration sous vide et essorage

A la fin d'une synthèse organique (ou en cours), on utilise la filtration pour séparer un solide d'un liquide.

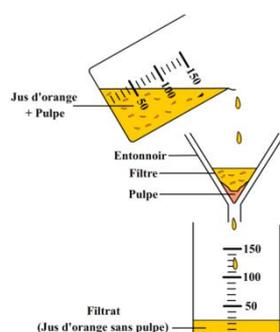


Figure I-1 : Filtration d'un jus d'orange et de sa pulpe

➤ *Principe :*

Le liquide est souvent aspiré à l'aide d'une trompe à eau ou d'une pompe, c'est la filtration sous vide ou la filtration sur Buchner.

Si on cherche à récupérer le solide, cette opération est appelée essorage du solide ; si le liquide qui doit être récupéré, on parle de filtration.

Remarque :

Pour améliorer la séparation et obtenir un solide de meilleur pureté, on peut réaliser un lavage, pour cela, on utilise un solvant dans lequel le solide n'est pas soluble (le solvant ajouté doit être froid de préférence, pour minimiser la solubilité du produit). L'opération est répétée plusieurs fois pour éliminer les impuretés.

I-2 Distillation

La distillation permet de séparer deux liquides miscibles. Elle peut être utilisée au cours ou à l'issue d'une synthèse pour récupérer le produit à partir d'un mélange.

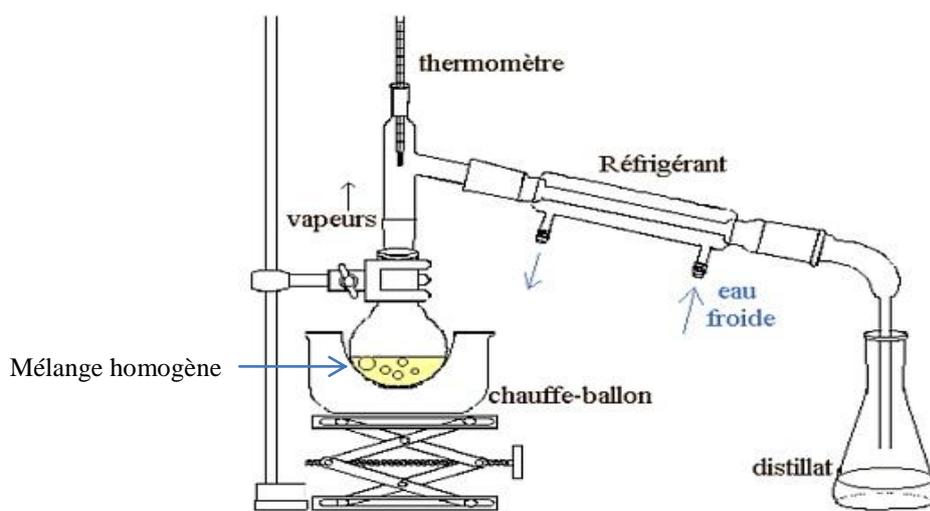


Figure I-2 : Montage de la distillation

➤ *Principe :*

Les liquides à séparer n'ont pas la même température d'ébullition. Le composé le plus volatil se vaporisera plus facilement et composera la majeure partie des vapeurs.

Par condensation de ces vapeurs, un liquide appelé distillat peut être récupéré avec une concentration élevée en composé le plus volatil.

➤ *Techniques de distillation*

- *Distillation simple :*

C'est le cas lorsqu'un seul constituant est volatil à la température d'ébullition. Cette technique est utilisée pour purifier un liquide ou séparer un liquide d'impuretés non volatiles. On récupère lors de l'opération 03 fractions :

- Fraction de tête (impuretés volatiles)
- Fraction de cœur (produit pur)

- Fraction de queue (impuretés non volatiles).

- *Distillation sous pression réduite :*

Lorsque le composé a une température d'ébullition élevée, il est courant de procéder à une distillation sous pression réduite. La diminution de la pression entraîne une diminution de la température et rend celle-ci plus facile à réaliser.

La diminution de la pression s'effectue soit à l'aide d'une pompe ou avec une trompe à eau.

- *Distillation fractionnée :*

Elle permet de séparer les constituants volatils d'un mélange dont les points d'ébullition sont proches. Le mélange à séparer est placé un ballon (bouilleur) surmonté d'une colonne de distillation (Vigreux par exemple). La séparation s'effectue en plusieurs étapes d'où son nom de fractionnée.

Exemple : mélange A ($T_{éb}=60^{\circ}\text{C}$) + B ($T_{éb}=70^{\circ}\text{C}$)

1^{ère} distillation :

- Fraction de tête jusqu'à 60°C (riche en A)
- Fraction de cœur entre 60 et 70°C (mélange A et B)
- Fraction de queue après 70°C (riche en B)

2^{ème} distillation :

Distillation de la fraction tête précédemment obtenue :

- Fraction de tête jusqu'à 60°C (riche en A)
- Le reste est mélangé avec la fraction cœur précédente

On renouvelle les opérations de la 2^{ème} distillation jusqu'à l'obtention du produit A pur. Il faut effectuer la même chose pour le produit B.

Pour finir, on effectue une dernière distillation avec la fraction de cœur et les reliquats des autres distillations.

La fraction en dessous de 60°C est mélangée avec le produit A pur, et au-dessus de 70°C avec la fraction B.

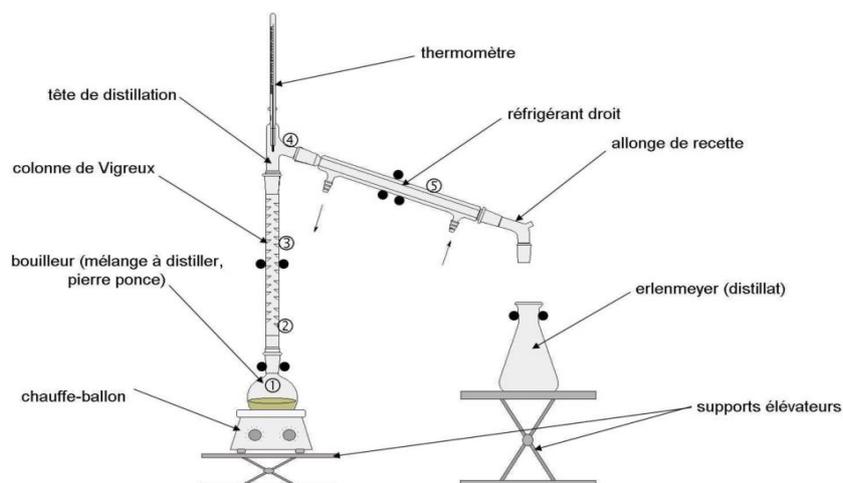


Figure I-3 : Montage de la distillation fractionnée

I-3 Décantation

Au cours d'une synthèse, on peut avoir à séparer deux phases liquides non miscibles, en général une phase organique et une phase aqueuse.

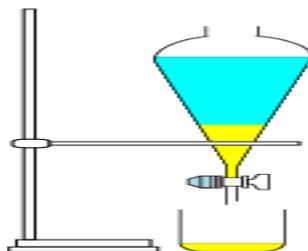


Figure I-4 : Montage de la décantation

➤ *Principe :*

Les deux phases n'ayant pas la même densité, il est possible de les séparer par décantation à l'aide d'une ampoule à décanter. Les phases se déplacent de bas en haut par ordre décroissant de densité. Il suffit alors d'isoler la phase souhaitée.

I-4 Extraction et lavage

En fin de synthèse, il arrive qu'on souhaite faire passer dans un solvant S2 un composé A qui se trouve (au moins en partie) dans un solvant S1.

- Lorsque le but est de récupérer A dans le solvant S2, on dit que l'on fait une extraction A par le solvant S2.
- Lorsque le but est d'éliminer A de la phase S1, par exemple lorsque c'est une impureté ou un reste de réactif, on dit qu'on procède au lavage de S1 par le solvant S2.

➤ **Principe :**

S1 et S2 doivent être non miscibles. En général, l'un des deux solvants est l'eau et constitue la phase aqueuse, l'autre est un solvant organique (la phase organique).

On utilise la différence de solubilité. A doit être plus soluble dans le solvant S2 que dans le solvant S1. Il aura alors tendance à quitter la phase S1 pour la phase S2.

Le coefficient de partage $K_d = C_2/C_1$, avec $K_d < 1$

C_1 et C_2 : concentration de l'espèce dans les solvants 1 et 2 respectivement.

I-5 Evaporation rotative

A l'issue d'une synthèse, le composé d'intérêt peut se trouver en solution dans un solvant organique qu'il faut éliminer. Le principe est basé sur l'abaissement du point d'ébullition avec la pression.



Figure I-5 : Montage de l'évaporation rotative

➤ **Principe :**

L'évaporateur rotatif permet de réaliser une distillation rapide et efficace du solvant, sans exposer les molécules synthétisées à un chauffage trop important grâce à une diminution de la pression. Plus la pression diminue, plus la température diminue.

I-6 Recristallisation

Si à l'issue d'une synthèse, le solide obtenu à chaud, un composé solide impur dans un minimum de solvant. On choisit un solvant de recristallisation dans lequel :

- Le produit à purifier est insoluble à froid, mais soluble à chaud.
- Les impuretés sont solubles à froid dans le solvant.

En solubilisant l'échantillon à chaud, le produit à purifier et les impuretés passent en solution. On refroidit ensuite le solvant, le composé à purifier, non soluble à froid, recristallise alors que les impuretés restent en solution.

Un essorage permet enfin d'éliminer le solvant (avec les impuretés) et d'isoler le solide purifié.

Exemple : synthèse de l'aspirine

- Acide salicylique + anhydride éthanoïque + acide sulfurique : chauffage à 65°C pendant 15 minutes.
- Verser 20mL d'eau froide, refroidir, puis ajouter 70mL d'eau froide.
- L'aspirine cristallise, filtrer et laver avec l'eau distillée.
- Sécher les cristaux à 100°C.

Recristallisation

- Aspirine cristallisée + éthanol + eau chaude pour dissoudre les impuretés.
- Refroidir, l'aspirine recristallise ; filtrer.

II- GENERALITES SUR LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE

II-1 Historique

La chromatographie a été inventée, en 1906, par le Botaniste Russe Mikhail Tswett, ayant déposé sur une colonne en verre remplie de CaCO_3 finement divisé, des solutions de pigments végétaux, tels que des chlorophylles et des xanthophylles. Il constata que l'addition de solvant au sommet de la colonne provoquait le déplacement de chaque pigment à sa propre vitesse, ce qui menait à une séparation. Les espèces séparées se manifestent sous forme de bandes colorées le long de la colonne, il donna à la méthode le nom de chromatographie (en grec Krôma signifie la couleur et graphie signifie écriture).

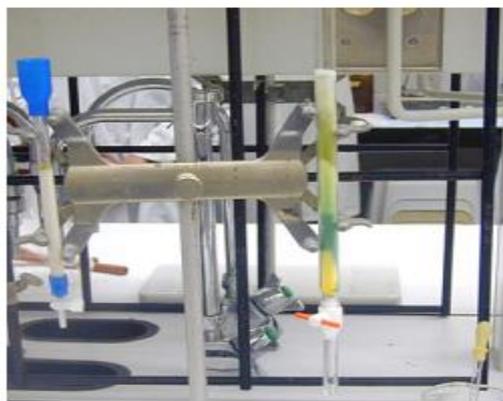


Figure II-1 : Séparation chromatographique sur colonne

Durant les années 30, cette technique a été développée, Iznolov (1938) et Schraiber puis Stahl ont découvert la chromatographie sur couche mince. En 1952, Marlin et James publièrent leurs premiers travaux proprement dits sur la chromatographie en phase gazeuse et chromatographie sur papier.

II-2 Définition

La chromatographie est une méthode analytique qui est largement utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques dans des mélanges. La séparation est basée sur la distribution d'un constituant entre deux phases non miscibles, l'une étant stationnaire, l'autre mobile.

➤ Termes utilisés en chromatographie

- Eluant : est un solvant utilisé pour entraîner les constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire.
- Elution : c'est le processus au cours duquel des solutés sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile.

- Eluat : solution récupérée au bas de la colonne
- Chromatogramme : enregistrement des pics élués perçus par un détecteur. En d'autre terme, c'est la présentation graphique de la concentration en soluté en fonction du temps d'éluion ou volume d'éluion.

II-3 Principes généraux de la chromatographie

La séparation d'un mélange en ses différents constituants est le but de toute chromatographie. Le phénomène ou les procédés utilisés varient selon les types de méthodes choisies, mais toutes ont un certain nombre de points en commun :

- Les composés se répartissent dans deux phases insolubles ou très peu solubles entre elles jusqu'à l'établissement d'un équilibre.
- Le renouvellement continu de la phase mobile déplace cet équilibre et entraîne la migration de chaque substance tout au long de la phase stationnaire.
- Les composés se déplacent selon une vitesse différente en fonction de leur affinité pour les deux phases (les constituants qui ont plus d'affinité pour la phase stationnaire se déplacent très lentement).

II-4 Présentation schématique d'une chromatographie

L'échantillon à analyser est dissout dans un solvant de même ou de nature différente de la phase mobile. Un petit volume élémentaire de cette solution est déposé sur une colonne chromatographique remplie d'une phase stationnaire finement divisée et imprégnée de la phase mobile.

Dans la conduite de cette chromatographie, 3 moments sont envisagés :

- Le dépôt de la solution à chromatographier sur la colonne
- Le développement du chromatogramme
- L'éluion.

La figure (II-2a) ci-dessous montre la séparation de deux espèces A et B dans une colonne. Un volume donné de l'échantillon dissout dans la phase mobile est introduit au sommet de la colonne (au temps t_0 de la figure) et les constituants A et B se distribuent entre les deux phases, l'injection de phase mobile supplémentaire entraîne la partie dissoute de l'échantillon le long de la colonne où de nouveaux équilibres se réalisent entre la phase mobile et de nouvelles zones de la phase stationnaire (temps t_1), l'équilibre entre le solvant frais et la phase stationnaire s'établit simultanément à l'endroit où a été introduit l'échantillon original.

L'avancée graduelle du solvant entraîne les molécules du soluté vers le bas de la colonne en une série continue de transfert entre les deux phases.

Puisque le déplacement du soluté ne peut se produire que dans la phase mobile, la vitesse moyenne de progression d'un soluté dépend du temps qu'il passe en phase stationnaire. Ce temps est long pour les solutés qui sont fortement retenus par la phase stationnaire (le constituant A) et court quand la rétention dans la phase stationnaire est faible (constituant B). Les différences de vitesse résultantes amènent à la séparation des constituants d'un mélange sous forme de bandes tout au long de la colonne. La séparation effective des diverses espèces est réalisée lorsqu'on fait passer dans la colonne une quantité d'éluant suffisante pour que toutes les bandes individuelles en sortent (qu'elles soient éluées et puissent être récupérées (temps t_3 , t_4).

Si un détecteur qui répond à la concentration en soluté est placé à la sortie de la colonne et si son signal est enregistré en fonction du temps (ou de volume de la phase mobile écoulé), on obtient une série de pics symétriques (figure II-2b).

Ce graphe, qu'on appelle un chromatogramme, est utilisé à la fois en analyse qualitative et quantitative. Les positions des pics sur l'axe du temps permettent d'identifier les constituants de l'échantillon, tandis que les aires des pics mesurent leur quantité.

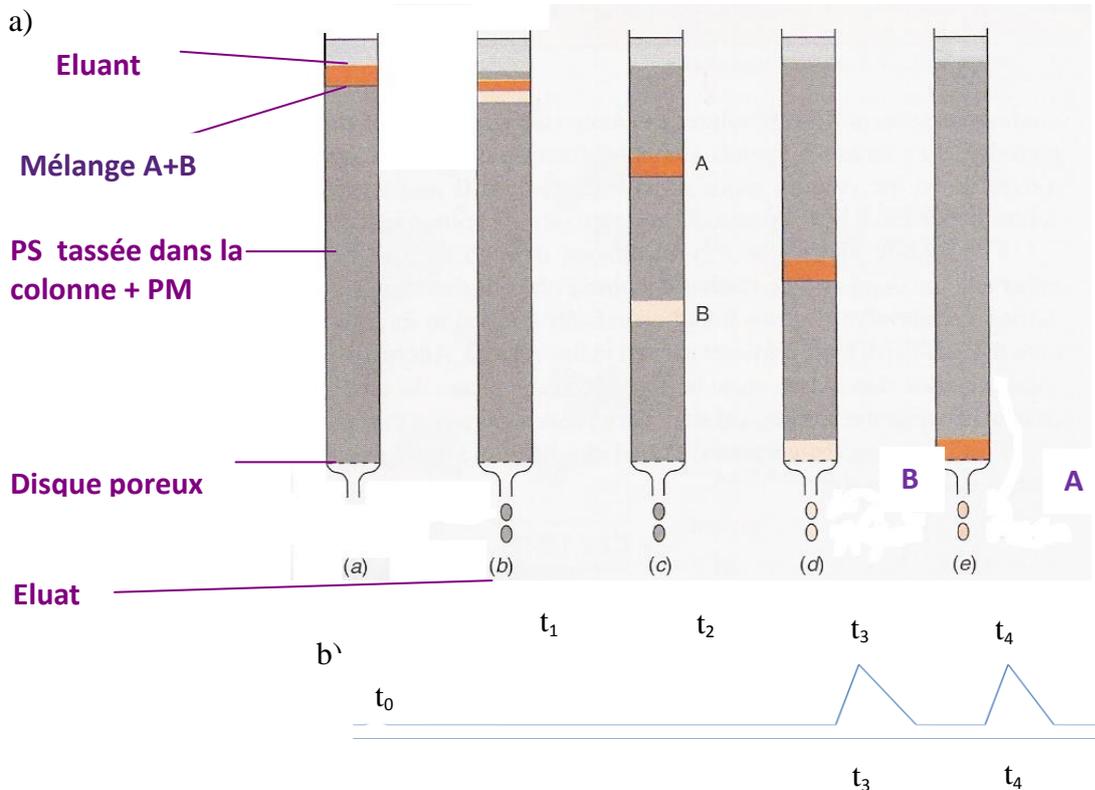


Figure II-2 : a) Schéma montrant la séparation d'un mélange A et B par chromatographie d'éluion sur colonne. b) Signal de sortie du détecteur en fonction du temps d'éluion.

II-5 Classification des méthodes chromatographiques

Sous le nom de méthodes chromatographiques sont regroupées un très grand nombre de techniques dont la dénomination est précisée selon :

- La nature physique des phases
- Le principe du phénomène mis en œuvre dans la séparation
- Le procédé opératoire

a/ selon la nature de la phase mobile :

La phase mobile est un fluide (liquide ou gaz), la phase stationnaire peut être un solide finement divisé, ou un liquide immobilisé sur une phase fixe (un support poreux inerte) ; les différents types de chromatographie en fonction de la nature de la phase mobile sont : la chromatographie liquide et la chromatographie gazeuse.

b/ selon le phénomène chromatographique :

- La chromatographie d'adsorption (Chromatographie liquide ou chromatographie gazeuse) :

La phase stationnaire est un solide adsorbant et la séparation est basée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange par la phase stationnaire, c'est-à-dire la séparation est basée sur le principe de polarité. Plus un composé est polaire, plus fortement il sera adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire, et moins vite il se déplacera. Pour la phase mobile, plus l'éluant est polaire, plus les composés se déplacent rapidement.

- La chromatographie de partage (Chromatographie liquide ou chromatographie gazeuse) :

La séparation est basée sur la différence de solubilité des molécules à séparer dans la phase liquide qui recouvre un solide (support inerte) ou greffée ; les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement par rapport aux moins solubles.

- La chromatographie par échange d'ion :

C'est une chromatographie liquide ; la phase stationnaire est un solide ayant des propriétés particulières que l'on appelle échangeur d'ion (résine), ce solide comporte des groupements fonctionnels fixés ionisés, ces ions sont échangeables avec ceux de la phase mobile en contact avec l'échangeur (greffé sur des polymères ou de la silice).



L'ajout de l'éluant avec base diluée déplace l'équilibre dans le sens 2 (libération des ions A⁻).

- La chromatographie d'exclusion (perméation ou filtration sur gel) :
C'est une chromatographie liquide, la phase stationnaire est un solide poreux dont la taille des pores est voisine de la taille de certaines molécules à séparer, celles qui sont trop grosses pour pénétrer dans les pores sont exclues de la phase fixe et sont éluées d'abord, celles qui pénètrent sont éluées ensuite.

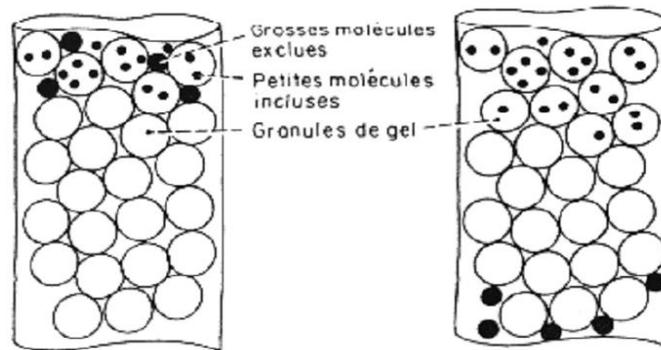


Figure II-3 : Principe de la chromatographie d'exclusion

- La chromatographie d'affinité :
Elle est basée sur des interactions spécifiques et réversibles entre des composés spécifiques (ligands), lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase fixe et son partenaire d'affinité en solution (substance à analyser ou affinant).
Le ligand est fixé sur une matrice (résine) directement ou indirectement à l'aide d'un bras fixateur (espaceur).
Dans le complexe de nature biologique, dont la formation est à la base de la chromatographie d'affinité, l'un des partenaires au moins est une protéine ; cette protéine peut constituer le ligand fixe ou le partenaire d'affinité en solution.

c/ selon le procédé utilisé :

Selon la présentation de la phase stationnaire, on distingue :

- Chromatographie sur colonne (CC)
- Chromatographie planaire ou de surface (chromatographie sur papier CP, et sur couche mince CCM).
- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Tableau II-1 : Les différentes techniques chromatographiques

Classification générale	Méthode spécifique	Phase stationnaire	Type d'équilibre
Chromatographie en phase liquide (phase mobile : liquide)	Liquide-liquide	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre liquides non miscibles
	Liquide-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre liquide et surface greffée
	Liquide-solide	Solide	Adsorption
	Echangeur d'ion liquide-gel	Résine échangeuse d'ion Liquide dans les interstices d'un solide polymérique	Echange d'ion Partage / tamisage
Chromatographie en phase gazeuse (phase mobile : gaz)	Gaz-liquide	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre gaz et liquide
	Gaz-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre gaz et surface greffée
	Gaz-solide	Solide	Adsorption
Chromatographie en fluide supercritique		Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre un fluide supercritique et surface greffée

III- CHROMATOGRAPHIE PLANAIRE

Ce type de chromatographie comprend la chromatographie sur papier et la chromatographie sur couche mince, chacune de ces méthodes utilise une couche plane relativement mince d'un matériau rigide ou déposé sur une surface de verre ou de métal. La phase mobile se déplace à travers la phase stationnaire par capillarité.

III-1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

III-1-1 Définition

C'est une méthode analytique, c'est la plus simple des techniques chromatographiques. En général, les séparations sur couche mince s'effectuent sur une plaque en verre recouverte d'une couche mince et adhérente de particules finement divisées ; cette couche constitue la phase stationnaire.

La phase mobile est un solvant qui progresse le long de la phase stationnaire, elle est variable selon la séparation.

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'adsorption, c'est-à-dire formation de liaisons hydrogène entre les molécules de l'espèce chimique étudiée et la phase stationnaire ou des interactions dipôle-dipôle.

III-1-2 Principe

La séparation par chromatographie sur couche mince est basée sur l'adsorption sélective des constituants du mélange à la surface de la phase stationnaire balayée par la phase mobile. Plus une substance est soluble dans la phase mobile, plus elle est entraînée par cette phase ; une substance peu soluble dans la phase mobile migre peu.

Les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composés polaires lorsque l'adsorbant est de nature polaire (silice, alumine, etc.).

III-1-3 Principaux éléments d'une séparation chromatographique par CCM

- La cuve chromatographique :
Un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- La phase stationnaire :
Une couche d'environ 0.25mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme CaSO₄ hydraté ou l'amidon.

Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants utilisés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine et la cellulose.

➤ La phase mobile :

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvant. Un solvant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est très polaire, celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment.

➤ L'échantillon :

Un volume de l'ordre du μL , dilué dans un solvant volatil, est déposé en un point repère au-dessus de l'éluant.

III-1-4 Description d'une analyse par CCM selon l'ordre chronologique

a) Préparation de la cuve chromatographique.

- Introduire l'éluant ou le mélange de solvants.
- Ajuster le niveau de l'éluant à environ de 0.5 cm du fond de la cuve.
- Fermer le récipient (la cuve doit être saturée de vapeur de solvant).

b) Dépôt de l'échantillon sur la plaque.

- Procéder au nettoyage de la plaque si nécessaire (activation à l'étuve à 100°C /10min).
- Dissoudre l'échantillon dans un solvant approprié en solution de 2 à 5 %.
- Déposer environ 0.5 mL de la solution en un point situé à 1 cm de l'extrémité inférieure de la plaque; le diamètre de la tâche doit être d'environ 2 mm pour la disposition de plusieurs produits.
- Sécher à l'aide d'un séchoir ; éventuellement faire de nouvelles applications.

c) Développement du chromatogramme.

- Placer la plaque dans la cuve en position verticale.
- Refermer le récipient qui ne doit plus être déplacé.
- Lorsque le front du solvant se trouve à environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, la retirer et marquer cette position (le trait peut être tracé à l'avance et servir de repère pour arrêter l'élution).

d) Révélation et calcul du rapport frontal « R_f ».

- Sécher la plaque à l'aide d'un séchoir
- Révélation des taches à l'œil nu pour les substances colorées. Si les taches ne sont pas colorés, l'adsorbant est traité de façon à faire les apparaitre, on peut donc les

révéler en vaporisant différents réactifs caractéristiques tel que : H_2SO_4 , KMnO_4 , I_2 ou une lampe UV.

– Cercler les taches et pointer leur centre.

– Calculer les R_f

$$R_f = x_1/x_0$$

x_1 : distance parcourue par le soluté

x_0 : distance parcourue par le solvant (phase mobile)

R_f varie de 0 à 1

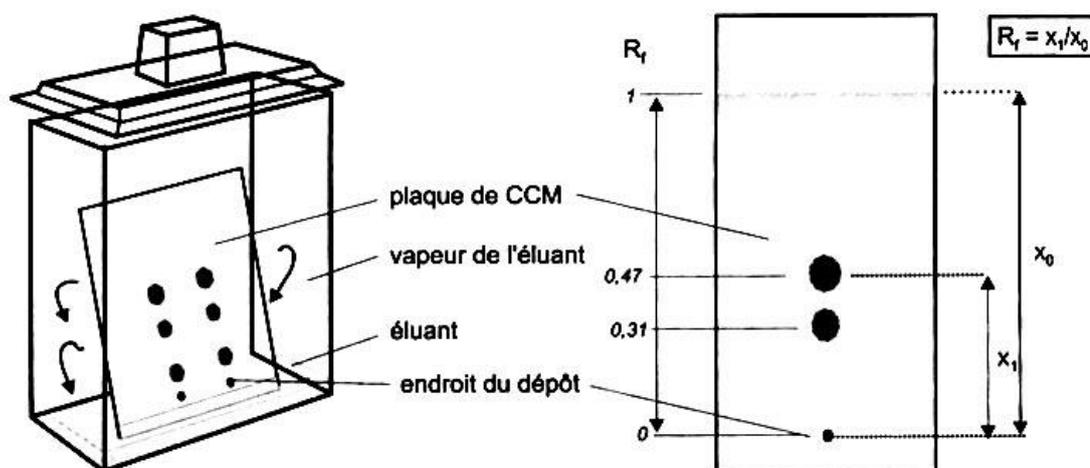


Figure III-1 : Principe de la séparation par chromatographie su couche mince

Remarque :

- La tache unique peut indiquer que le produit est pur, mais cela peut signifier qu'il y a différentes substances ayant pour l'adsorbant la même affinité.

On peut lever cette ambiguïté en répétant l'expérience avec un autre solvant ou un autre adsorbant.

- $R_{fA} = R_{fB}$ (même couleur à la révélation) \implies A et B sont les mêmes produits (dans les mêmes conditions expérimentales).

III-1-5 Applications de la CCM

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.

De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction chimique.

La chromatographie sur couche mince est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne.

III-2 Chromatographie sur papier

III-2-1 Définition

Cette technique ressemble à celle de la CCM mais le principe repose sur des phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même adsorbée sur la cellulose du papier ou liée chimiquement à celle-ci. Comme en chromatographie sur couche mince, 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. 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.

Lorsque l'eau est un des solvants de la phase mobile, les autres solvants organiques doivent y être assez solubles. Des produits comme l'acide éthanoïque, le propanol, le phénol ou la pyridine sont les solvants les plus fréquemment utilisés en mélange avec de l'eau pour développer un chromatogramme.

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels.

Ses plus grands inconvénients par rapport à la CCM sont:

- une durée de développement beaucoup plus longue,
- une séparation généralement moins bonne.

III-2-2 Papier

On peut utiliser 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 sont uniformes. Les marques principales sont Whatman, Schleicher et Schüll, Durieux et Arches.

Il existe huit catégories de papier Whatman, classés selon leur épaisseur, la texture de leur surface et la vitesse avec laquelle l'eau 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 des taches très denses et uniformes.

La description de l'analyse par chromatographie sur papier est identique à celle sur couche mince.

IV- CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

IV-1 Définition

Ce type de chromatographie permet de séparer des quantités de substance allant de quelques mg à quelques g. C'est une chromatographie d'adsorption ; la colonne est un tube cylindrique vertical en verre dont la longueur peut varier de quelques cm à 1m et parfois plus, le diamètre moyen est voisin de 1/15 de la longueur.

La chromatographie sur colonne présente cependant plusieurs inconvénients :

- De grandes quantités de solvants sont nécessaires à l'élution
- La durée de l'élution est généralement très grande
- La détection des composés exige une attention constante.

IV-2 Description et principe

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

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille. Ils s'agit d'une chromatographie préparative.

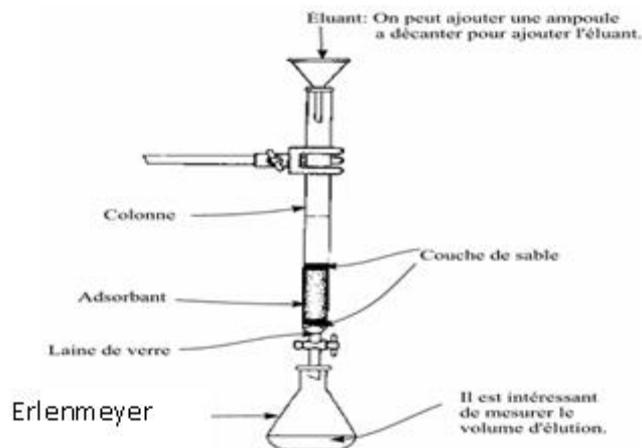


Figure IV-1 : Montage de la chromatographie sur colonne

IV-3 Adsorbant

Le plus utilisé est l'alumine; cependant, on la limitera aux composés organiques stables car, sous sa forme basique, elle peut provoquer la déshydratation des esters par exemple.

Le gel de silice est également fréquemment utilisé pour la séparation de composés qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être traités par l'alumine.

La granulométrie de l'adsorbant doit être supérieure à celle des adsorbants utilisés en CCM. Leur taille est habituellement comprise entre 50 et 200 μm .

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

IV-4 éluant

L'éluant est en général un mélange de deux solvants. Au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les substances les moins retenues par l'adsorbant (les moins polaires). Ensuite on fait varier la composition de l'éluant en additionnant graduellement le solvant le plus polaire. Ainsi les composés les plus polaires, retenus sur l'adsorbant, ne migreront que graduellement vers le bas de la colonne.

IV-5 Dimensions de la colonne

Les colonnes spécialement conçues pour cet usage ont à leur base une plaque de verre fritté ou de porcelaine qui permet l'écoulement libre de l'éluant tout en empêchant le passage de

l'adsorbant. On peut aussi utiliser une burette, au fond de laquelle on place un tampon de laine de verre et du sable.

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

IV-6 Vitesse d'élution

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

IV-7 Remplissage de la colonne

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

a/ voie sèche :

La phase stationnaire formée de petites particules solides de taille bien déterminée est versée dans la colonne par fraction et légèrement tassée. Ce tassement est complété par l'ajout de petites quantités de phase mobile qui pénètre dans les espaces intergranulaires et par écoulement, assurent la répartition homogène de l'ensemble ; il faut toujours maintenir une certaine quantité au-dessus de la surface de la phase stationnaire afin d'éviter sa fissuration.

b/ voie humide :

La phase stationnaire est mise en suspension dans un très petit volume de phase mobile ou le solvant le moins polaire.

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

Pendant l'opération, on doit veiller à ce que le niveau du solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant.

L'avantage de cette technique est l'élimination des bulles d'air souvent présentes et source d'irrégularités.

IV-8 Dépôt des produits à analyser

Ils doivent former une zone cylindrique étroite dans le haut de la colonne. Un liquide est déposé tel quel. Un solide sera dissous dans le minimum du moins polaire des deux solvants.

On ajuste d'abord le niveau de solvant pour qu'il soit juste au-dessus de celui de l'adsorbant. A l'aide d'une pipette, on coule l'échantillon au sommet de la colonne de façon uniforme sur toute la surface de la colonne sans la déformer. Si nécessaire, on ajuste à nouveau, comme précédemment, le niveau du liquide de la colonne : l'échantillon est ainsi adsorbé uniformément au sommet de la colonne.

IV-9 Elution

On peut alimenter la colonne en continu à l'aide d'une ampoule de coulée ou bien ajouter manuellement l'éluant. Dans tous les cas, la surface de l'adsorbant ne doit jamais être au contact de l'air. En quelques minutes, une colonne laissée à sec se détériore : des fissures apparaissent dans la phase fixe et toute élution ultérieure se transforme en ruissellement.

Pour la plupart des opérations, une vitesse de 5 à 50 gouttes à la minute convient (la limite inférieure correspond aux séparations difficiles)

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

Remarques :

- L'introduction de la phase mobile s'effectue manuellement ou par écoulement à partir de réservoir placé au-dessus des colonnes, et dont les débits sont réglés : mode isocratique (même composition de la phase mobile au cours de l'opération) ou mode gradient d'élution (variable en fonction du temps).
- Polarité de l'éluant :
 - Si l'éluant est suffisamment polaire, il va entraîner la majorité des produits polaires, s'il est apolaire, il n'entraîne que les composés apolaires
 - Pour des solutés polaires, il faut utiliser des solvants polaires.

- Polarité des groupements fonctionnels :

$RH < RCH=CHR < R-X < RCOOR' < RCOR < RCOH < RCONH_2 < RNH_2 < alcool < eau < CH_3COOH$

- Polarité des solvants :

$CH_3COOH > eau > méthanol > éthanol > propanol-1 > propanone > pyridine > éthanoate d'éthyle > CHCl_3 > éther diéthylique > CH_2Cl_2 > C_6H_6 > C_6H_5CH_3 > CHCl=CCl_2 > CCl_4 > cyclohexane > éther de pétrole$

- Polarité des phases stationnaires :

$Cellulose < amidon < sucre < talc < Na_2CO_3 < MgO < Si(OH)_4 < Al_2O_3 < charbon actif$

V- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

V-1 Définition

Cette méthode chromatographique permet de séparer des mélanges à l'état gazeux (l'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne) : liquide volatilisé ; l'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. Contrairement à la plupart des autres types de chromatographies, il n'y a pas d'interaction entre les molécules d'analytes et la phase mobile (sa seule fonction est de transporter le soluté dans la colonne).

Il existe deux types de CPG :

- Chromatographie gaz-solide : on utilise une phase stationnaire solide sur laquelle la rétention des solutés résulte d'une adsorption physique ; ce type de chromatographie a une application limitée à cause de très forte rétention des molécules polaires.
Il s'ensuit que cette technique se limite à la seule séparation des espèces gazeuses de faible masse molaire : air, H₂S, NO_x, CO, CO₂ et gaz rares.
- Chromatographie gaz-liquide : est basée sur le partage du soluté entre une phase gazeuse mobile et une phase stationnaire liquide immobilisée sur la surface d'un support inerte.

V-2 Avantages de la CPG

La CPG a connu un très grand développement dû :

- Aux nombreux facteurs sur lesquels, il est facile d'agir pour modifier les séparations : température, vitesse de passage de phase mobile, nature de phase stationnaire, etc.
- A la rapidité (moins d'une heure).
- La nature gazeuse de la phase mobile n'implique pas de réaction avec les composés, ce qui entraîne un facteur de dissolution constant.
- Sa polyvalence.

V-3 Appareillage de la CPG :

Il comprend cinq parties : une source de gaz, une chambre d'injection, un four, une colonne, et un détecteur couplé à un enregistreur.

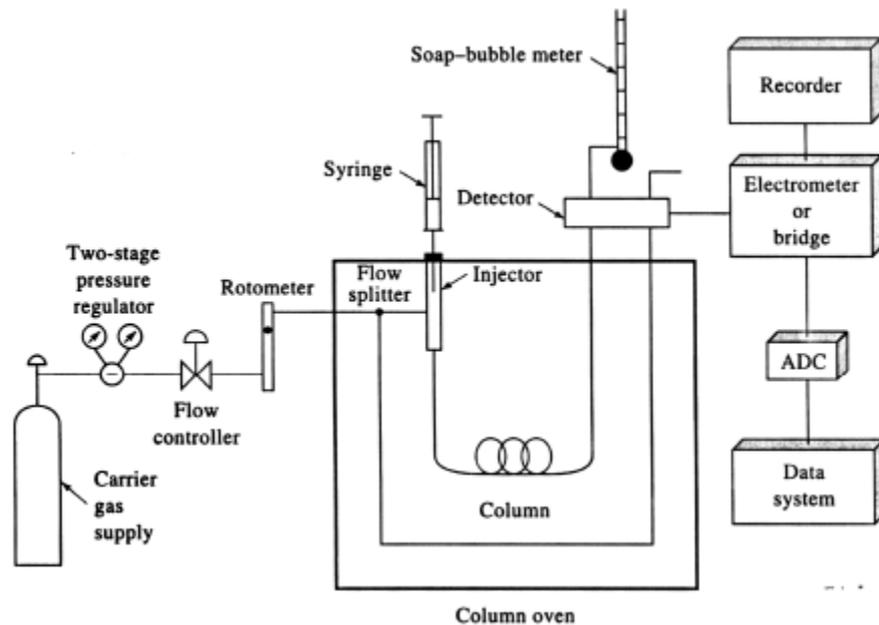


Figure V-1 : Schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse

V-3-1 Source du gaz

Les gaz utilisés doivent répondre à un certain nombre de critères :

- Grande pureté (exempt de traces hydrocarbures, de H_2O_2 et d' O_2 ; sinon, on utilise un filtre).
- Inerte vis-à-vis des composés à analyser (pour ne pas modifier les constantes de dissolution).
- Faible viscosité (une viscosité élevée implique une température élevée donc un faible débit).
- Conductibilité thermique comparable avec le système de détection.
- On utilise comme gaz vecteur : H_2 , N_2 ou He .
- Une pression d'admission comprise entre 68947 et 344738 Pascals.
- Un débit entre 25 et 150 mL/min pour les colonnes remplies et entre 0.5 et 5mL/min pour les colonnes capillaires.

V-3-2 Système d'injection de l'échantillon

L'échantillon à analyser, préalablement mis en solution dans un solvant très volatil, est injecté à l'aide d'une micro-seringue, le volume injecté varie de 1 à 10 μl à travers une membrane d'élastomère qui obture la chambre d'injection ; les solutions ne doivent pas être trop concentrées et l'injection doit être rapide pour éviter l'élargissement des pics. La chambre d'injection est maintenue à environ 50°C au-dessus du point d'ébullition du constituant le moins volatil de l'échantillon. Cette chambre d'injection possède une double fonction :

- Provoquer la volatilisation instantanée de l'échantillon,
- Assurer le mélange homogène de la vapeur ainsi formée et du gaz vecteur.

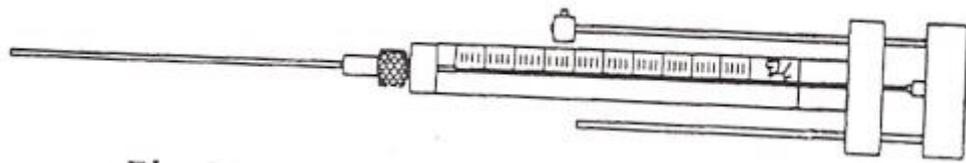


Figure V-2 : Seringue utilisée en CPG

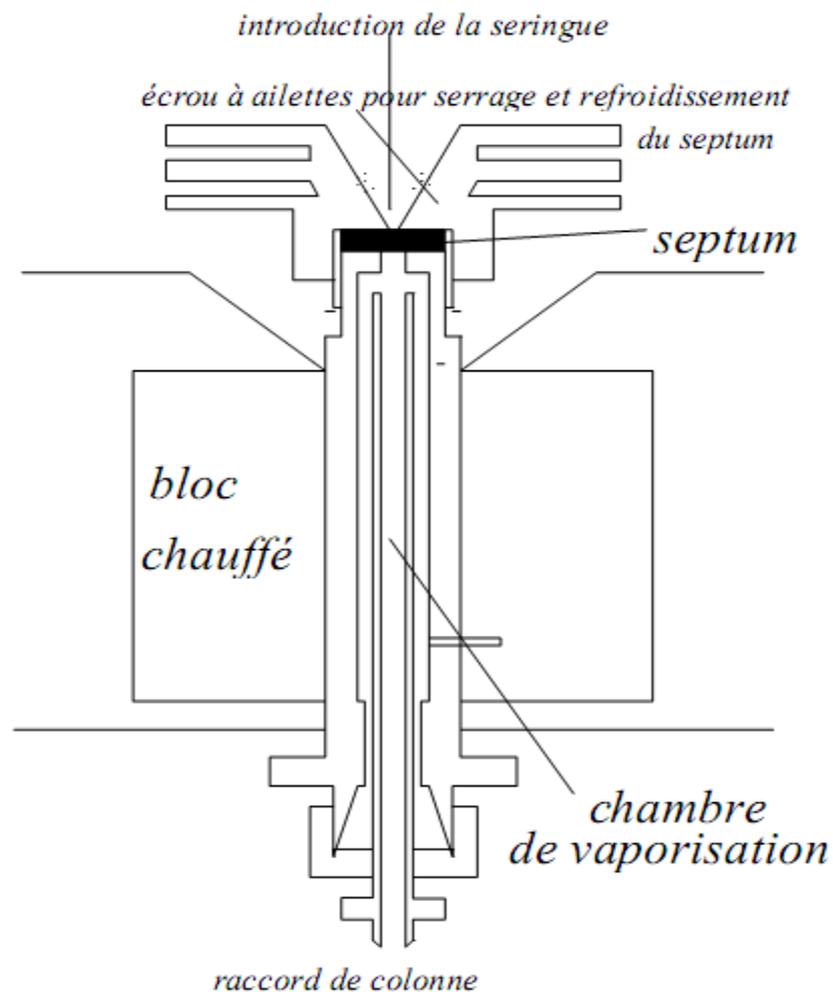


Figure V-3 : Chambre d'injection

Il existe plusieurs types d'injecteurs :

a/ Injecteur diviseur (Split) :

L'injection des quantités inférieures au μl est difficile à réaliser ; dans ce type d'injecteur, le gaz vecteur qui entraîne l'échantillon dans la chambre d'injection vers la colonne est divisé en deux flux dont une fraction pénètre seul dans la colonne, l'autre partie s'échappe par un système de fuite.

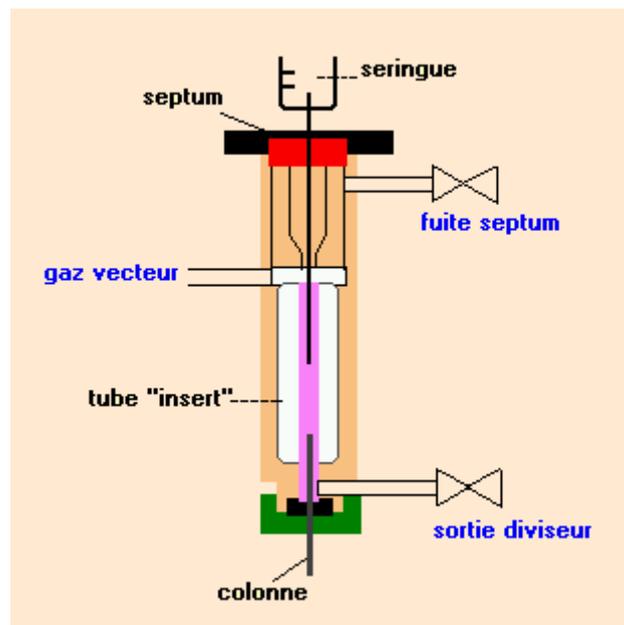


Figure V-4 : Injecteur diviseur (Split)

b/ Injecteur sans diviseur (Splitless) :

La solution injectée est volatilisée puis entraînée dans les premières spires de la colonne capillaire où elle se condense, le four étant maintenu à une température entre 20 et 30°C inférieure au point d'ébullition du soluté le moins volatil.

L'injecteur est ensuite balayé par le gaz vecteur qui élimine l'excès du solvant ; une augmentation de la température du four provoque la volatilisation des substances condensées qui sont ensuite analysées.

Le débit du gaz vecteur compris entre 50 et 100 ml/min dans la chambre de vaporisation.

c/ Injection directe :

L'injecteur et la colonne sont à température ambiante, l'échantillon est déposé directement au sommet de la colonne, puis celle-ci est réchauffée pour que le soluté s'évapore ; les différents solutés sont volatilisés et entraînés successivement en fonction de leur volatilité dans la colonne ; ce type d'injecteur convient pour les colonnes remplies et les grosses colonnes capillaires (débit du gaz égale à 8 ml/min).

d/ Injecteur à aiguille de verre :

Un μl de la solution est déposé, à l'aide d'une seringue, à l'extrémité d'une aiguille de verre balayée par le gaz vecteur à température ambiante, la solution s'évapore, l'extrémité de l'aiguille sur laquelle les solutés restent déposés, est introduite directement au sommet de la colonne maintenue à la température nécessaire à leur volatilisation.

V-3-3 Four

Il est destiné à recevoir les colonnes et à les porter à la température désirée qui peut être ajusté au degré près, ce four possède un volume important et son atmosphère est brassée par un système de ventilation. Pour améliorer la séparation, ce four est équipé d'un dispositif de programmation qui, pendant une chromatographie, permet d'augmenter la température en fonction du temps.

V-3-4 Colonne

La colonne est un tube étroit destiné à contenir la phase stationnaire ; de nombreux matériaux sont utilisés : cuivre, aluminium, plastique ; cependant, les plus utilisés sont en acier inoxydable ou en verre.

Parfois les parois d'une colonne en acier sont portées à de forte température (catalyser la dégradation de certaines substances).

Les colonnes sont les plus souvent de forme spirale ou largement courbées afin d'occuper des volumes restreints.

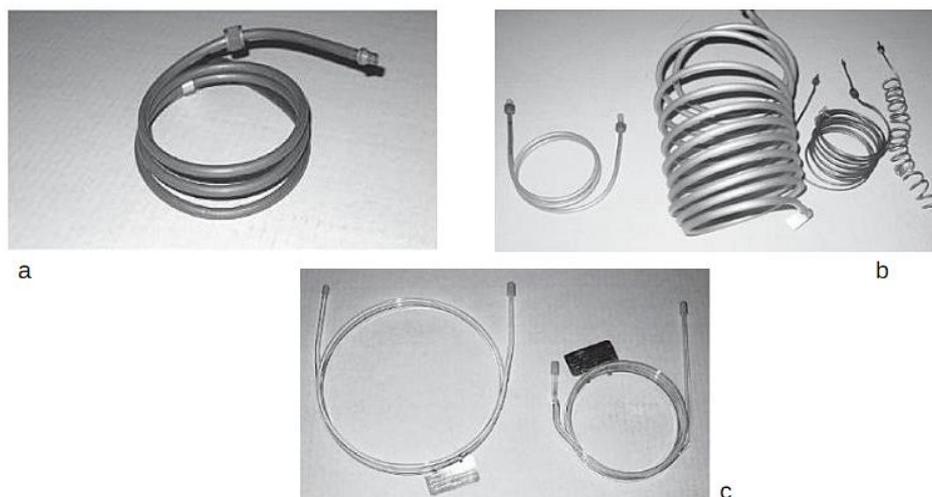


Figure V-5 :Colonnes remplies (a : colonne en cuivre, b : en aluminium, c : en verre)

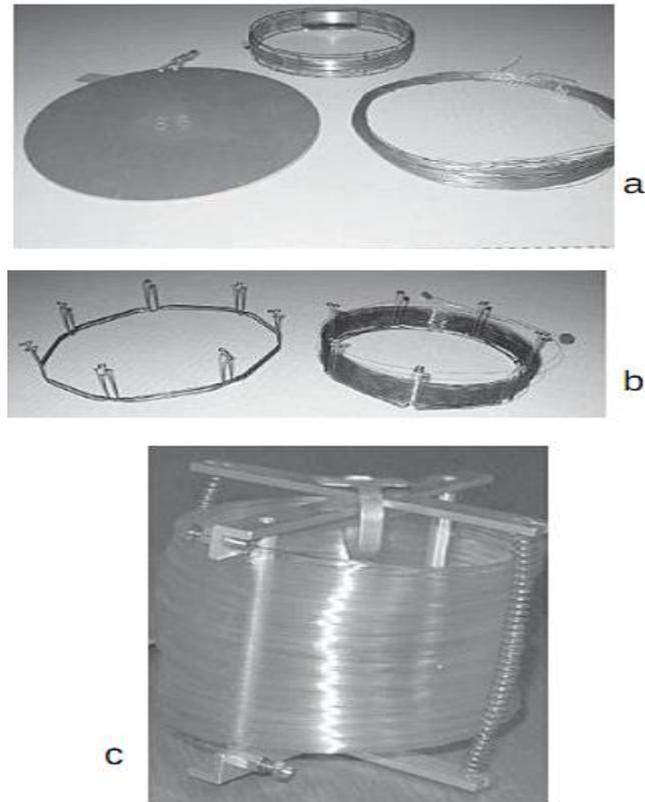


Figure V-6 :Colonnes capillaires (a : en acier inoxydable, b : en silice fondue, c : en borosilicate)

Il existe deux types de colonnes en CPG :

a/ Colonne remplie :

La phase stationnaire est constituée d'un film mince de liquide adsorbé sur la surface d'un solide inerte et finement divisé, la longueur est de 2 à 3m, le diamètre intérieur : 2 à 4 mm ; on y tasse un matériau de garnissage, ou support solide finement divisé préalablement recouvert d'une couche mince (0.05 à 1 μ m) de phase stationnaire liquide, les tubes sont enroulés en spirale d'environ 15 cm de diamètre.

- Support solide : silicates, terre diatomée constitué de squelette siliceux,
- Le support idéal est constitué de petites particules sphériques uniformes qui ont une bonne résistance mécanique et une surface spécifique supérieure à 1m²/g.
- Le matériau doit être inerte à température élevée et être uniformément mouillé par la phase liquide.
- Granulométrie des supports : l'efficacité d'une colonne de CPG augmente lorsque le diamètre moyen des grains de support diminue ; l'idéal c'est de choisir une granulométrie du support comprise entre 0.18 et 0.25 μ m.

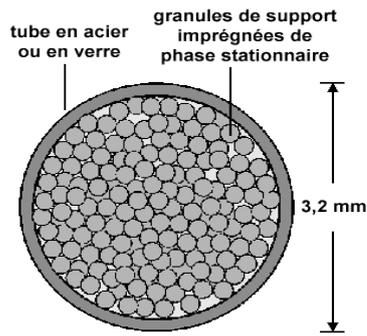


Figure V-7 : Colonne remplie

b/ Colonne capillaire :

Les colonnes tubulaires ouvertes se différencient entre elles par les caractéristiques de la phase stationnaire qui tapisse leur paroi interne (soit sous forme d'un film, soit sous forme de fines particules poreuses adhérentes).

Ces colonnes sont en silice fondue de diamètre intérieur de 0.25 à 0.32 mm et de longueur 12 à 100 m.

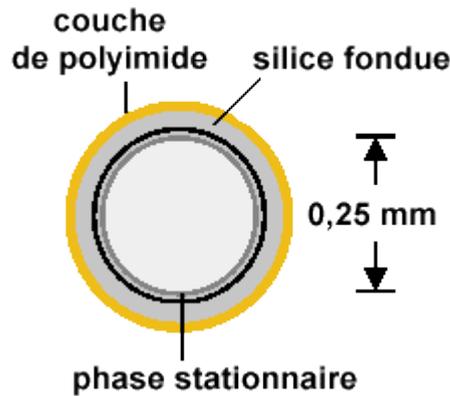


Figure V-8 : Colonne capillaire

Les colonnes capillaires sont appelées :

- WCOT (wallcoated open tubular) lorsque la phase stationnaire est liquide
- SCOT (support coated open tubular) lorsque la phase stationnaire est déposée sur un support inerte
- PLOT (porous layer open tubular) lorsque la phase stationnaire est une couche poreuse.

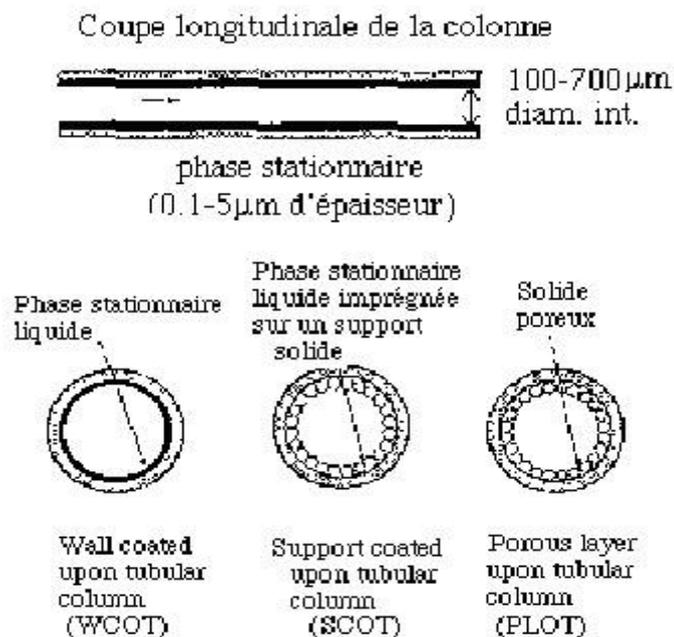


Figure V-9 : Types de colonne capillaire

V-3-5 Phase stationnaire

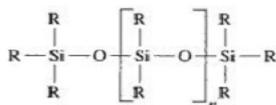
➤ *Phase stationnaire liquide :*

La phase stationnaire liquide immobilisée dans une colonne de CPG doit présenter les propriétés suivantes :

- Stabilité thermique : c'est-à-dire tension de vapeur faible afin qu'aux températures d'utilisation, elle ne soit pas elle-même volatilisée.
- Inertie chimique.
- Propriétés du solvant : facteur de capacité et facteur de sélectivité se situent dans le domaine optimal pour les solutés à séparer.
- Solubilité : afin d'imprégner de façon homogène toutes les particules de la phase support, elles doivent être solubles dans des solvants volatiles qui sont ensuite facilement éliminés.

Exemple :

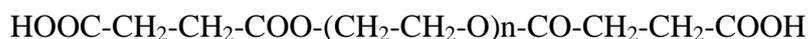
➤ Les polysiloxanes



R = -CH₃ ou des groupements fonctionnels (-C₆H₅, -C₃H₆-CN)

C'est une phase stationnaire non polaire à usage général, elle est utilisée pour séparer les hydrocarbures aromatiques polynucléaires, les médicaments, etc. La température maximale d'utilisation est 350°C.

- Polyester de glycol : estérification des glycols par des diacides à chaîne courte (acide succinique).



- Polyéthylène glycol : utilisé pour séparer les espèces polaires.



Le tableau V-1 montre les phases stationnaires liquides les plus utilisées en CPG.

Tableau V-1 : Quelques phases stationnaires en chromatographie gaz-liquide pour colonnes remplies et capillaires

Phase stationnaire	Tmax°C	Utilisation
Polydiméthylsiloxane	350	Hydrocarbures, aromatiques, stéroïdes
5% phényl-polydiméthylsiloxane	350	Esters méthyliques d'acide gras, alcaloïdes, composés halogénés
50% phényl-polydiméthylsiloxane	250	Stéroïdes, pesticides, glycols
70% trifluoropropyl-polydiméthylsiloxane	350	Aldéhydes, cétones, composés chlorés et nitrés
Polyéthylène glycol	250	Acides, alcools, éthers, huiles essentielles, glycols
50% cyanopropyl-polydiméthylsiloxane	240	Acides gras polyinsaturés, acides, alcools

- *Phase stationnaire solide :*

Avec ce type de phase, la chromatographie se fait par adsorption sur une phase stationnaire formée de petites particules solides de granulométrie très homogène, constituée par des adsorbants poreux : Si, Al₂O₃ ou polymère.

- Tamis moléculaire : se sont des adsorbants sélectifs en raison de leur structure formant des pores de dimensions bien définies, ils peuvent être d'origine minérale : aluminosilicates ou organique : polymères réticulés dérivés du styrène.

- Polymère poreux : formé par la polymérisation de molécule de vinyle éthyle benzène en présence de molécule de divinyle benzène, ils se présentent sous forme de perles de porosité bien déterminée ; cette phase stationnaire est utilisée pour la séparation des composés polaires : H₂O, méthanol, acétone, gaz ou hydrocarbures légers.

Ces phases solides présentent l'avantage de donner les grandeurs de rétention très stables et de permettre l'emploi de détecteurs très sensibles. Ces matériaux permettent de séparer les composés légers et volatils qui traversaient rapidement les colonnes à phase liquide.

V-3-6 Détecteurs

Les détecteurs sont placés à l'extrémité des colonnes, les détecteurs décèlent la présence des substances dans le gaz vecteur au fur et à mesure de leur élution, ils doivent présenter les caractéristiques suivantes :

- Sensibilité appropriée (10^{-8} à 10^{-15} g/s)
- Bonne stabilité et bonne reproductibilité
- Domaine de température de fonctionnement compris entre la température ambiante et 400°C
- Temps de réponse rapide indépendant de la vitesse d'écoulement
- Grande fiabilité et facilité d'emploi
- Réponse uniforme à tous les solutés ou sélectif limitée à une ou plusieurs classes de soluté.

a/ Détecteur par conductibilité thermique (catharomètre):

C'est un détecteur non spécifique, il mesure la différence de propriété entre le soluté et la phase mobile, son fonctionnement repose sur la variation de la conductibilité thermique du gaz vecteur lié à la présence des molécules de l'échantillon. La diminution de la conductibilité à la sortie de la colonne, le flux gazeux traverse le détecteur qui est constitué par une cavité creusée dans un bloc métallique où se trouve un filament thermosensible en platine ou en tungstène de résistance R. Lorsqu'une intensité I le traverse, ce filament, par effet de joule, dégage une quantité de chaleur dont une partie en fonction de la conductivité thermique du gaz est transmise aux parois du catharomètre.

$$Q = R I^2$$

Avantages : simplicité, large domaine dynamique de linéarité en fonction de la concentration, réponse générale aux espèces organiques et inorganiques, son caractère non destructif permet de collecter les solutions après leur détection.

Inconvénients : sensibilité relativement faible : 10^{-8} g de soluté par 1ml du gaz vecteur.

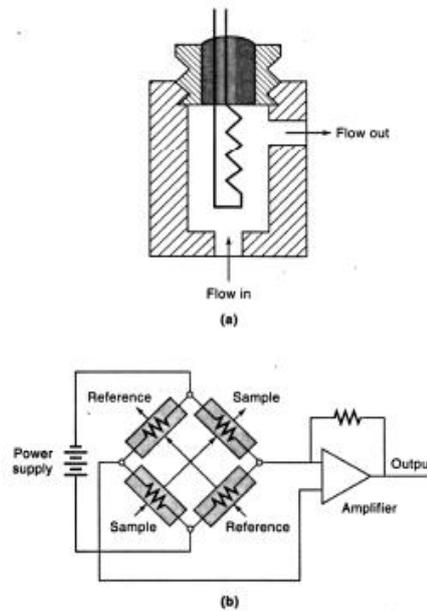


Figure V-10 : Détecteur par conductibilité thermique

b/ Détecteur par ionisation de flamme :

Le courant gazeux issu de la colonne arrive dans une flamme d'hydrogène brûlant dans l'air ou l'oxygène placé entre deux électrodes auxquelles est imposée une certaine polarisation.

Lorsque les molécules organiques sont présentes dans le gaz, la température de la flamme voisine de 2100°C est suffisante pour brûler la plupart d'entre elles. Le courant d'ion proportionnel à leur nombre est recueilli par les électrodes et transmis après amplification à l'enregistreur.

Avantages :

- C'est le détecteur le plus utilisé (non spécifique)
- Il peut déceler tous les composés combustibles (composés organiques)
- Insensibles aux molécules minérales possédant une énergie d'ionisation élevée : H_2O , CO , CO_2 , N_2
- Sensibilité trois fois plus importantes que celle du catharomètre (sensibilité diminuée avec les halogènes, NH_2 , OH , COOH , composés organiques)
- Détection des échantillons de l'ordre de ng
- Linéarité très satisfaisante jusqu'à une concentration 10^{-6} g/l.

Inconvénients : destructif et difficulté de récupération des substances.

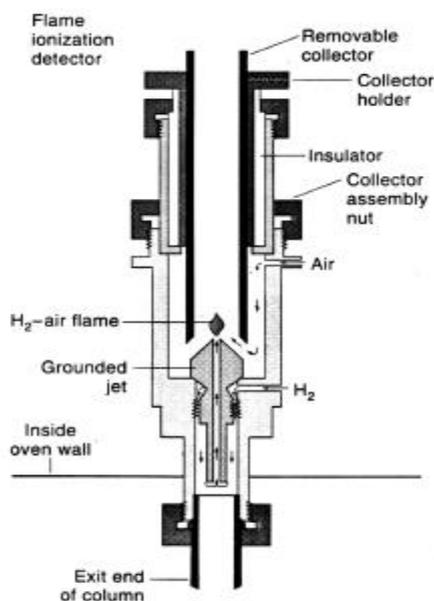


Figure V-11 : Détecteur par ionisation de flamme

c/ Détecteur thermoionique :

C'est un détecteur spécifique pour les composés organiques qui contiennent du phosphore et de l'azote, sa réponse à un atome de phosphore est 10 fois plus élevée qu'à un atome d'azote et entre 10^4 et 10^6 plus élevée qu'à un atome de carbone.

Il repose sur la variation de conductivité électrique d'une flamme d'hydrogène qui est placée en contact avec une pastille des sels de métaux alcalins.

En présence d'un seul gaz vecteur, ce sel par volatilisation émet des ions qui sont collectés par les électrodes.

Avantages : grande sensibilité 0,1pg/s ($N < X < P$; X : halogène). Cette sensibilité dépend de la nature des sels employés et des atomes présents :

Le phosphore est mieux décelé en présence de sel de césium

L'azote est mieux décelé en présence de sel de rubidium.

Inconvénients : échelle de linéarité relativement courte.

d/ Détecteur par photométrie de flamme :

Ce détecteur est construit pour répondre spécifiquement aux dérivés phosphorés ou soufrés. On y fait passer l'éluat dans une flamme d'hydrogène – air à basse température qui transforme une partie du phosphore en une espèce HPO qui émet des bandes de rayons centrés à environ 510-526 nm ; le soufre de l'échantillon est transformé en S_2 qui émet une bande de rayon à 394 nm, on utilise des filtres pour isoler ces deux bandes, et leurs intensités sont enregistrées par photométrie de flamme.

D'autres éléments peuvent être détectés comme l'azote, métaux (Cr, Se, Sn, Ge) et les halogènes.

Avantages : linéarité entre pg et ng.

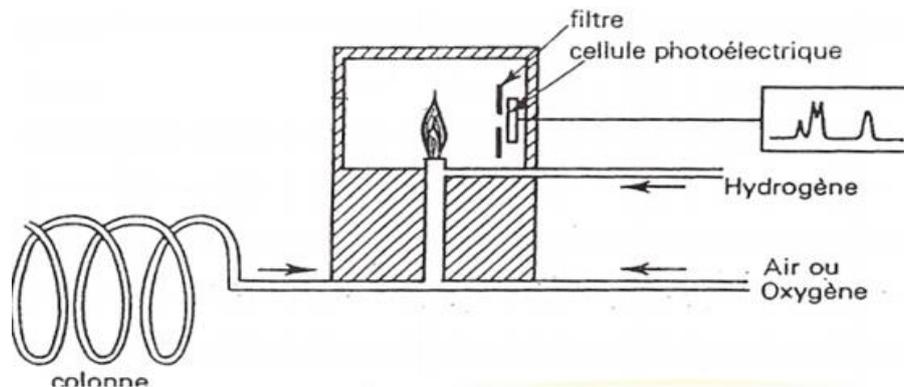


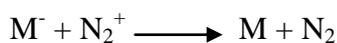
Figure V-12 : Détecteur par photométrie de flamme

e/ Détecteur à capture d'é :

Le gaz vecteur après avoir traversé la colonne, atteint le détecteur où se trouve une source ionisante émettant des électrons de forte énergie (rayon β) ce qui provoque la formation d'un ion positif et des électrons, ces derniers sont collectés par des électrodes auxquelles est appliquée une différence de potentiel, un courant (courant de base) dont l'intensité est fonction du nombre des ions produits.

Si des molécules M traversent la zone entre deux électrodes, elles captent des électrons : formation des ions plus lourds donc moins mobiles.

$$I = I_0 \exp(-KC)$$



Lorsque la phase gazeuse contient des substances électrophiles, les électrons de faible énergie sont captés donc formation des ions négatifs ou des molécules neutres.



Ces ions négatifs sont combinés avec les ions positifs du gaz pur ce qui provoque une diminution du courant à cause de la diminution du nombre d'électron.

Avantage : sensibilité élevée (10^{-12} g).

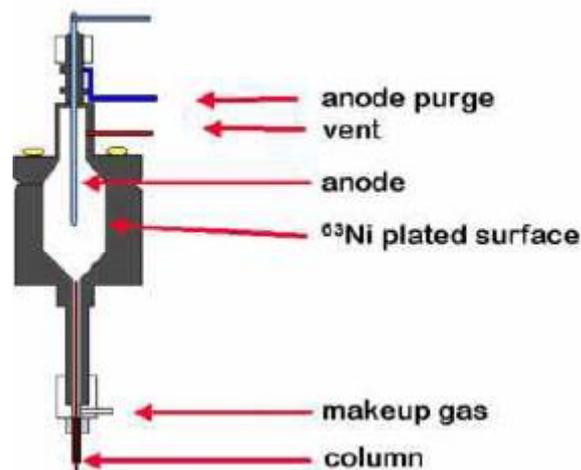


Figure V-13 : Détecteur à capture d'électron

f/ Autres détecteurs :

La CPG est souvent combinée avec des techniques sélectives de spectroscopie et d'électrochimie (CG-SM, CG-IR, etc.).

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse tandem (CG-SM/SM) est une méthode d'analyse d'une très grande sélectivité puisqu'elle associe les caractéristiques de la chromatographie qui permet de séparer les différents constituants d'un mélange à une analyse par spectrométrie de masse qui fournit une analyse élémentaire de ces constituants. Cette technique d'analyse possède plusieurs atouts :

- Possède des limites de sensibilité voisines.
- Leur association permet de disposer d'un outil analytique très performant.
- L'identification de produits est réalisable pour des quantités de l'ordre du nanogramme.
- La détection par fragmentométrie est possible jusqu'au picogramme.

V-4 Applications de la CPG

La chromatographie est un outil puissant et polyvalent pour séparer des espèces chimiques très voisines. Elle peut être utilisée aussi bien pour l'identification que pour l'analyse quantitative.

V-4-1 Identification des produits

La chromatographie est couramment utilisée pour mettre en évidence la présence ou l'absence de substances dans des mélanges. L'identification du produit se fera, à titre d'exemple, par comparaison des temps de rétention avec ceux d'un étalon.

Il est important de noter qu'un chromatogramme ne permet pas d'identifier à coup sûr toutes les espèces présentes dans un échantillon. Il permet souvent de s'assurer de l'absence d'une espèce donnée. En effet, si un échantillon ne donne pas de pic au même temps de rétention qu'un étalon injecté dans les mêmes conditions expérimentales, c'est la preuve que le composé en question est absent ou qu'il est présent à une concentration inférieure à la limite de détection du système.

Puis, le chromatogramme ne fournit qu'une information sur chaque espèce dans un mélange (le temps de rétention), l'utilisation de cette technique pour l'analyse qualitative est limitée. On a remédié à cette limitation en couplant la sortie des colonnes de chromatographie à des spectrophotomètre ultraviolet, infrarouge, de masse et de RMN. Ces appareils constituent de puissants outils pour l'identification complète des constituants dans un mélange complexe.

V-4-2 Analyse quantitative

Le détecteur en sortie de la colonne chromatographique est l'un des organes essentiels d'un chromatographe puisqu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration.

La surface du pic chromatographique, ou parfois sa hauteur, est proportionnelle à la quantité de substance éluée.

La détermination de cette surface permet de connaître, après un étalonnage préalable avec des étalons de concentration connue, la concentration de la substance dans l'échantillon injecté. Si les conditions sont soigneusement contrôlées, ces deux paramètres (la hauteur et la surface d'un pic) varient linéairement avec la concentration.

a/ Détermination de la hauteur et de la surface d'un pic :

La hauteur d'un pic s'obtient en joignant par une droite les lignes de base de part et d'autre du pic en mesurant la longueur vertical abaissée sur cette droite depuis le sommet du pic.

Le calcul de la quantité de produit à partir de cette mesure donne de bons résultats à condition que les pics ne soient pas trop larges. Dans ce cas, on préfère la méthode par mesure des aires.

L'aire des pics est indépendante des effets d'élargissement dus aux paramètres de fonctionnement (température, vitesse d'écoulement de l'éluant, injection de l'échantillon, ...). C'est pourquoi l'aire est un paramètre analytique plus satisfaisant que la hauteur.

Cette surface est déterminée de manière automatique par un intégrateur ou par un logiciel de traitement de données. On peut recourir à une estimation manuelle qui est applicable aux pics symétriques de largeur raisonnable en multipliant la hauteur du pic par sa largeur à mi-hauteur.

b/ Etalonnage externe :

La méthode la plus directe d'analyse par chromatographie consiste à préparer une série de solutions étalons (environ 6) dont la composition est proche de la solution inconnue. A partir des chromatogrammes, on mesure l'aire des pics S_A des différents étalons. Si la concentration de la solution analysée est C_A , la quantité du composé dans le volume V de solution injectée est :

$$Q_A = C_A \times V$$

Il y a proportionnalité entre l'aire du pic et les quantités injectées selon :

$$S_A = K_A Q_A = K_A \times C_A \times V$$

K_A est la constante de proportionnalité entre la concentration et la surface du pic.

On trace la courbe d'étalonnage qui reporte l'aire des pics en fonction de la concentration. La fonction obtenue doit être une droite qui passe par l'origine.

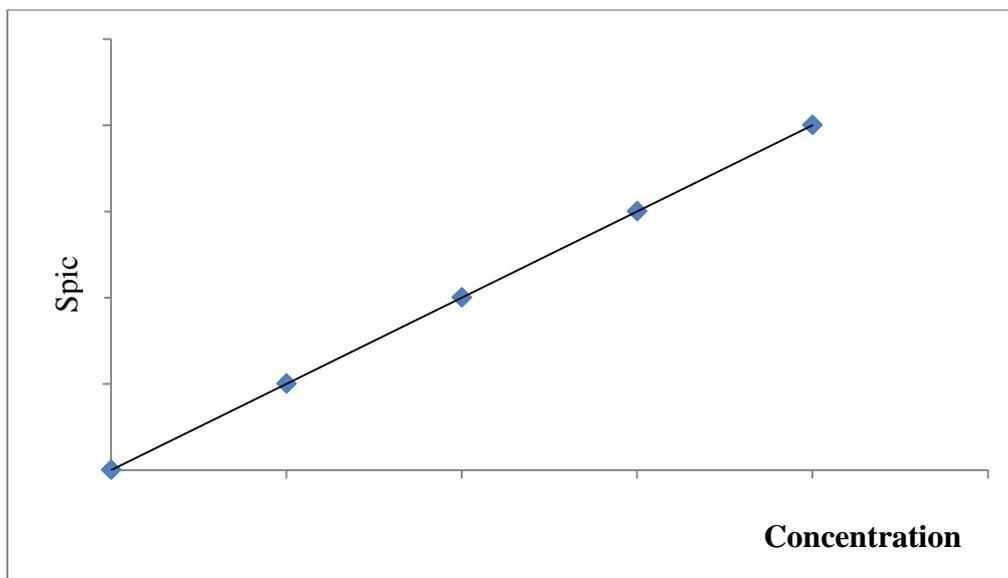


Figure V-14 : Droite de calibration

La solution à doser de concentration inconnue C_{AX} est ensuite injectée (même volume que les étalons), et à partir de la surface de son pic on en déduit sa concentration.

La source d'erreur la plus importante de cette méthode d'étalonnage est généralement liée à l'incertitude sur le volume d'échantillon injecté.

Le volume des échantillons habituellement injecté est très petit (quelques microlitres) si bien que les incertitudes relatives associées à l'injection de volumes reproductibles à l'aide d'une microsiringue peuvent être de l'ordre de plusieurs pourcent. Pour éliminer cette source d'erreur, on a recours à la méthode de l'étalon interne.

c/ Etalonnage interne :

Cette méthode consiste à introduire une quantité précise d'un étalon interne (qui est une substance non présente dans le mélange à doser et dont les grandeurs de rétention sont différentes de la substance à analyser) dans chaque solution contenant la substance à doser (échantillon et étalon).

Ce mélange se traduit par deux pics sur le tracé chromatographique : le pic de surface S_A correspondant à la substance à doser A et le pic S_{Et} correspondant à l'étalon interne.

Si la concentration de la solution à doser est C_A et celle de l'étalon interne est C_{Et} , la quantité de chacun des composés dans le volume V de solution injecté est respectivement :

$$Q_A = C_A \times V$$

$$Q_{Et} = C_{Et} \times V$$

Il y a proportionnalité entre l'aire du pic et les quantités injectées selon :

$$S_A = K_A Q_A = K_A \times C_A \times V$$

$$S_{Et} = K_{Et} Q_{Et} = K_{Et} \times C_{Et} \times V$$

K_A et K_{Et} sont les constantes de proportionnalité.

En faisant le rapport de ces deux relations, on obtient :

$$S_A / S_{Et} = K_A Q_A / K_{Et} Q_{Et} = K_A \times C_A \times V / K_{Et} \times C_{Et} \times V$$

En posant $K = K_A / K_{Et}$, on peut en déduire C_A :

$$C_A = 1/ K (C_{Et} \times S_A / S_{Et})$$

Pour déterminer la valeur de K, on effectue un étalonnage en ajoutant une quantité constante et précise de l'étalon interne dans chacun des étalons de concentrations croissants, la concentration de l'étalon interne restant constant dans tous les échantillons. Chacun des mélanges est injecté et la mesure du rapport des surfaces S_A / S_{Et} est directement proportionnelle au rapport C_A / C_{Et} avec une pente égale à K.

Exemple d'application :

Une solution de 0,0837 molaire en analyte (X) et une solution 0,0666 molaire en étalon interne (EI) donnent, sur le chromatogramme, des pics d'aires égales à 423 pour X et 347 pour EI.

On analyse un échantillon: on ajoute 10 ml de solution 0,1460 molaire en EI à 10 ml de solution d'échantillon contenant X, puis le tout est porté à 25 ml par ajout de solvant. On procède alors à l'analyse chromatographie d'une prise d'essai du mélange ainsi obtenu: les aires des pics valent 553 pour l'analyte X et 582 pour l'étalon interne EI. Calculer la concentration molaire en analyte X dans l'échantillon.

Solution

Une solution de 0,0837 molaire en analyte (X) et une solution 0,0666 molaire en étalon interne (EI) donnent, sur le chromatogramme, des pics d'aires égales à 423 pour X et 347 pour EI.

On calcule

$$423/0,0837 = 5054 \text{ d'aire par mole de X}$$

$$347/0,0666 = 5210 \text{ d'aire par mole de EI}$$

On analyse un échantillon: on ajoute 10 ml de solution 0,1460 molaire en EI à 10 ml de solution d'échantillon contenant X, puis le tout est porté à 25 ml par ajout de solvant.

Soit un dilution d'un facteur 0,4

On procède alors à l'analyse chromatographie d'une prise d'essai du mélange ainsi obtenu: les aires des pics valent 553 pour l'analyte X et 582 pour l'étalon interne EI.

$$\text{Pour x une aire de } 553 / 5054 = 0,1094 \text{ M} / 0,4 = 0,2735 \text{ M}$$

On procède alors à l'analyse chromatographie d'une prise d'essai du mélange ainsi obtenu: les aires des pics valent 553 pour l'analyte X et 582 pour l'étalon interne EI.

L'Etalon interne aurait dû donner une aire de : $0,1460 * 0,4 * 5210 = 304$ Mais ton signal te donne 582 Il faut donc corriger de $582/304 = 1,91$ C'est à cela que sert ton EI $0,2735/1,91 = 0,1432 \text{ M}$

VI- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

VI-1 Définition

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation.

L'HPLC est utilisée pour l'analyse :

- Des composés thermosensibles,
- Des composés très polaires,
- Ainsi que des composés de masse molaire élevée.

Cette technique a été mise au point vers 1967 par Huber et Huzsman. L'HPLC est une technique d'analyse qualitative, quantitative et séparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés.

Elle est principalement utilisée dans le domaine de la chimie analytique, la chimie organique, la biochimie, l'industrie agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique, cosmétique, etc.

VI-2 Avantages

- Meilleure résolution des composés
- Un temps plus court de séparation
- Une diminution des volumes de solvant nécessaires
- Une haute sensibilité.

VI-3 Principe

Ce type de chromatographie repose sur la séparation de composés dans un liquide (phase mobile) qui progresse dans un support (colonne) contenant un matériau de fine granulométrie appelée phase stationnaire. La séparation est basée sur les interactions d'un soluté vis-à-vis de la phase mobile et la phase stationnaire. Le débit d'écoulement de la phase mobile augmente ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système donc diminution du temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire.

La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants.

La solution à analyser est préparée dans un mélange similaire à celui circulant dans le système. Les solvants utilisés sont des combinaisons miscibles d'eau et de divers liquides organiques.

Une faible quantité de ce mélange est introduit dans une boucle d'injection. Cette dernière est reliée dans l'injecteur au reste du système, provoquant le passage des molécules jusqu'en tête de colonne chromatographique.

Cette colonne remplie d'une phase stationnaire qui permettra de séparer les molécules chimiques en fonction de certaines de leurs propriétés respectives (taille, polarité, hydrophile, affinité, etc.). Les molécules sortiront ainsi de la colonne aux différents temps appelés temps de rétention, et seront détectés par le détecteur.

VI-4 Les différents éléments constitutifs d'un système HPLC

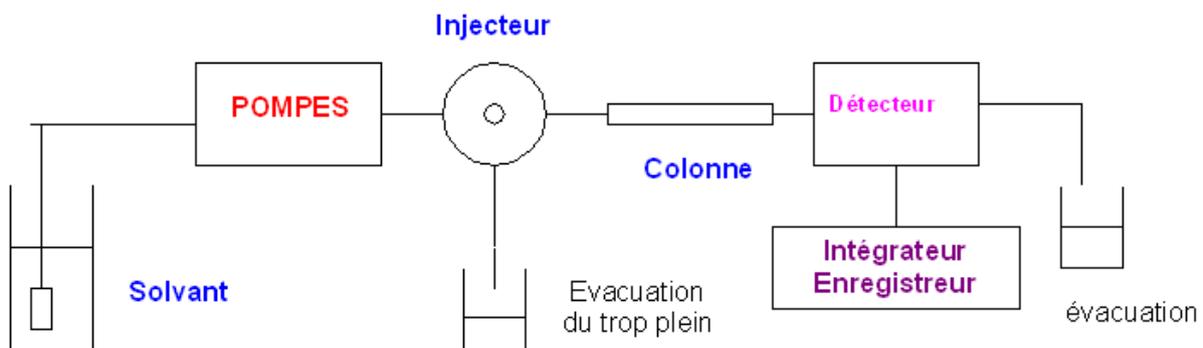


Figure VI-1 : Système de l'HPLC

VI-4-1 Phase mobile

Contrairement à la CPG où la nature du gaz est peu importante pour la séparation des composés (interaction soluté-phase stationnaire), en HPLC, la séparation des composés se fait par des interactions avec la phase mobile et avec la phase stationnaire.

De nombreux solvants sont disponibles, mais seuls quelques uns pourront être utilisés.

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire dite normale ou à polarité inversée, se répercute sur les temps de rétention des solutés.

La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations :

- Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire : c'est-à-dire chromatographie à phase normale (phase mobile : hexane, CHCl_3 , éther ou des associations de ces solvants).

- Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire, on parle de chromatographie à phase inverse (phase mobile : éthanol, acétonitrile, THF).

VI-4-2 Réservoir de solvant

Les appareils sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs en verre ou parfois en acier inoxydable de capacité 1 litre, ce qui permet de réaliser un nombre important d'analyse sans interruption. Ces réservoirs sont souvent étanches afin d'éviter l'évaporation des solvants (et la modification de la composition du mélange) ou leur contamination.

Ils peuvent être équipés de dispositif de dégazage (barbotage d'hélium ou mise sous vide) permettant d'éliminer les gaz dissous et en particulier l'oxygène.

VI-4-3 Pompes

La pompe d'un chromatographe a pour rôle d'assurer l'écoulement de la phase mobile dans la colonne.

Ces pompes doivent être très puissantes, car la viscosité des solvants et la granulométrie très fine des phases stationnaires entraînent des différences de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne.

La pression à imposer dépend des facteurs suivants :

- débit de la phase mobile
- viscosité de l'éluant
- taille des grains de la phase stationnaire
- géométrie de la colonne

Les pompes doivent répondre aux exigences suivantes :

- fournir des pressions élevées jusqu'à 400 bars
- débit stable, non pulsé et réglable de 0,1 à 10 mL/min avec un contrôle meilleur que 0,5 %
- résistance à la corrosion quelque soit le solvant utilisé.

Pour des débits standard (0,1 à 10 mL/min), on utilise des pompes débitométriques conçues pour maintenir un débit stable et non pulsé, on utilise pour cela deux pistons de tailles ou de courses différentes. Un des pistons situé en amont a un volume deux fois plus important que l'autre situé en aval.

Pendant que le gros piston amont refoule, il remplit le petit piston aval. Pendant qu'il aspire, le petit piston refoule à son tour et le débit est donc maintenu constant (figure VI-2).

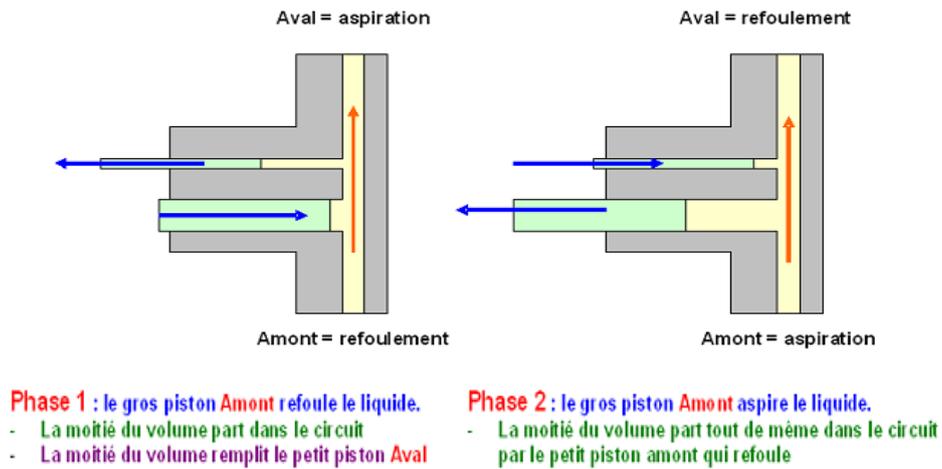


Figure VI-2 : Principe de la pompe en HPLC

Il existe deux modes de fonctionnement :

- Le mode isocratique pour lequel la composition de la phase mobile est fixe.
- Le mode gradient de solvant pour lequel on fait varier le solvant au cours de la séparation en vue d'améliorer les séparations et surtout de raccourcir les temps d'analyse.

Les gradients de solvant nécessitent des pompes particulières permettant de faire varier la composition du mélange éluant.

VI-4-4 Injecteurs

L'injection doit se faire en un temps très bref afin de ne pas perturber le régime d'écoulement dans la colonne et détecteur.

La difficulté consiste à introduire en tête de colonne, sans stopper la circulation de la phase mobile, un volume précis d'échantillon. Là où la pression dépasse souvent 10000 kPas.

Pour cela, on utilise une vanne haute pression à plusieurs voies : vanne à boucle d'injection (figure VI-3).

Le principe de fonctionnement de ces vannes est le suivant :

L'échantillon est introduit avec une seringue à la pression atmosphérique dans la boucle, puis il est mis en communication, par rotation de la vanne, avec la phase mobile et la colonne. Ce système évite les brusques variations de pression dans l'appareil et est d'une grande reproductibilité car il y a peu d'irrégularité dans les injections, étant donné que la quantité introduite est obligatoirement celle du volume de la boucle.

Les volumes injectés sont fixés par la capacité de la boucle qui a des volumes variables allant de μL ou mL .

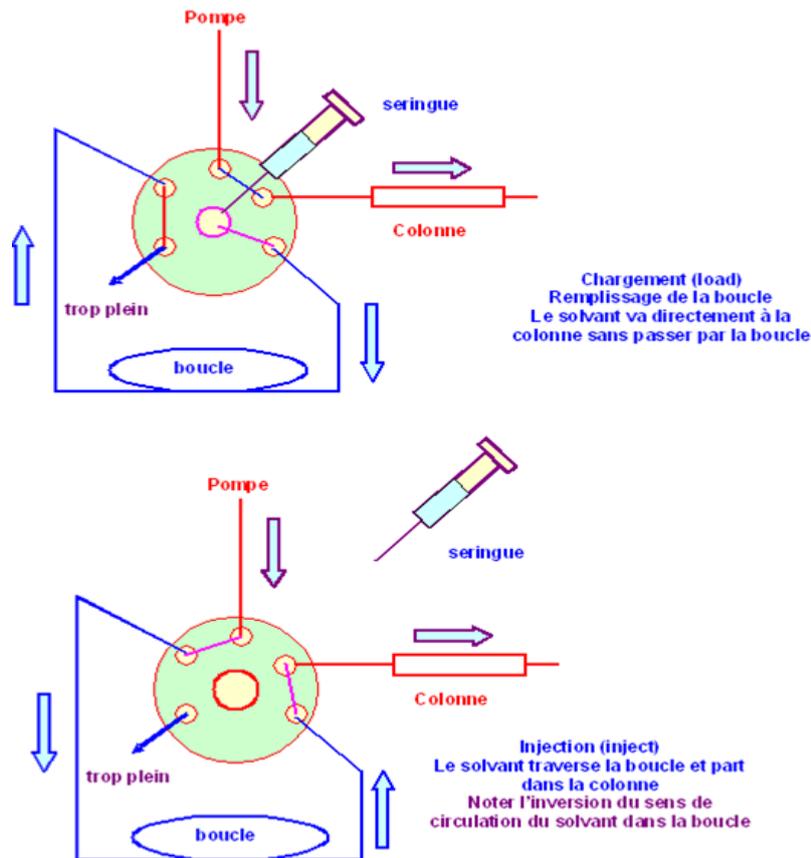


Figure VI-3 : Schéma de principe d'un injecteur à boucle

VI-4-5 Colonnes

Les colonnes d'HPLC sont généralement courtes et droites en acier inoxydable. La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 25 cm et un diamètre de 4 à 5 mm. Ces colonnes sont remplies de phase stationnaire, maintenue entre deux disques poreux situés aux extrémités et dont la taille des particules varie de 5 à 10 μm . Ce type de colonne offre souvent de 40000 à 60000 plateaux par mètre. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques ml/min.

La colonne est souvent précédée d'une pré-colonne remplie de la même phase stationnaire très courte (0,5 à 1 cm). Le rôle de la pré-colonne est de fixer les composés dont l'affinité avec la phase stationnaire est trop élevée et qui ne migrent pas dans les conditions utilisées. La pré-colonne est changée périodiquement.

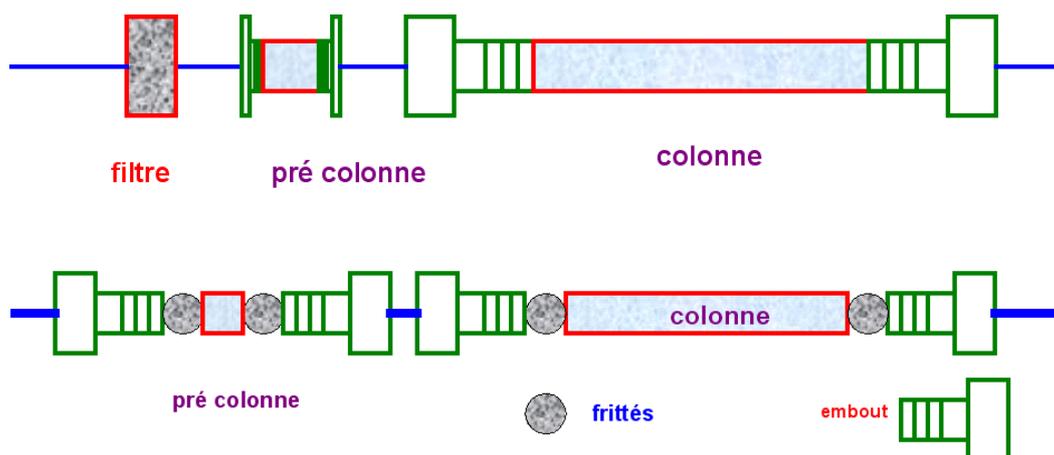
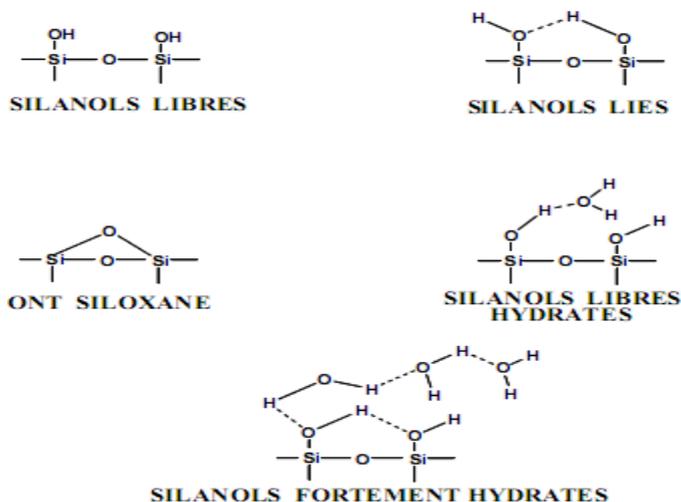


Figure VI-4 : Colonne et pré-colonne d'une HPLC

VI-4-6 Phase stationnaire

a/ Phase normale :

La phase normale la plus utilisée est à base de silice, à sa surface se trouvent des groupements silanols (Si-OH) et des groupements siloxanes (-O-). Ces groupements permettent à la silice de retenir les composés à analyser par des liaisons H. L'inconvénient d'une telle phase, c'est sa détérioration rapide au cours du temps, donc manque de reproductibilité des séparations.



Les principaux greffons utilisés en phase normale comportent des fonctions de nature polaire :

- Amine NH₂
- Nitrile : CN
- Diols : CH₂ – CHOH – CH₂OH

Les gels de silice couramment utilisés en HPLC sont constitués de particules sphériques de 2 à 5 µm de diamètre, la surface spécifique est d'environ 350 m²/g avec des pores de 10 nm.

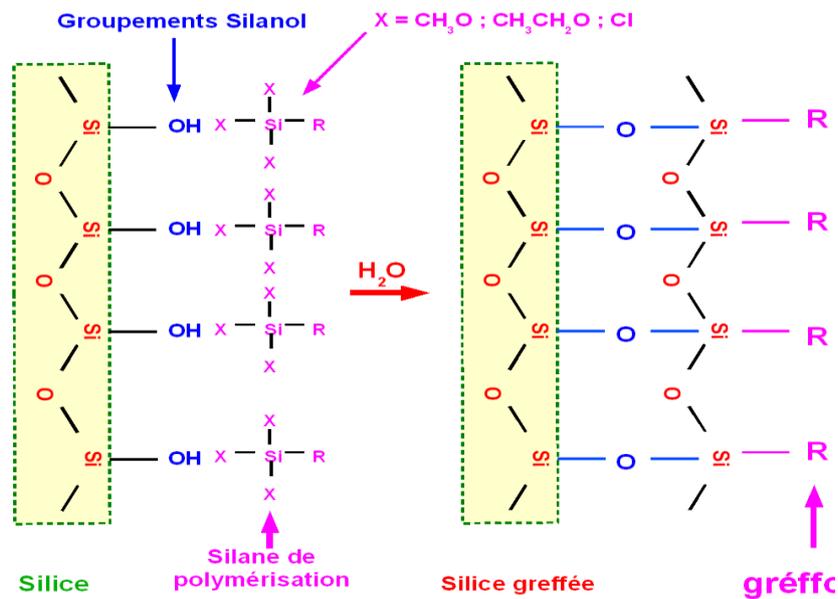
b/ Phase inverse :

La phase inverse est composée de silice greffée par des chaînes linaires de 8 à 18 atomes de carbones ; ces atomes sont greffés au niveau des groupements silanols (Si-OH).

Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (acétonitrile, eau, méthanol). Dans ce cas, se sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Les principaux greffons utilisés en phase inverse comportent des fonctions de nature apolaire :

- groupes alkyle ou aryle : R = $-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$ RP-8 (diméthyl-octylsilane)
- R = $-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ RP-18 (diméthyl-octadécylsilane)
- R = $-(\text{CH}_2)_n-\text{Ph}$...



Le groupement R représente la fonction greffée : R = C_8H_{17} , $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, C_6H_5 , etc.

Remarque :

Il existe également d'autres phases non plus à base de silice, mais de graphite, de polystyrène/divinylbenzène ou hydroxyméthylstyrène non greffés.

VI-4-7 Détecteurs

En HPLC, il n'existe pas de détecteurs universels aussi sensibles que ceux utilisés en CPG, mais des détecteurs spécifiques de grande sensibilité (qui dépendent de la nature de l'échantillon).

Un détecteur doit réunir un certain nombre de qualité :

- Etre sensible
- Avoir un bruit de fond négligeable
- Avoir une réponse indépendante des variations des paramètres d'utilisation (pression, température, débit, composition de la phase mobile, etc.)

- Avoir un aspect non destructif de l'échantillon
- Avoir une bonne stabilité au cours du temps
- Avoir une bonne sélectivité
- Avoir une grande vitesse de réponse

Il existe un grand nombre de système de détection pouvant être associé à un système HPLC.

a/ Détecteur UV Visible :

Ce détecteur mesure l'absorption de la lumière UV ou visible par le composé à la sortie de la colonne. Pour que ce détecteur soit utilisable, il faut :

- Que le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible par l'appareil
- La phase mobile n'absorbe pas à la longueur d'onde choisie

Avantages :

- Facilité d'utilisation
- Peu sensible aux variations de température et de débit
- Non destructif de l'échantillon
- Haute sensibilité.

b/ Détecteur à indice de réfraction :

Un faisceau lumineux passe à travers une cellule comportant deux compartiments dont l'un est rempli avec la phase mobile seule (cellule de référence) et l'autre avec l'éluant en sortie de colonne. La différence d'indice entre les deux liquides qui apparaît lorsqu'un composé est mélangé à l'éluant se traduit par un déplacement angulaire du rayon réfracté.

Ce type de détecteur est utilisé pour les composés suivants : sucres, alcools, lipides, polymères, etc.

Avantages :

- Une réponse quasi universelle ; il détecte tout ce qui se trouve en solution, sauf le composé qui aurait le même indice de réfraction que la phase mobile
- Utilisation facile et aisée.

Inconvénients :

- Faible sensibilité
- Non sélectif

- Sensible aux changements des conditions expérimentales (débit, température, viscosité)
- Inadéquat dans le cas d'une élution qu'en mode isocratique.

c/ Détecteur à fluorescence :

A lieu lorsqu'une molécule absorbe de la lumière, atteignant ainsi un niveau d'énergie plus élevé (excitation). Quand la molécule retourne à son état énergétique initial, l'énergie perdue est re-émise sous forme de lumière (émission), la molécule fluoresce.

Avantages :

- Sensibilité élevée (10 à 1000 fois supérieure à la détection UV Visible)
- Bonne sélectivité
- Facile à utiliser
- Non destructif de l'échantillon.

Inconvénients :

- Nombre limité de coup fluorescent
- Reproductibilité faible.

VII- INFORMATIONS APPORTEES PAR LE TRACE CHROMATOGRAPHIQUE

VII-1 Grandeurs fondamentales

Elles sont obtenues à partir de grandeurs aisément mesurables sur le tracé chromatographique.

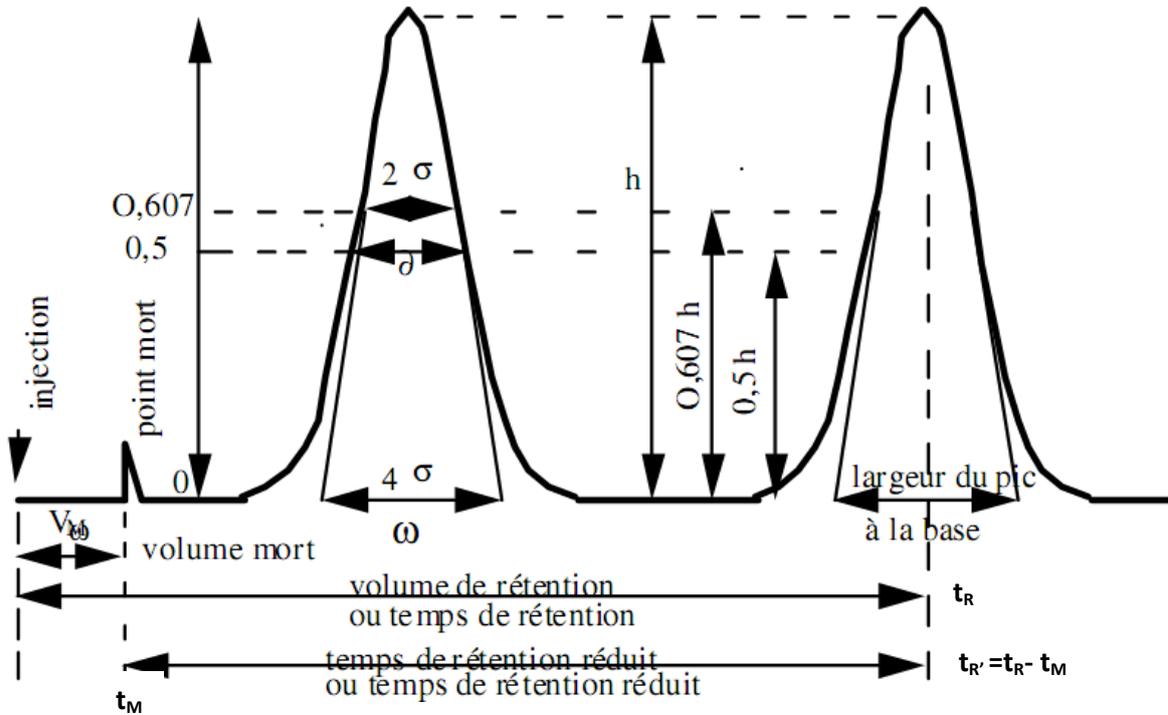


Figure VII-1 : Principaux paramètres d'un chromatogramme

σ^2 représente la variance du pic pour un pic supposé idéal

ω : largeur du pic à la base

δ : largeur du pic à mi-hauteur

$$\omega = 4\sigma$$

$$\omega = 1,7\delta$$

$$\delta = 2,351\sigma$$

VII-1-1 Grandeurs de rétention

Plusieurs paramètres permettent de rendre compte de la rétention d'un soluté sur une colonne : grandeurs de rétention (temps de rétention, volume de rétention et facteur de rétention), toutes ces expressions sont liées au coefficient de distribution du soluté dans la phase mobile et la phase stationnaire.

VII-1-1-1 Temps de rétention

La vitesse de déroulement de l'enregistreur étant constante, la mesure de la distance permet de connaître le temps écoulé entre l'introduction du soluté dans la colonne et le moment où il en sort à la concentration maximale, ce temps est appelé temps de rétention « t_r ».

L'éluant non retenu par la phase stationnaire sort beaucoup plus rapidement et le temps nécessaire pour qu'il arrive au détecteur est le temps mort « t_0 ou t_M » (dû au parcours des espaces interstitiels et aux volumes morts des différentes parties de l'appareillage).

La sortie de l'éluant est détectée par un signal ou un pic qui souvent est considéré comme l'origine de départ à partir duquel est mesuré un temps de rétention réduit « t_r' ».

$$t_r' = t_r - t_0 \quad (\text{VII-1})$$

t_0 : est le temps nécessaire pour qu'une espèce non retenue traverse une colonne.

t_r : est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition d'un pic de soluté sur le détecteur d'une colonne chromatographique.

Si la vitesse de déplacement d'un soluté est v , on a :

$$v = \frac{L}{t_r} \quad (\text{VII-2})$$

La vitesse de déplacement des molécules de la phase mobile U :

$$U = \frac{L}{t_0} \quad (\text{VII-3})$$

L : longueur de la colonne

VII-1-1-2 Volume de rétention

Il est possible de déduire du temps, le volume de la phase mobile nécessaire pour amener la substance à sa concentration maximale dans le détecteur, c'est le volume de rétention « V_r » :

$$V_r = t_r D \quad (\text{VII-4})$$

D : débit de la phase mobile (mL/min)

V_r : est le volume de la phase mobile nécessaire pour faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne un soluté donné, c'est-à-dire le volume entre l'injection et le maximum du pic.

✓ Volume d'un pic :

Est le volume de la phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de la colonne.

$$V_{\text{pic}} = \omega D \quad (\text{VII-5})$$

✓ Volume de la phase stationnaire :

Le volume de la colonne « V_C » est occupé par la phase stationnaire de volume V_S et celui de la phase mobile V_0 « ou V_M ».

Le volume de la phase stationnaire n'apparaît pas sur le chromatogramme, il est égale au volume total de la colonne vide moins le volume mort.

$$V_{TCV} = V_{\emptyset s} + V_0$$

$$\xrightarrow{V_{\emptyset s}} V_{TCV} - V_0 \quad (\text{VII-6})$$

✓ Volume de la phase mobile :

Il correspond au volume interstitiel accessible.

$$V_0 = t_0 D \quad (\text{VII-7})$$

$$V_0 = V_i + V_p \quad (\text{VII-8})$$

V_i : volume interstitiel situé entre les particules de la phase stationnaire (volume inter granulaire)

V_p : volume poreux de la phase stationnaire accessible à la phase mobile.

Si la phase stationnaire est un polymère : $V_p = 0$ (phénomène du gonflement)

$$\text{La porosité } \zeta \text{ égale à : } \zeta = \frac{V_0}{V_C} = \frac{V_i + V_p}{V_C} \quad (\text{VII-9})$$

Si la phase stationnaire est un polymère ou échangeur d'ion, $\zeta = 0.35$ à 0.4

Si la phase stationnaire est un gel de silice, $\zeta = 0.7$ à 0.8 (particule poreuse).

Le débit d'écoulement de la phase mobile « D » est égale :

$$D = U S = U s \zeta$$

s : section réduite de la colonne

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

S : section normale de la colonne

$$D = \frac{U \pi d c^2 \zeta}{4} \quad (\text{VII-10})$$

$d c$: diamètre de la colonne

$$t_0 = \frac{L}{U} \iff U = \frac{L}{t_0}$$

$$\text{donc } \zeta = \frac{4D}{U \pi d c^2}$$

$$\iff \zeta = \frac{4D t_0}{L \pi d c^2} \quad (\text{VII-11})$$

$\zeta > 1$: le soluté supposé non retenu est retenu

$\zeta \ll 0.7$: le soluté non retenu et est exclu des pores de la phase stationnaire.

➤ Vitesse de déplacement des solutés v :

Le pouvoir séparateur d'une colonne dépend principalement des vitesses relatives d'élution, ces vitesses sont-elles même déterminées par le coefficient de distribution entre les deux phases.

$v = U$. Fraction du temps passé par le soluté dans la phase mobile

$$v = U \cdot \frac{Q\varphi m}{Q\varphi t} = U \cdot \frac{C_m \cdot V_m}{C_m \cdot V_m + C_s \cdot V_s} = U \cdot \frac{1}{1 + (C_s V_s / C_m V_m)}$$

$$v = U \cdot \frac{1}{1 + K(V_s/V_m)} \quad (\text{VII-12})$$

VII-1-1-3 Facteur de rétention (facteur de capacité)

Le facteur de capacité ou de rétention k' est le paramètre le plus important en chromatographie, il définit le comportement d'une colonne, il renseigne sur la capacité d'une colonne à retenir chaque composé (et non pas sur la quantité saturée de la phase stationnaire).

Le facteur de capacité est le rapport entre la quantité du soluté se trouvant dans la phase stationnaire et celle se trouvant dans la phase mobile.

$$k' = \frac{Q_s}{Q_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m} = K/\beta \quad (\text{VII-13})$$

β : dépend des caractéristiques physique de la colonne (diamètre, épaisseur du film liquide, longueur).

Pour montrer comment k' peut être obtenu à partir d'un chromatogramme, on a (à partir de l'équation VII-12) :

$$v = U \frac{1}{1 + k'}$$

$$\frac{L}{t_r} = \frac{L}{t_0} \cdot \frac{1}{1 + k'}$$

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} = \frac{V_r - V_0}{V_0} \quad (\text{VII-14})$$

k' est indépendant du débit et de la longueur de la colonne, il varie avec les conditions opératoires.

k' élevé $\implies t_r$ élevé

$k' \ll 1$: l'élution est rapide, donc il est difficile de déterminer t_r .

$k' = 20 - 30$: l'élution est longue

k' optimal varie entre 1 et 5

Remarque :

- En chromatographie à phase gazeuse, pour améliorer les valeurs de k' , il faut jouer sur la température et le remplissage de la colonne.
- En chromatographie liquide, il faut modifier la composition chimique de la phase mobile et la phase stationnaire.

VII-1-2 Coefficient de distribution (constante de Nernst)

La distribution d'un soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile, lorsque les concentrations ne sont pas trop importantes (c'est-à-dire lorsque la phase stationnaire n'est pas saturée) est supposée être régulière et indépendante des quantités des substances présentes.

Toutes les séparations chromatographiques sont basées sur les différences de répartition des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire ; pour un soluté A, cet équilibre est décrit par l'équation : $A_m \rightleftharpoons A_s$

La constante d'équilibre K est appelée rapport de distribution ou coefficient de distribution, il est défini par la relation :

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (\text{VII-15})$$

C_s : concentration du soluté dans la phase stationnaire,

C_m : concentration du soluté dans la phase mobile.

Remarque :

- L'appellation du coefficient de distribution « K » varie selon le type de la chromatographie :
 - Dans le cas d'une chromatographie gazeuse et chromatographie liquide, le coefficient de distribution K , est le coefficient de partage.
 - Dans la chromatographie sur gel, K est le coefficient de diffusion
 - Dans la chromatographie d'adsorption, K est le coefficient d'adsorption

- Dans une chromatographie gazeuse, K est élevé (égale à 100), lorsque K est faible (égale à 2), les deux phases sont condensées, c'est-à-dire les composés sont présents dans un espace limité de la colonne à une concentration variable en chaque point, les vraies valeurs de C_m et C_s ne sont pas accessibles (en chaque point) mais leur rapport est constant.

a/ Le pic est symétrique si la distribution du soluté entre les deux phases s'effectue d'une manière régulière : $K = C_s/C_m$ d'où $C_s = K C_m$.

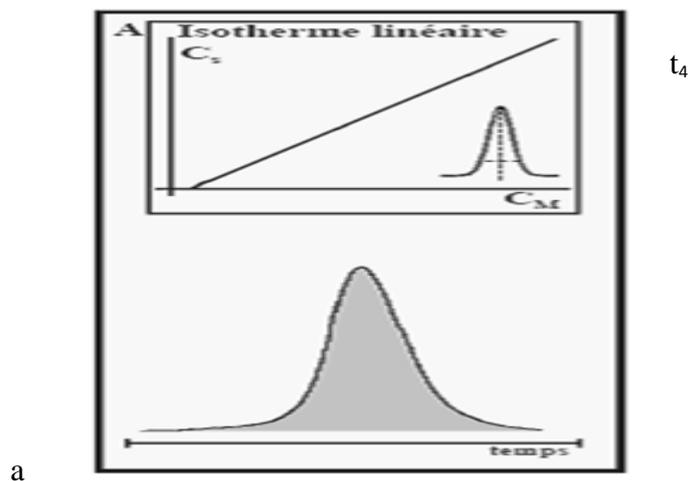
La vitesse de déplacement de la substance est la même en tout point de la colonne, quel que soit leur concentration (figure VII-2a).

b/ En réalité la distribution n'est jamais régulière, surtout lorsque le phénomène d'adsorption où les quantités de solutés sont très importantes, les isothermes de distribution ne sont pas linéaire, mais varient en fonction de la concentration selon la loi de Freundlich :

$$C_s = K C_m^\alpha$$

$\alpha < 1$: les points de chromatogramme, où les concentrations sont élevées, migrent plus rapide que ceux où la concentration est plus faible (phase stationnaire saturée) : la montée du pic est plus rapide que la partie descendante (figure VII-2b).

$\alpha > 1$: le soluté est très retenu par la phase stationnaire saturée : le temps de rétention est élevé (figure VII-2c).



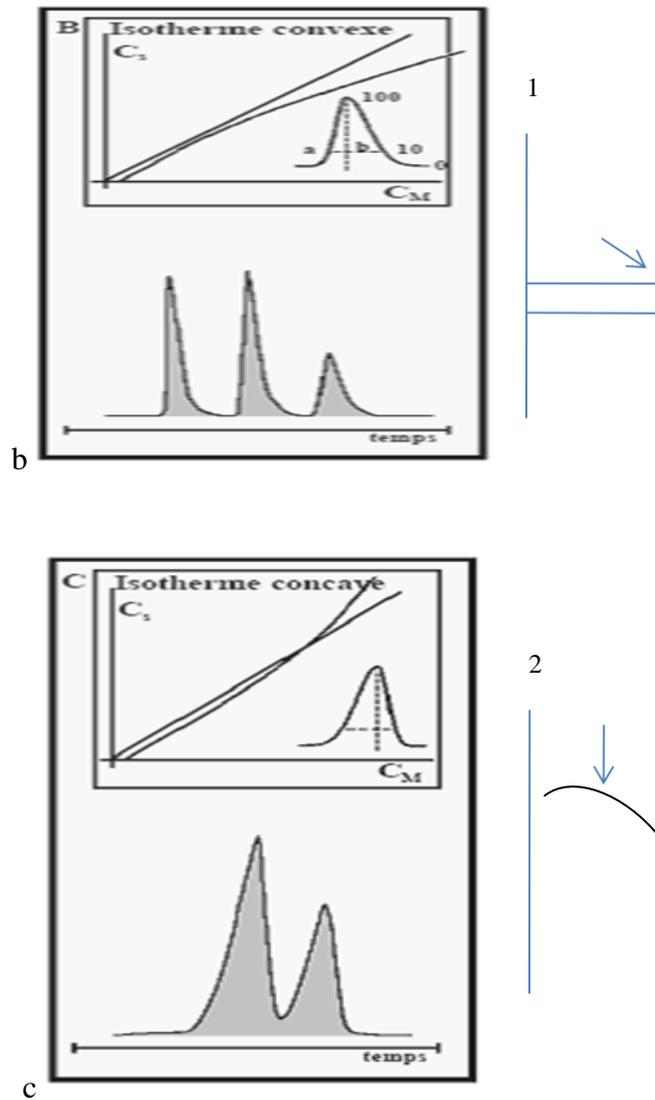


Figure VII-2 :Isothermes de distribution

VII-1-3 Facteur de sélectivité (Facteur de séparation)

Le facteur de séparation « α » permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents sur un chromatogramme.

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_M}{t_{r1} - t_M} = \frac{t_{r2}'}{t_{r1}'} = \frac{K_2}{K_1} \quad (\text{VII-16})$$

2 : l'espèce la plus retenue (tr élevé) donc : $\alpha \geq 1$

$$\ln \alpha = \ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta(\Delta G^\circ)}{RT} \quad (\text{VII-17})$$

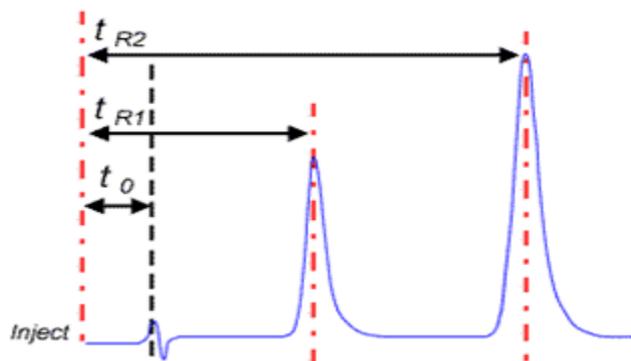


Figure VII-3 : Facteur de séparation entre deux composés adjacents

VII-1-4 Résolution d'une colonne

Ce paramètre donne une mesure quantitative de l'aptitude d'une colonne à séparer deux solutés. La signification de ce terme est illustrée dans les figures VII-4 ci-dessous qui représentent deux espèces A et B sur trois colonnes qui ont des degrés de résolutions différents :

$R_s = 1.5$: permet la séparation pratiquement complète de A et B (le chevauchement entre les pics est 0.3%), ce qui n'est pas le cas d'une résolution $R_s = 0.75$. $R_s = 1$, le pic A contient environ 4% de B et vice versa.

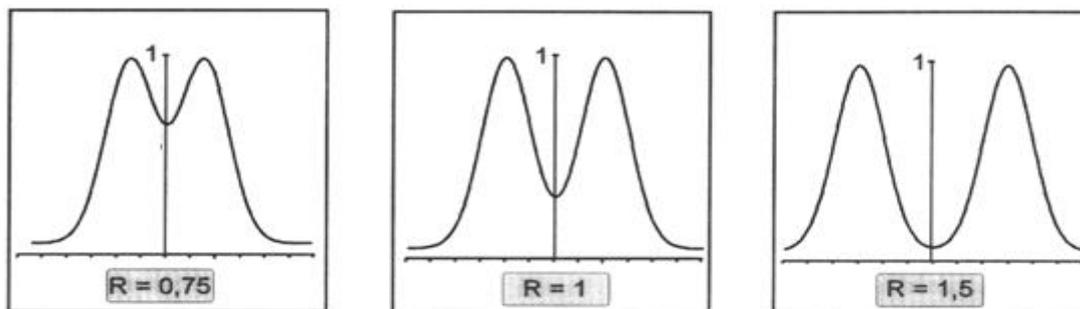


Figure VII-4 :Facteur de résolution

Pour une phase stationnaire donnée, et afin d'améliorer les valeurs de R_s , on joue sur la longueur de la colonne, la hauteur équivalente à un plateau théorique « H », le diamètre des particules de la phase stationnaire, etc.

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{\omega_1 + \omega_2} = \frac{1.177(t_{r2} - t_{r1})}{\delta_1 + \delta_2} \quad (\text{VII-18})$$

2 : est l'espèce la plus retenue.

➤ **Effet de la résolution sur le temps de rétention :**

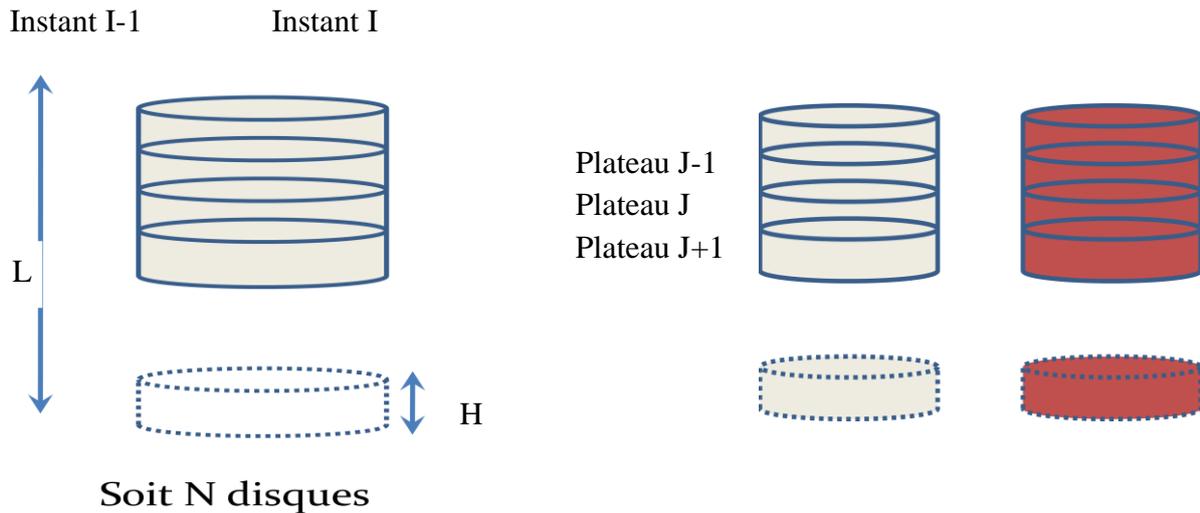
Le but de la chromatographie est d'obtenir une meilleure résolution possible en un minimum de temps ; toutefois, ces deux objectifs sont généralement incompatibles et un compromis entre les deux doit être trouvé, le temps de rétention « t_{rB} » requis pour éluer les deux espèces avec une résolution « R_s » est donné par l'expression suivante :

$$t_{rB} = \frac{16 R_s^2 H}{U} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^3 \quad (\text{VII-19})$$

U : vitesse de la phase mobile

VII-1-5 Plateaux théoriques

La chromatographie est un phénomène continu, mais pour la commodité du raisonnement, elle peut être représentée comme une succession de phénomènes discontinus en indiquant que la colonne est constituée par la superposition successive de petits volumes cylindriques v de même hauteur dx numérotés de 0 à N.



H : la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT).

Figure VII-5 : Modèle des plateaux théoriques

Chaque soluté se déplace progressivement en une suite d'étape distinguée. A chaque étape, les équilibres précédents sont rompus et des nouveaux s'établissent, la phase mobile s'enrichit lorsqu'elle est en contact avec une phase stationnaire chargée en substance ou au contraire s'appauvrit dans le cas inverse de tel sorte que la constante d'équilibre soit toujours respecté.

Adsorption → désorption → déplacement en même temps

➤ Calcul du nombre de plateaux théoriques :

Le nombre de plateaux théoriques « N » permet de comparer entre elles, les caractéristiques des différentes colonnes dans les mêmes conditions opératoires (même phase stationnaire, même soluté, etc.).

La valeur de la hauteur équivalente à un plateau théorique est liée non seulement à la longueur de la colonne L mais à la variance du pic σ^2 : $\sigma^2 = L.H$

$$H = \sigma^2 / L ; N = L^2 / \sigma^2$$

$$\text{Donc } N = L/H \quad (\text{I-20})$$

HEPT n'a les dimensions d'une hauteur que dans la théorie des plateaux. Il est également possible de l'exprimer en fonction de V_r , t_r ou d_r :

$$H = (V_r / N) = (t_r / N) = (d_r / N)$$

N : est l'efficacité de la colonne ou le nombre de plateaux théoriques.

Remarque :

- HEPT dépend de la nature du soluté et des conditions opératoires,
- HEPT est faible pour les petites particules, faible débit, faible viscosité de la phase mobile, température élevée, etc.
- Une colonne est d'autant plus efficace, que la hauteur de plateaux théoriques et donc σ ou ω faible.

VII-1-6 Efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement d'un pic, est mesurée pour chaque composé par le nombre de plateau théorique « N » contenu dans la colonne.

Elle caractérise l'aptitude d'une colonne à fournir des pics étroits qui permettent une bonne séparation des différents solutés.

Après un certain parcours dans la colonne, les pics d'élution sont assimilés à des courbes de Gauss dont l'écart type σ (exprimé en unité de temps) est lié au nombre de plateaux théoriques par la relation $\sigma^2 = t_r^2 / N$ (VII-21)

Pour une courbe gaussienne, la largeur du pic ω , à une ordonnée déterminée, est liée à la variance σ^2 par la relation : $\omega^2 = a \sigma^2$ (VII-22)

a dépend de la hauteur par rapport à la ligne de base où est mesurée ω

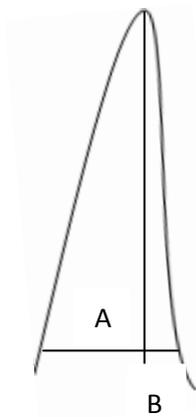
à partir des équations VII-21 et VII-22, on a : $N = a (t_r/\omega)^2$

$$\omega = 4 \sigma \text{ donc } N = 16 (t_r/\omega)^2 \quad (\text{VII-23})$$

t_r et ω doivent être exprimés dans les mêmes unités, ils sont mesurés directement sur le chromatogramme.

$$\text{D'autre part, nous avons } \delta = 2.354 \sigma, \text{ d'où : } N = 5.54 (t_r/\delta)^2 \quad (\text{VII-24})$$

Les deux relations précédentes sont utilisées si le pic est parfaitement gaussien ; dans le cas inverse, pour calculer N, on utilise la relation de Foley et Dorsey qui permet de calculer N à partir du temps de rétention, de la largeur à 10% de la hauteur du pic ($\omega_{0.1}$) et du facteur d'asymétrie défini empiriquement par le rapport A/B :



$$N = \frac{41.7 \left(\frac{t_r}{\omega_{0.1}} \right)^2}{\left(\frac{A}{B} + 1.25 \right)} \quad (\text{VII-25})$$

➤ Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

Pour comparer les performances de colonnes de conception différente vis-à-vis du même composé (CPG : colonne capillaire et colonne remplie), on remplace le temps de rétention par le temps de rétention réduit :

$$N_{\text{eff}} = (t_r'/\sigma)^2 = 16 (t_r'/\omega)^2 = 5.54 (t_r'/\delta)^2 \quad (\text{VII-26})$$

VII-1-7 Optimisation de la séparation

Une bonne séparation implique une bonne résolution des pics en un minimum du temps (R_s élevé, t_r faible).

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1+k'} \right) \quad (\text{VII-27})$$

Cette équation guide le choix des conditions qui conduit au degré de résolution souhaité en un minimum du temps.

a) Optimisation de N (donc de H)

$$N = L/H$$

$$R_s \propto \sqrt{N}$$

N est élevé donc L élevé (cependant L élevé implique tr élevé: effet indésirable)

Pour augmenter N, il faut diminuer H c'est-à-dire diminuer le diamètre des particules de la phase stationnaire, le diamètre de la colonne, la température (dans le cas de la CPG) et la vitesse de la phase mobile.

$$v = \frac{U dp}{D_m} \iff U = \frac{v D_m}{dp} \quad (\text{VII-28})$$

v : vitesse de déplacement du soluté (cm/s)

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

D_m : coefficient de diffusion moléculaire

dp : diamètre des particules de la phase stationnaire (µm)

$$U \uparrow \iff dp \downarrow ; D_m \uparrow \iff \eta \downarrow \iff tr \downarrow (\eta = \frac{1}{D_m})$$

η: viscosité de la phase mobile (pas .s)

Tableau VII-1: Valeurs de la vitesse de la phase mobile en fonction du diamètre des particules de la phase stationnaire et le coefficient de diffusion moléculaire

	Vitesse optimale de la phase mobile « U »			
dp/D_m	20	10	5	3
n propanol (0.3×10^{-9})	0.045	0.09	0.18	0.3
Eau (10^{-9})	0.15	0.3	0.6	1
Hexane (3×10^{-9})	0.45	0.9	1.8	3

➤ *Diamètre des particules*

$$H_{min} = h_{min} \times dp$$

$$dp_{optimal} = 5 \mu m$$

$$dp > 20 \mu m \iff \text{efficacité} \downarrow, tr \uparrow$$

$$dp < 5 \mu m \iff \text{difficulté de remplissage, donc : perte de charge } (\Delta p \uparrow)$$

$$(\Delta p = f(\frac{1}{dp^2}))$$

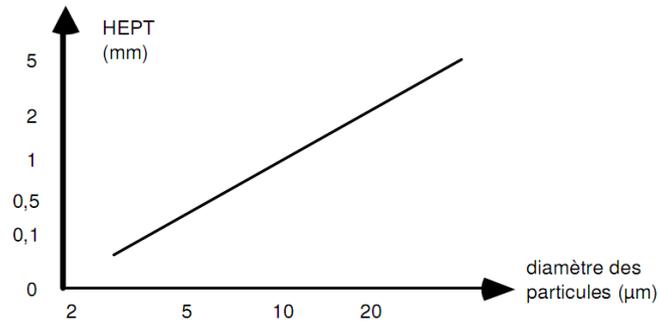


Figure VII-6 : Variation de HEPT en fonction du diamètre des particules de la phase stationnaire

La figure VII-6 ci-dessus illustre le gain d'efficacité quand on passe d'une silice avec $d_p = 20\mu\text{m}$ à $d_p = 3\mu\text{m}$. Le remplissage de la colonne avec des phases stationnaires de fine granulométrie entraîne une augmentation de l'efficacité, donc de la résolution.

➤ *Caractéristiques de la colonne*

Si le remplissage de la colonne est parfait, H ne dépend pas de L.

Pour $d_p = 5\text{-}10\ \mu\text{m}$, le remplissage est parfait si $L = 50\ \text{cm}$.

Tableau VII-2 : Variation de la HEPT pour la phénothiazine I en fonction de la longueur de la colonne (L), de diamètre des particules de la phase stationnaire (d_p) et du diamètre de la colonne.

Diamètre de la colonne 21 mm	HEPT (mm)		Longueur de la colonne : L=15 cm Diamètre des particules de la silice : $d_p = 10\ \mu\text{m}$	
	silice : $d_p = 10\ \mu\text{m}$	silice : $d_p = 10\ \mu\text{m}$	diamètre de la colonne (mm)	HEPT (mm)
L (cm)				
15	0.33	4.1	6.36	0.17
25	0.34	4.0	4.3	0.17
50	0.5	3.4	2.1	0.33
100	0.6-3.3	3.5		

b) *Optimisation de k'*

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

D'après l'équation (VII-27) : $R_s \uparrow \iff k' \uparrow \iff t_r \uparrow$ (inconvenient pour une séparation chromatographique)

k' optimal varie entre 1 et 5. Pour optimiser les valeurs de k' , on modifie la température ou on change la phase mobile (modifier sa polarité) ou son mode d'élution (isocratique ou gradient d'élution).

c) *Optimisation de α*

A partir de l'équation (VII-27) : $R_s \uparrow$ si $\alpha \neq 1$ ($\alpha = 1 \iff R_s = 0$)

Lorsque $\alpha > 1 \iff N \downarrow$ (voir tableau VII-3 ci-dessous) ; α peut être modifié en changeant la composition de la phase mobile, la température de la colonne et la composition de la phase stationnaire.

Tableau VII-3 : Variation de N en fonction de α pour $R_s = 1$ et $R_s = 1.5$

α	N	
	$R_s = 1$	$R_s = 1.5$
1.01	160000	360000
1.05	86000	15700
1.1	1940	4360
1.15	940	2110
1.2	575	1300
1.25	400	900

Conclusion

L'idéal de la chromatographie est d'avoir : une résolution élevée, grande détectibilité (le nombre de pics égale au nombre de composés), temps d'analyse très court et sans perte de charge.

VII-1-8 Perte de charge

La perte de charge représente la différence de la pression que l'on impose à la phase mobile à l'entrée de la colonne « P_e » et celle observée à la sortie de la colonne « P_s » :

$$\Delta P = P_e - P_s$$

L'écoulement d'un fluide peut être dû à la résultante de différentes forces : la gravité et la pression exercée sur la phase mobile qui provient de l'utilisation d'un gaz sous pression.

Les phases mobiles d'une colonne peuvent en revanche provoquer une résistance à cet écoulement qui, dans une colonne chromatographique de longueur L, est caractérisée par sa vitesse linéaire moyenne U ($U = L/t_0$).

Cette vitesse dépend de la température, de la pression imposée à la phase mobile et de la nature de la colonne.

A température constante, elle est définie par la relation issue de la loi de Darcy :

$$\Delta P = \frac{U L \eta}{K^\circ}$$

K° : est la perméabilité de la phase mobile (m^2), elle est exprimée en fonction du diamètre des particules :

$$K^\circ = \frac{dp^2}{\Phi}$$

Φ : facteur de résistance à l'écoulement, c'est un nombre sans dimension, sa valeur dépend de la forme des particules, de leur répartition granulométrique, de leur texture et de la qualité de remplissage.

$\Phi = 500$ pour les particules poreuses de forme sphérique

$\Phi = 1000$ pour les particules poreuses de forme irrégulière

η : viscosité de la phase mobile (Pas.s)

L : longueur de la colonne

$$\implies \Delta P = \frac{U L \Phi \eta}{dp^2} \text{ (VII-29)}$$

Remarque :

La viscosité des liquides est 100 fois plus élevée que les gaz (viscosité de l'eau = 10^{-3} Pas.s à 20°C ; viscosité de hélium 1.94×10^{-5} Pas.s), les pressions nécessaires seront 100 fois plus élevées en chromatographie liquide qu'en chromatographie gazeuse.

En chromatographie gazeuse, du fait de la compression des gaz, ΔP n'est pas linéaire (figure VII-7a), un gradient de pression s'établit entre l'entrée et la sortie de la colonne, la vitesse de la phase mobile y croît aussi avec la distance parcourue, elle est d'autant plus grande que la colonne est plus longue et plus importante à la sortie de la colonne.

i U_e est la vitesse d'entrée et U_s celle de sortie, U_s/U_e augmente fortement (figure VII-7b ci-dessous).

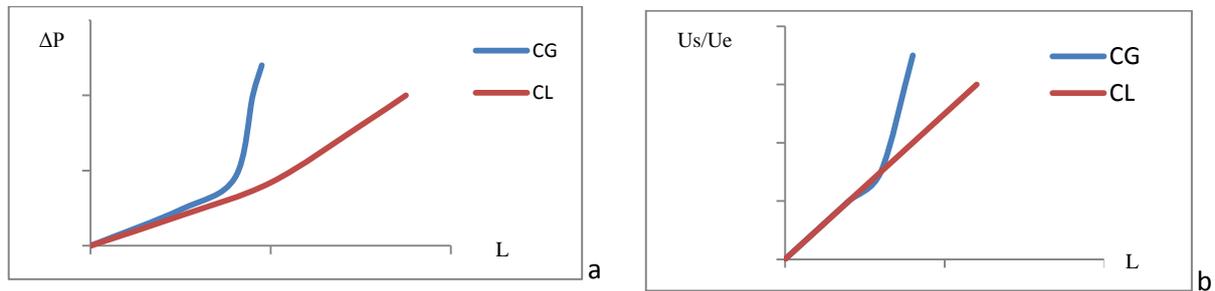


Figure VII-7 : Variation de la perte de charge et du rapport des vitesses de la phase mobile en fonction de la longueur de la colonne

En chromatographie liquide, les liquides étant incompressibles jusqu'à environ 600 bars, la vitesse de la phase mobile est constante.

➤ **Grandeurs réduites**

Ces grandeurs permettent de comparer entre elles des colonnes remplies avec des particules de phase stationnaire de dimension et de nature différentes, dans des conditions opératoires variées.

Longueur réduite d'une colonne $l : l = L/dp$ (VII-30)

Hauteur de plateau réduite $h : h = H/dp = l/N$ (VII-31)

Vitesse réduite de la phase mobile (équation I-28) : $v = \frac{U dp}{Dm}$

Dm : coefficient de diffusion moléculaire du soluté dans la phase mobile :

$$v = \frac{l dp^2}{t_0 Dm}$$

Calcul de Dm :

$$Dm = \frac{7.4 \times 10^{-1.5} T \sqrt{\Psi Ms}}{\eta V^{0.6}} \quad (\text{VII-32})$$

M_s : masse molaire du solvant

V : volume molaire du soluté à la température ambiante (cm^3/mol)

$$V = M/\rho$$

ρ : la masse volumique (g/cm^3)

η : viscosité du solvant (Pas.s)

T : température (K)

ψ : facteur d'association du solvant, égale à 1 pour des solvants non donneurs de liaison H ; 1.5 pour le méthanol ; 1.9 pour l'éthanol et 2.6 pour l'eau.

Exemple :

Supposons deux solvants A et B :

$$(\psi Ms)_{A,B} = x_A (\psi Ms)_A + x_B (\psi Ms)_B$$

x_A et x_B : fractions volumiques

$$\eta_{AB} = (\eta_A)^{y_A} + (\eta_B)^{y_B}$$

$y_A + y_B$: fractions molaires

VII-1-9 Cinétique d'échanges (facteurs influents sur la hauteur équivalente à un plateau théorique « H »)

Les conditions dans lesquelles s'effectue le passage de la phase mobile, ont une importance sur le phénomène chromatographique (modification des débits), sa modification entraîne un élargissement ou un rétrécissement des pics.

➤ *Théorie de Griddings :*

La hauteur équivalente à un plateau théorique H dépend de la vitesse d'écoulement de la phase mobile et différents paramètres : température, diamètre des particules de la phase stationnaire, etc.

- Vitesse d'écoulement de la phase mobile :

✓ Equation de Van Deemter :

$$H = A + B/U + CU \quad (\text{VII-33})$$

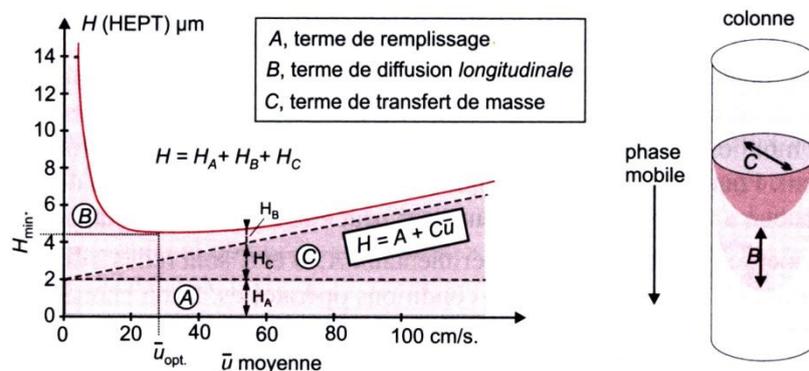


Figure VII-8 : Courbe de Van Deemter en chromatographie gazeuse

- A : exprime la diffusion turbulente due à l'écoulement irrégulier de la phase mobile à travers la phase stationnaire constituée de petites particules solides recouvertes ou non d'un mince film de liquide ; leurs tailles et leurs formes ne sont pas identiques, les trajets parcourus par chacune sont différents, donc le déplacement est le résultat moyen de tous les déplacements, ce qui en résulte l'apparition des turbulences provoquant un élargissement de la zone dans laquelle se situe par diffusion.

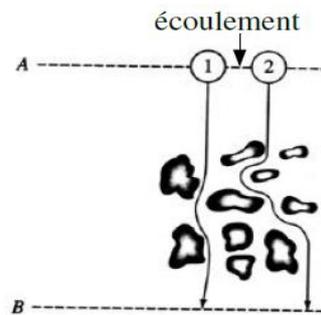


Figure VII-9 : Hétérogénéité d'écoulement

Le chemin parcouru par la molécule 2 est supérieur à celui de la molécule 1. 1 arrive en B avant 2. Le trajet dépend du diamètre des particules qui remplissent la colonne.

A dépend de diamètre des particules et du débit de la phase mobile

$$A = 2 \lambda dp$$

λ : régularité de remplissage

A : terme de remplissage

- B : terme de diffusion dans la phase mobile (diffusion longitudinale) rend compte l'influence de la diffusion des molécules dans la direction de l'écoulement de la phase mobile, ce phénomène est d'autant plus important si la vitesse est faible.

$$B = 2 \gamma D_m$$

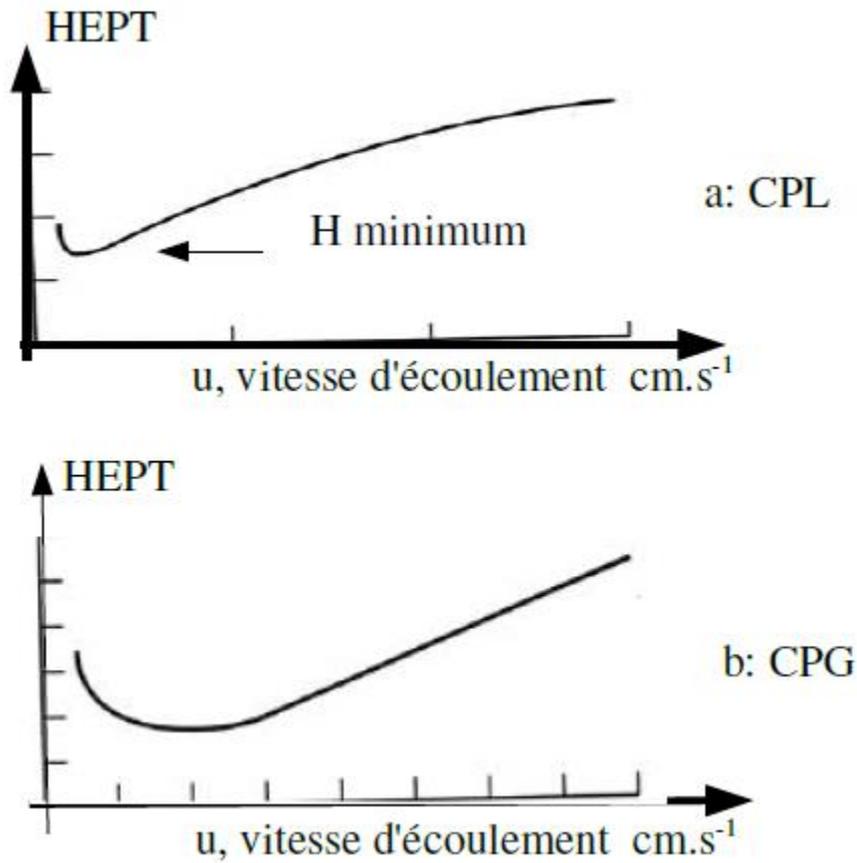
D_m : coefficient de diffusion moléculaire du soluté dans la phase éluante.

Si la phase mobile est un liquide, le coefficient de diffusion moléculaire D_m est faible.

Si la phase mobile est un gaz, le coefficient de diffusion moléculaire D_m est entre 10^4 et 10^6 .

$$D_m \uparrow \iff T \uparrow, P \downarrow$$

Le coefficient de diffusion moléculaire est 5 fois plus grand en CPG qu'en CPL. La contribution de la diffusion longitudinale est considérée comme négligeable en CLHP.



La pente est < 0 pour une vitesse de phase mobile « U » faible.

γ : facteur de tortuosité, il représente l'influence de la colonne : granulométrie des particules et régularité de remplissage.

γ_{faible} : le cheminement est uniforme.

Ce phénomène est dû à l'apparition d'un gradient de concentration (diffusion du soluté de zones plus concentrées vers les zones moins concentrées).

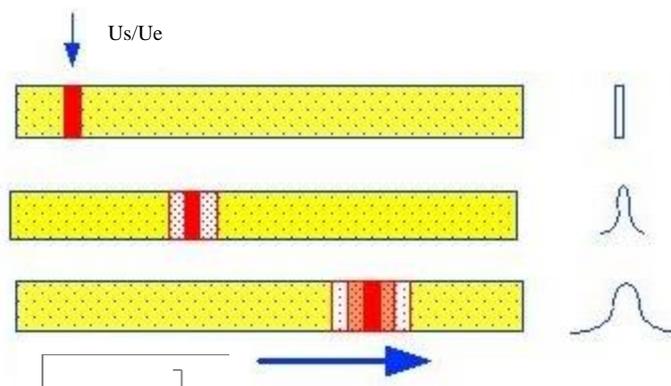


Figure VII-10 : Dispersion des pics par diffusion longitudinale

- C : coefficient de résistance au transfert de masse, il représente les irrégularités de passage des molécules d'une phase à l'autre (fixation ou élution).
- 1- Dans la phase mobile, toutes les molécules ne sont pas entraînées à la même vitesse, celle du milieu du flux progressent plus vite que celles se trouvant à l'extérieur.
 - 2- Le contact phase mobile - phase stationnaire ne s'effectue pas partout de manière identique, le trajet produisant à la surface est différent de celui à l'intérieur.
 - 3- Lorsque la phase stationnaire est un liquide recouvrant des particules supports, les molécules une fois fixées sur la phase stationnaire, sont situées à des distances différentes de la phase mobile et l'élution ne se fait pas partout à la même vitesse.

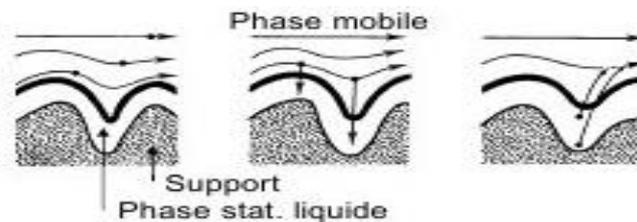


Figure VII-11 : Résistance au transfert de masse

Tous ces phénomènes entraînent des retards aux établissements des équilibres ; l'équilibre est plus accentué lorsque le débit de la phase mobile est rapide.

Pour lutter contre ces facteurs de résistances, il faut diminuer la distance à parcourir dans chaque phase donc diminuer le diamètre des particules, diminuer l'épaisseur de la phase stationnaire, c'est-à-dire une colonne régulièrement remplie et bien tassée :

$$C = C_{\phi m} + C_{\phi s}$$

Le dérivé de l'équation de Van Deemter (équation VII-33) par rapport à U donne :

$$f'(U) = -(B/U^2) + C$$

$$f'(U) = 0 \implies -(B/U^2) + C = 0 \implies U_0 = \sqrt{B/C} \quad (\text{VII-34})$$

U_0 : est la vitesse optimale de la phase mobile.

La partie ascendante de la figure VII-8 montre une augmentation du débit ce qui entraîne une augmentation de H.

La partie descendante : la vitesse de la phase mobile est inférieure par rapport à la vitesse optimale, donc H est élevé.

A la vitesse de la phase mobile optimale (U_{opt}) correspond une hauteur minimale (H_{min}) donc une efficacité maximale (N_{max}).

$$H_{min} = A + 2\sqrt{BC} \quad (\text{VII-35})$$

$$N_{max} = L/H_{min}$$

Remarque :

Le minimum pour la chromatographie liquide s'observe pour des vitesses d'écoulement plus faible que pour la chromatographie gazeuse. La vitesse d'écoulement dans la chromatographie liquide est plus faible que celle dans la CPG.

✓ *Equation de Golay :*

Elle est utilisée pour les colonnes capillaires de CPG

$$H = B/U + C_s U + C_m U \quad (\text{VII-36})$$

C_s et C_m sont les coefficients de transfert de masse dans la phase mobile et la phase stationnaire.

La diffusion est le déplacement des espèces des régions les plus concentrées vers les régions les moins concentrées ; la vitesse de diffusion est dépendante de la concentration et du coefficient de diffusion moléculaire.

La diffusion longitudinale est la tendance du soluté à se déplacer du centre de sa bande (concentration élevée) vers les régions diluées situées en amont et en aval.

$$H_{\min} = r \frac{1+6K + 11Rs^2}{3(1+k)^2} \quad (\text{VII-37})$$

✓ *Equation de Knox :* pour la chromatographie liquide

Cette équation fait intervenir les grandeurs réduites :

$$h = Av^{1/3} + B/v + Cv \quad (\text{VII-38})$$

Les grandeurs réduites, nombres sans unité, exprimées en fonction de diamètre des particules pour les colonnes remplies ou diamètre intérieur pour les colonnes capillaires.

$h = Av^{1/3}$: diffusion turbulente dépend de la granulométrie et le remplissage de la colonne ($A = 0.5$ et 2).

A élevé : mauvais remplissage et granulométrie irrégulière.

$h = B/v$: diffusion longitudinale dépend du diamètre interne granulaire ; $B = 2$.

$$H_{\text{diff long}} = 2/U (\gamma_m D_m + k \gamma_s D_s) \quad (\text{VII-39})$$

γ_m et γ_s : facteurs de tortuosité de la phase mobile et la phase stationnaire.

D_s et D_m : coefficients de diffusion du soluté dans la phase stationnaire et la phase mobile.

$h = Cv$: transfert de masse du soluté entre les deux phases

$$C = C_s + C_m$$

C : est la pente de la droite $h=f(v)$; $C = 0.01 - 0.2$

Pour les solutés volumineux (protéines) ou phases stationnaires polaires, C est élevé.

Pour les colonnes remplies : $A = 1$, $B = 2$, $C = 0.01 - 0.2$

C peut prendre des valeurs élevées dans le cas des phases greffées polymérisées et des polymères moléculaires ou échangeurs d'ions.

Références bibliographiques

- [1]Skoog D. A., Holler F. J. (2003). Principes d'analyse instrumentale. De Boeck.
- [2]Rouessac F., Rouessac A. (2004).Analyse chimiqueméthodes et techniquesinstrumentales modernes6^{ème}édition Dunod, Paris.
- [3] Rosset R., Kolodziejczyk H. (1995). Chromatographie en phase liquide. Exercices et problèmes. Masson Paris.
- [4]SkoogD. A. (1997). Chimie analytique. 7^{ème} édition. De Boeck.
- [5] Rosset R., Cande M., Jardy A. (1982). Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. Édition Masson, Paris.
- [6]Burgot G., Burgot, J. L. (2002). Méthodes instrumentales d'analyse chimique. Tec & Doc - Édission Lavoisier, Paris.
- [7]Yost, R.W., Etre, L.S., Conlon, R.D., Vaumoron, J. (1981). Pratique de la chromatographie liquide. Technique et Documentation.
- [8]Burgot, G., Burgot, J. L. (2011). Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques.
- [9] Lavoisier. Poole, C.F. (2003). The essence of chromatography.Elsevier.
- [10] Mendham, J., Denney, R., Barnes, J., Thomas, M. (2005). Analyse chimique quantitative de Vogel. 1^{ère} Edition ed. De Boeck.
- [11] Perrin-Drouin, Y. (1958). Chromatographie en phase gazeuse: méthode de partage gaz-liquide.
- [12] Guiochon, G. (2002). Preparative liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 965(1-2), 129-161.
- [13] Jandera, P. (2006). Can the theory of gradient liquid chromatography be useful in solving practical problems. Journal of Chromatography A, 1126(1-2), 195-218.
- [14] Rodrigues, R. C. R., Silva, R. J. S., and Mota, J. P. B. (2010). Streamlined two-column, simulated countercurrent chromatography for binary separation. Journal of Chromatography A, 1217(20), 3382-3391.
- [15]Seidel-Morgenstern, A. (2005). Preparative Gradient Chromatography. Chemical Engineering & Technology, 28(11), 1265-1273.
- [16]Grushka E., Grinberg N. (2008). Advances in chromatography, CRC Press. Taylor and Francis group. New York.

Sources internet

<http://chemphys.u-strasbg.fr/mpb>

Marie-Paule Bassez. Notions fondamentales de chromatographie

http://atechimie.univ-lille1.fr/pages/Chromato/Phase_gazeuse.htm

http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/afsep/fichier/175_30_4_2004.pdf

http://lepa.epfl.ch/ICP3_lecture_notes/Separation_Methods/Cours%202009/chromatoGC09 ;

Ecole Polytechnique de Lausanne

[http://www.u-cergy.fr/rech/labo/equipes/lppi/IMG/1-CPGM1 et 3-CPGM1](http://www.u-cergy.fr/rech/labo/equipes/lppi/IMG/1-CPGM1_et_3-CPGM1)

http://www.ipl.be/download/formation_continue/la_chromatographie_gazeuse.ppt

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

www.esi.umontreal.ca/~badiaa/CHM3102_chromato3a.pdf

Cours d'analyses physicochimiques des denrées alimentaires II, GPÉE, 1ère année. Préparé par Pr. R. Salghi, ENSA Agadir.

www.ensa-agadir.ac.ma/gpee/download/chromatographie.pdf

Pascale Richardin Pascale « La chromatographie liquide haute performance »