

CHAPITRE II :
Méthodes de séparation en
chromatographie

II.1. Introduction

La Chromatographie est un terme général, utilisé pour définir des méthodes de séparation basées sur la distribution d'un soluté entre deux phases, l'une étant mobile (un gaz ou un liquide), l'autre stationnaire (un solide ou un liquide). Cette méthode est largement utilisée dans les domaines de la chimie, de la biochimie et de la biologie pour analyser, identifier et purifier des substances. Il existe plusieurs types de chromatographie, tels que la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie liquide (CL), la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), la chromatographie en couche mince (CCM), etc. Chaque type de chromatographie a ses propres applications spécifiques en fonction des propriétés des composants de l'échantillon et des objectifs de l'analyse. En résumé, la chromatographie est une méthode puissante qui permet la séparation et l'analyse de mélanges complexes, ce qui en fait une technique essentielle dans de nombreux domaines scientifiques et industriels.

II.2. Définition de la chromatographie

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

II.3. Historique de la chromatographie

En 1906, le botaniste russe Mikhaïl Tswett a effectué la première chromatographie qui consistait à distinguer les pigments d'une feuille d'épinard, appelés "chromato" en grec. La séparation des colorants végétaux, y compris les chlorophylles, avait été observée par Twett lorsqu'il filtrait leur solution dans l'éther de pétrole sur une colonne de carbonate de calcium (CaCO_3). Il a observé la formation de bandes de différentes couleurs sur la colonne (vert, orange, jaune, etc.),

comme le montre la figure V.1 de l'expérience de Tswett. Il a donné le nom de chromatographie (écriture des couleurs, du grec Khroma, couleur et Graphein, écrire) à cette méthode. Il a également donné des définitions aux mots chromatogramme, élution et rétention.

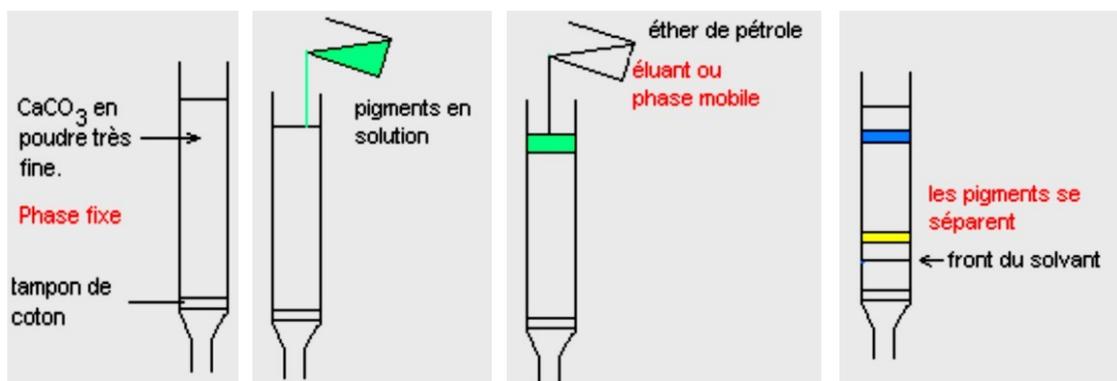


Figure II.1 : la représentation de l'expérience de Tswett en 1906

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

Cette technique fut quasi-abandonnée jusqu'en 1930, où Edgar Lederer a purifié par la méthode de Tswett la lutéine du jaune d'œuf.

1. En 1938 mise au point de la C.C.M par Ismailov et Shraiber
2. En 1941 : Martin et James (prix Nobel 1962), ont développé la chromatographie liquide sur colonne et devient une technique d'utilisation courante en biochimie et en chimie organique.
3. En 1952 : mise au point par Martin et James de la chromatographie en phase gazeuse C.P.G La chromatographie est en plein évolution actuellement surtout avec l'arrivée des colonnes capillaires en C.P.G et le couplage avec d'autres méthodes tel que la spectrométrie de masse.
4. En 1968, mise au point de la Chromatographie Liquide Haute Performance CLHP ou HPLC en anglais.
5. En 1979, première séparation chirale par HPLC.

II. 4. Principe de la séparation

Le principe fondamental de la chromatographie est d'entraîner l'échantillon à l'aide d'un éluant, soit gazeux soit liquide, appelé phase mobile (PM). Au contact d'une seconde phase immobilisée sur un support, qu'il s'agisse d'une colonne ou d'une surface plane, cette phase mobile se déplace. La phase stationnaire (PS), une phase immobilisée, est insoluble dans la phase mobile.

Un coefficient de distribution de Nernst, noté K , ou coefficient de partition, détermine les caractéristiques distinctives de chaque composé présent dans l'échantillon. Ce coefficient, également appelé rapport de distribution, définit la répartition d'un composé entre la phase mobile et la phase stationnaire pendant le déplacement à travers le système chromatographique. Les propriétés chimiques de chaque composé modifient les interactions avec la phase mobile et la phase stationnaire, ce qui entraîne des temps de rétention différents et, en fin de compte, la division des composants de l'échantillon.

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

II.6. Terminologie générale de la chromatographie

1. Chromatogramme

Un chromatogramme est une représentation graphique montrant l'évolution du signal du détecteur (par rapport à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (et plus rarement du volume d'élution). Ce graphique est utilisé à la fois en analyse qualitative et quantitative.

✚ Analyse qualitative : permet l'identification des composés par la position du pic.

✚ Analyse quantitative : évaluer la concentration ou la masse d'un composé en utilisant l'aire des pics.

2. Elution

L'élution est le processus d'entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire

par le mouvement de la phase mobile. Dans le cas de la chromatographie liquide sur solide, la phase mobile peut être désignée sous le terme d'éluant.

3. Le temps mort

Le temps mort (t_m) est la durée nécessaire à un composé qui n'est pas retenu par la phase stationnaire de la colonne pour parcourir la distance entre l'entrée et la sortie de la colonne (ou le temps nécessaire à la phase mobile pour traverser la colonne).

4. Le temps de rétention

Le temps de rétention (t_r) représente la durée nécessaire aux molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir la distance entre l'entrée et la sortie de la colonne. Il est une caractéristique spécifique d'une espèce dans des conditions d'analyse données et peut être utilisé à des fins d'analyse qualitative. La surface et la hauteur d'un pic sont proportionnelles à la quantité du constituant. Le temps de rétention demeure indépendant de la quantité d'échantillon injectée et dépend de la nature ainsi que de la vitesse de la phase mobile.

5. Le temps de rétention réduit

Le temps de rétention réduit (t_r') représente la période pendant laquelle le soluté demeure dans la phase stationnaire.

$$t_r' = t_r - t_m$$

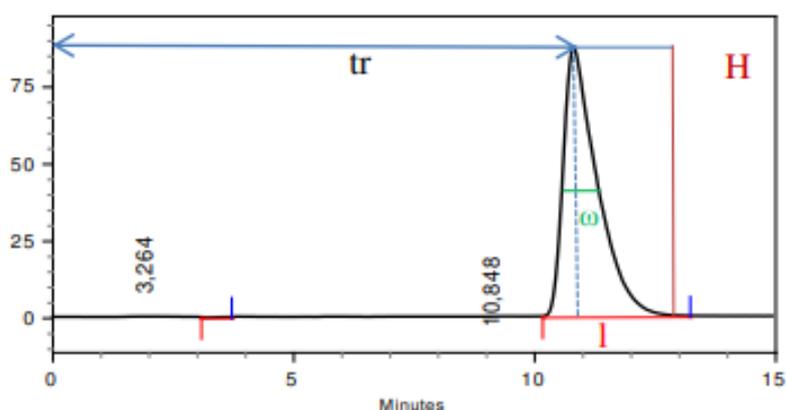


Figure II.2: Chromatogramme d'un constituant

6. Le volume de rétention

Connaissant le débit (D) de la phase mobile, supposé maintenu constant, on définit

le volume de rétention (V_r)

$$V_r = t_r \times u$$

$$D V_r = t_r \times u \times s \times \varepsilon$$

u : vitesse linéaire moyenne de la phase mobile

s : sélection droite de la colonne

ε : porosité de la phase stationnaire (=0,75 pour la silice poreuse)

Le volume de la phase mobile dans la colonne, également appelé volume mort, peut être calculé à partir du chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. Cette grandeur est exprimée par :

$$V_m = t_m \times D$$

Le volume de la phase stationnaire désigné par V_S est calculé en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

7. Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile

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

$$v = L / t_r$$

Ou

L : longueur de la colonne

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

$$u = L / t_m$$

8. Le facteur de capacité

Le facteur de capacité (ou facteur de rétention) k' exprime le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile. Ce facteur sans dimension, peut être relié au temps de rétention par l'expression:

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

k' est aussi le rapport du temps passé par une espèce dans la phase stationnaire au temps passé par cette même espèce dans la phase mobile.

De faibles valeurs de k' indiquent des composés peu retenus. Des valeurs élevées

de k' indiquent des composés fortement retenus, en pratique $1 < k' < 10$.

Le temps et le volume de rétention sont liés au facteur de capacité par les relations:

$$t_r = t_m(1+k')$$

et

$$V_r = V_m(1+k')$$

9. Facteur de sélectivité

Afin de décrire la distance entre les sommets de deux pics, on recourt au facteur de sélectivité ou de séparation (α). Ce facteur est défini comme le rapport des facteurs de capacité de deux solutés que l'on souhaite séparer. Il s'exprime de la manière suivante :

$$\alpha = \frac{(t_{r2} - t_m)}{(t_{r1} - t_m)} = K'_2 / K'_1$$

ILS 'agit du rapport des temps de rétention réduits

k'_2 :facteur de capacité du composé 2

k'_1 :facteur de capacité du composé 1

$\alpha = 1$ aucune séparation ne s'effectue aussi le temps de rétention est le même, La sélectivité doit être supérieure à 1. Deux composés ne peuvent être séparés sauf s'ils ont $k' \neq 0$

II.7. Efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne chromatographique se mesure, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques (N) et la hauteur équivalente à un plateau théorique (H). Cette théorie trouve son origine dans la recherche d'un modèle statique permettant de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique, similaire à celui d'une colonne de distillation. Au lieu de prendre en compte le déplacement continu réel de la phase mobile, on suppose qu'elle progresse par sauts successifs et atteint un équilibre avec la phase stationnaire entre deux transferts. Cela permet de diviser fictivement la colonne en plusieurs zones, appelées plateaux théoriques, où les équilibres sont réalisés.

$$N = 16(t_r/H)^2$$

l : largeur du pic à la base

$$N=5,54 (tr/\omega)^2$$

ω : largeur du pic à mi-hauteur

Pour comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs son définit la hauteur équivalente à un plateau théorique.

$$N=L/H$$

H: est la distance ou l'équilibre chromatographique est atteint.

En HPLC les HEPT sont comprises entre 0,001 et 1 mm.

L'efficacité des colonnes chromatographiques est liée à la quantité de plateaux théoriques et la hauteur équivalente à un plateau théorique. Le temps de rétention s'accroît avec l'augmentation du nombre de plateaux théoriques ou la de la hauteur équivalente à un plateau théorique à longueur constante diminution de la colonne. Les facteurs externes à la colonne peuvent également influencer son efficacité.

Deux colonnes de mêmes efficacités possèdent le rapport L/dp semblable

II.7. Résolution

La résolution de deux pics voisins est définie par rapport à la distance entre le maximum des deux pics et la moyenne arithmétique. Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics.

- a) La distance séparant les sommets de deux pics mesurés par tr_2-tr_1
- b) La largeur des pics à la base l

$$R_s = 2 \frac{(tr_2 - tr_1)}{(l_2 + l_1)}$$

Plus la résolution est grande, meilleure est la séparation Deux pics sont bien résolus, si $R \geq 1,5$ (fig 3).

Pour des valeurs de R_s (rapport des distances entre les pics) beaucoup plus grandes que 1, la séparation des pics n'est pas nécessairement meilleure, mais le

temps de la séparation devient inutilement long. La résolution, qui mesure la qualité d'une séparation, peut être optimisée en reliant les facteurs de sélectivité et de capacité à la résolution.

En supposant $l_1=l_2$, en combinant l'expression on obtient la relation de Purnell:

$$\frac{1}{4} \times \frac{(a-1)}{a} \times \frac{k_2'}{k_2'+1} \times \sqrt{N_2}$$

On pourra améliorer une séparation en faisant varier l'un au moins des trois facteurs précédents.

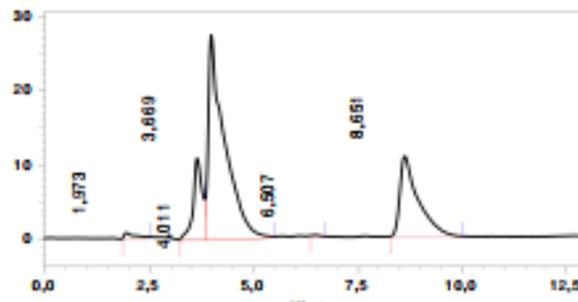


Figure II.3. Chromatogramme montrant la séparation de trois constituants

II.8. Equation de Van Deemter

L'équation ci-dessous correspond à celle proposée par Van Deemter et al.(1956) pour la chromatographie en phase gazeuse

$$H=A+B/u+C.u$$

La courbe représentant l'équation de Van Deemter est donc une hyperbole ou A, B, C sont des constantes.

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

A: est l'influence de la diffusion turbulente due aux hétérogénéités dans l'écoulement.

B: est un facteur de la diffusion moléculaire dans la phase mobile.

C: dépend de la résistance au transfert de masse en phase liquide.

Le tracé de la courbe HEPT en fonction de la vitesse moyenne du gaz vecteur, permet de déterminer le débit minimum donnant la meilleure efficacité de la colonne.

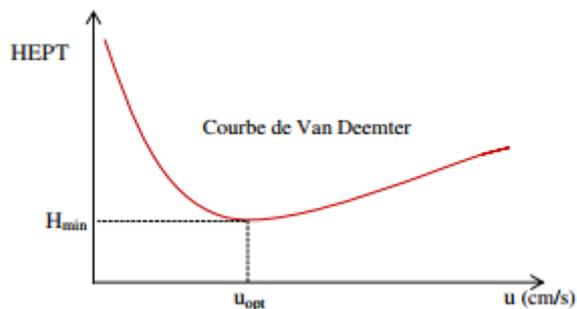


Figure II.4: Courbe de Van Deemter.

Variation de la hauteur d'un plateau théorique en fonction de la vitesse moyenne
Du gaz vecteur

À de faibles valeurs de la vitesse u , le terme B/u prédomine, ce qui se traduit par une courbe devenant asymptotique à une droite de pente négative. Cette tendance explique la perte d'efficacité observée à très faibles vitesses. En revanche, à des vitesses élevées, le terme $C.u$ prend le dessus, induisant une courbe asymptotique à une droite de pente positive. Ceci explique la perte d'efficacité à des vitesses très élevées. Dans la région intermédiaire, le terme A est prépondérant, et la hauteur équivalente à un plateau théorique H atteint un minimum (H_{min}). Cette observation suggère que la variation de H en fonction de u atteint une valeur minimale calculée en cherchant.

La valeur de u correspondant à l'annulation de la dérivée première de cette fonction :

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

II.9. Optimisation d'une analyse chromatographique

La résolution et le temps d'élution sont deux variables dépendantes cruciales à considérer dans le contexte de la chromatographie. L'objectif central de toute optimisation est d'atteindre une séparation adéquate des composés d'intérêt en utilisant

le temps minimal nécessaire. Dans la pratique, le choix initial se porte souvent sur les conditions chimiques de la séparation, notamment la nature et la composition chimique de la phase stationnaire, ainsi que la nature et la composition chimique de l'éluant. Des ajustements éventuels peuvent également être effectués sur les composés à séparer.

L'objectif est d'assurer que le facteur de sélectivité n'est pas trop proche de 1, et que les facteurs de capacité se situent idéalement entre 1 et 10. Cette approche vise à garantir une séparation efficace tout en optimisant le temps nécessaire pour parvenir à cette séparation. En choisissant judicieusement ces conditions chimiques, on peut influencer les performances chromatographiques pour répondre aux exigences spécifiques de la séparation des composés d'intérêt.

II.10. Classification des techniques chromatographique

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

II.10.1. Classification selon la nature physique des phases:

Suivant l'état physique de la phase mobile, on distingue :

1. **La chromatographie en phase gazeuse (CPG)** : la phase mobile est un gaz, dit gaz vecteur, et les solutés sont introduits sur la colonne directement s'il s'agit d'un échantillon gazeux ou après volatilisation dans la chambre d'injection chauffée s'il s'agit d'un échantillon liquide (éventuellement après dilution ou dissolution dans un solvant adéquat).
2. **La chromatographie en phase liquide (CPL)** : la phase mobile est constituée d'un solvant pur ou le plus souvent d'un mélange plus ou moins complexe de solvants de grande pureté ; elle est introduite sur la colonne à débit constant par un système de pompage.
3. **La chromatographie en phase supercritique (CPS)** : la phase mobile est un fluide supercritique, c'est-à-dire porté au-delà des coordonnées en pression et température du point critique, point à partir duquel il n'existe plus de frontière définie entre les états liquide et gazeux.

Suivant l'état physique de la phase stationnaire, on distingue :

1. *La chromatographie liquide/solide (CLS)*
2. *La chromatographie liquide/liquide (CLL)*
3. *La chromatographie gaz/solide (CGS)*
4. *La chromatographie gaz/liquide (CGL)*

II.10.2. Classification selon le phénomène mis en œuvre:

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

1. *La chromatographie d'adsorption*
2. *La chromatographie de partage*
3. *La chromatographie d'échange d'ions*
4. *La chromatographie d'exclusion*
5. *La chromatographie d'affinité*

II.10.3. Classification selon la technique mise en jeu:

Selon le support de la chromatographie on distingue:

1. *La chromatographie sur colonne*
2. *La chromatographie planaire*
3. (Chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince) On peut résumer les différentes méthodes chromatographiques existe dans [La Figure II.5](#)

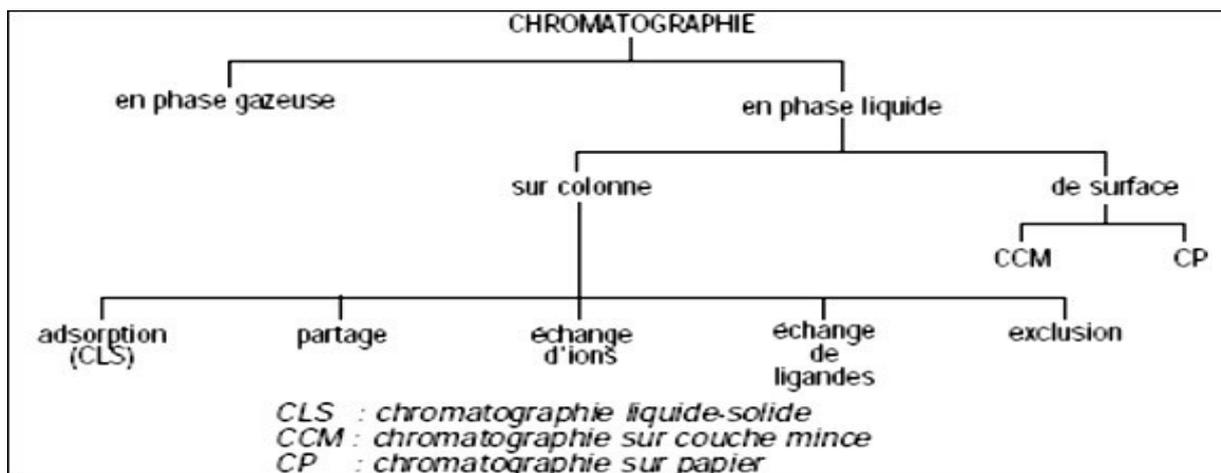


Figure II.5: Classification des méthodes chromatographiques

II.11. Chromatographie sur couche mince :

Les phénomènes d'adsorption et le principe de capillarité sont les principaux fondements de la chromatographie sur couche mince (CCM). Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse dans l'absorbant lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve chromatographique, l'éluant monte à travers la phase stationnaire et entraîne les solutés à séparer en fonction de sa densité, de sa solubilité dans la phase mobile.

Le contenu sera un récipient en verre de forme variable, qui sera fermé par un couvercle étanche. Les principaux composants d'une séparation CCM sont représentés à la figure suivante.



Figure II.6 : Cuve chromatographique

On va devoir gérer 3 éléments bien définis :

1. La phase mobile (PhM) :

Un solvant (ou un mélange de solvants) qui progresse le long d'une phase dite « stationnaire » fixée sur un support en entraînant les composants de l'échantillon est également connu sous le nom d'éluant. Le choix de l'éluant sera variable selon le type d'analyse à réaliser :

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

2. La phase stationnaire (PhS) :

C'est une couche de gel de silice d'environ 1/4 de mm (un adsorbant parmi d'autres) qui est fixée sur une plaque de verre (ou sur une feuille semi-rigide de plastique ou d'aluminium, voire même sur une feuille de papier) à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre), l'amidon ou un polymère organique. Les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant après le dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire. Le gel de silice, l'alumine et la cellulose sont les adsorbants utilisés en CCM par ordre d'importance décroissante.

- Les adsorbants à faible capacité d'adsorption comme l'alumine, le talc (méta silicate acide de magnésium) ou le carbonate de sodium.
- Les adsorbants forts comme le gel de silice.

3. L'échantillon :

L'échantillon, généralement dissous dans un solvant volatil à une concentration de 2 à 5 %, est souvent préparé en utilisant des solvants tels que le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. Il est important de noter que ce solvant peut différer de celui utilisé comme éluant dans le processus chromatographique. La solution résultante, d'une quantité maximale d'environ 1 cm³, est soigneusement déposée sur la plaque chromatographique, à une distance d'environ 1 cm de la partie inférieure de la plaque.

4. Développement de la plaque :

La plaque préparée est insérée verticalement dans la cuve, où l'éluant qui recouvre le fond monte par capillarité. Cette action entraîne les constituants de l'échantillon à des vitesses différentes, favorisant ainsi leur séparation. Lorsque le niveau atteint par le solvant est d'environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, celle-ci est retirée de la cuve, Dans le cas où le mélange à analyser contient des solutés de polarités voisines, il est possible d'appliquer une chromatographie bidimensionnelle. Pour ce faire, une première chromatographie est réalisée sur le même support à l'aide d'un système de solvants, suivi d'une deuxième chromatographie avec un second système de solvants, dans une direction perpendiculaire à la première. Cette approche permet d'obtenir une séparation plus fine et une résolution accrue des composants présents dans l'échantillon.

5. Révélation :

Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque chromatographique. Cependant, dans le cas où les composants ne sont pas colorés, il est nécessaire de rendre les taches visibles en utilisant un procédé de révélation. Une fois les taches apparues, elles sont généralement encerclées au crayon pour faciliter leur identification. Les méthodes couramment utilisées pour la révélation des taches sont les suivantes :

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

6. Paramètre du CCM :

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

$$R_f = H_p/H_s$$

Où H_p = hauteur d'élution du produit et H_s = hauteur d'élution du solvant

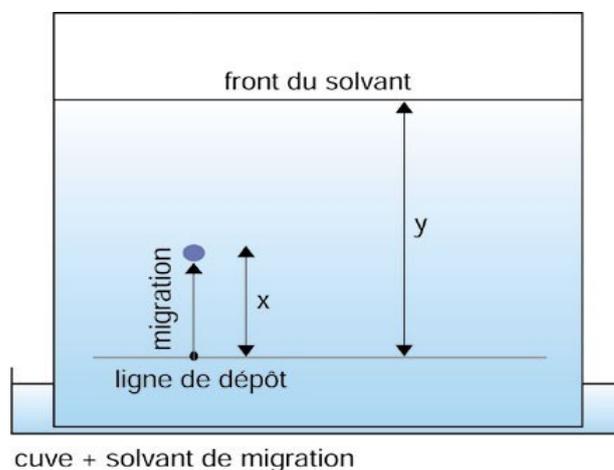


Figure II.7: Schéma montrant comment déterminer le rapport frontal d'une substance

La Figure II.7 montre comment déterminer le R_f dans le cas d'une chromatographie liquide ascendante : On mesure la distance x (H_p) parcourue par la substance à partir de la ligne de dépôt. On mesure également la distance y (H_s) parcourue par le solvant à partir de la ligne de dépôt, jusqu'au front de solvant. Le rapport x / y toujours inférieur à 1 représente le rapport frontal de la substance (R_f).

Remarque :

Un soluté très soluble dans la phase fixe aura un R_f faible, alors qu'un soluté très soluble dans la phase mobile aura un R_f élevé et proche de 1.

7. Application :

La CCM a plusieurs applications ; elle permet le contrôle simple et rapide de la pureté d'un composé organique, le suivi d'une réaction chimique ou d'un fractionnement chromatographique sur colonne et la recherche du meilleur solvant avant d'entamer une séparation sur colonne traditionnelle. De plus, elle permet la purification de petites quantités de produit.

La bande contenant le produit purifié est grattée, puis un solvant est utilisé pour extraire la silice. Ce mode de chromatographie est populaire en raison de sa simplicité d'utilisation et de sa compatibilité avec l'analyse plutôt que avec la préparation.

II.12. Chromatographie sur colonne en phase liquide (LC):

La chromatographie sur colonne en phase liquide (LC) est une technique de séparation analytique largement utilisée en chimie et en biochimie pour séparer, identifier et quantifier les composants d'un mélange. C'est la chromatographie la plus ancienne (Figure II.8), repose sur la distribution sélective des composants d'un échantillon entre une phase stationnaire et une phase mobile. Où la phase mobile est un liquide (PhM = liquide).

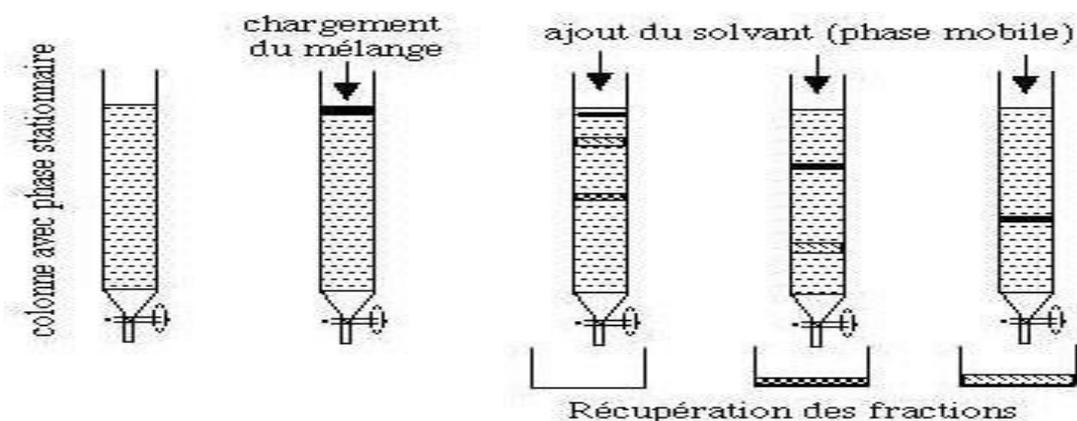


Figure II.8: Schéma simplifié d'une chromatographie liquide

On peut subdiviser la chromatographie sur colonne en phase liquide en plusieurs classes, selon la nature des phénomènes mis en jeu. Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. En résumé les différents principes de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié un des facteurs cités dans le Tableau II.1, afin de séparer des composés constituant un mélange :

Tableau II.1: Facteurs de séparation de quelques techniques chromatographique selon la nature des phénomènes mis en jeu

Technique chromatographique	Facteur de séparation
Chromatographie d'adsorption d'adsorption en phase inversée	Polarité
Chromatographie de partage	Solubilité dans un solvant
Chromatographie d'exclusion	Taille et forme
Chromatographie par échange d'ions	Charge électrique
Chromatographie d'affinité	Groupement d'atomes formant des sites particuliers

II.12. 1. Chromatographie d'adsorption :

1. Définition de l'adsorption :

L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide (ou gaz) sur une surface solide. Ce phénomène fait intervenir des forces complexes entre le soluté et l'adsorbant : forces électrostatiques, forces de liaison d'hydrogène et autre. Pour que cette adsorption soit utilisable à des fins préparatoires, il faut que cette fixation soit réversible.

La désorption consiste à remettre, à l'aide d'un éluant approprié la substance en solution par rupture des liaisons précédentes.

2. Définition de la chromatographie d'adsorption:

La chromatographie liquide/solide, également connue sous le nom de chromatographie d'adsorption, utilise des phases stationnaires ayant des propriétés adsorbantes, Principalement des gels de silice poreux et des gels d'alumine. La chromatographie de partage de phase en normale est complémentaire à cette méthode, La séparation est fondée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange sur cette phase, donc basée sur l'existence de dipôles dans une structure moléculaire.

3. Adsorbants :

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

- Les supports pelliculaires : constitués de billes de verre avec un diamètre moyen de 40 μm recouvertes d'une pellicule d'adsorbant de 2-3 μm d'épaisseur.
- Les supports entièrement poreux, caractérisés par une grande capacité (100 fois plus grandes que celle des supports pelliculaires). L'un des adsorbants les plus couramment utilisés est la silice provient de la déshydratation de l'acide silicique, elle se présente sous forme d'une poudre blanche de très fine granulométrie.

4. Phase mobile :

La migration du soluté dépend de sa solubilité dans l'éluant. Il est envisageable d'ajuster la polarité en utilisant des mélanges de solvants, sous réserve de leur compatibilité et de leur miscibilité avec le système de détection, afin d'assurer une séparation efficace. Généralement, on adapte la polarité de la phase stationnaire à celle du soluté pour la plupart des séparations chromatographiques, tandis que la phase mobile a une polarité nettement différente.

5. Application :

La chromatographie d'adsorption est utilisée pour séparer des composés apolaires ayant des masses moléculaires inférieures à 3000. Cette technique s'avère particulièrement bénéfique pour la séparation d'isomères, notamment les dérivés du benzène substitués en position méta et para. Elle complète efficacement la chromatographie de partage en phase normale.

II.12. 2. Chromatographie d'échange d'ions :

1. Définition :

La chromatographie ionique (CI) est une technique analytique utilisée efficacement pour analyser les espèces ioniques présentes dans un échantillon liquide, exempt de

matières en suspension, tant qualitativement que quantitativement. En utilisant une colonne chromatographique spécialement conçue pour l'analyse ionique, cette méthode permet de séparer les ions présents dans la solution. Elle est fréquemment utilisée pour déterminer les ions anioniques (anions) et cationiques (cations) dans une variété d'échantillons liquide dépourvu de matières en suspension.

2. Principe :

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

3. Phase stationnaire :

La phase stationnaire dans la chromatographie ionique se compose d'une résine, un polymère insoluble préparé sous forme de billes, qui agit comme une échangeuse d'ions. Cette résine contient des groupements chargés positivement ou négativement, ce qui permet la rétention des espèces à séparer. Le soluté ionique ou ionisables interagit avec les groupes de charges opposées présents sur la phase stationnaire.

L'échangeur d'ions comprend deux parties distinctes : les groupements fonctionnels, responsables de ses propriétés, et la matrice (support fixe) sur laquelle ces groupements sont greffés. Les groupements fonctionnels sont fixés sur la matrice par des liaisons covalentes, et ils se présentent sous deux types différents.

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

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



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

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



Remarque : Chaque type d'échangeur se divise en deux groupes :

1. Échangeur fort : reste pleinement chargé entre pH 3 et 1

2. Échangeur faible : reste chargé dans une gamme de pH restreint

4. Support :

La chromatographie ionique (CI) peut utiliser des supports minéraux comme la silice ou organiques comme la résine polystyrénique, la cellulose et le dextrane, où les propriétés du support sont.

1. **Porosité** : le support est un polymère plus ou moins réticulé. La porosité dépend du taux de pontage : un polymère très réticulé a des pores de petite taille et convient pour des petites molécules

2. **Granulométrie** : le support est commercialisé sous forme de grains de diamètre variant de 30 à 800 μm (chromatographie basse pression) celui des colonnes HPLC a une granulométrie de 5-10 μm (supports totalement poreux) ou légèrement supérieure (supports pelliculaires, en couche de 1 μm sur des billes de verre). Les échanges sont d'autant plus rapides et efficaces que les grains sont petits.

5. Phase mobile :

La phase mobile est une solution aqueuse avec une force ionique spécifique. Une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou un gradient de pH et (ou) de force ionique peuvent être utilisés pour décrocher successivement les différents ions fixés sur l'échangeur.

Cependant, pour optimiser une élution ou faciliter la solubilité de certains solutés, il peut être nécessaire d'utiliser des mélanges de solvants polaires (méthanol-eau). Le principal paramètre de rétention est le pH.

6. Applications:

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

II.12. 3. Chromatographie de partage:

1. Définition:

C'est une chromatographie liquide-liquide (phase inverse). La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte (ex. : de l'eau sur la cellulose d'un papier). Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.

2. Principe :

La chromatographie de partage est une méthode pour séparer les composés d'un mélange en fonction de leur distribution entre deux phases immiscibles, généralement une phase stationnaire et une phase mobile. Le principe fondamental est basé sur les variations d'affinité des composés entre ces deux étapes.

3. Phase stationnaire :

En chromatographie liquide classique, les phases stationnaires sont des solvants polaires dans lesquels vont pouvoir se solubiliser les composés polaires à séparer. Le choix de cette phase reste toutefois très empirique, le nombre de possibilités étant relativement grand (systèmes simples ou systèmes à solvants multiples : ternaires, quaternaires). Il peut s'agir d'eau, de méthanol ou d'éthanol, éthers renfermant des groupements hydroxyles ou nitriles (très polaires) : glycols, polyéthylène glycols, β , β' oxidipropionitrile ($\text{CN} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{CN}$), etc.

3. Phase mobile :

L'éluant, en tant que phase mobile, doit être immiscible avec la phase stationnaire, une caractéristique actuellement déterminée empiriquement. Pour pallier la miscibilité inévitable, le solvant doit être pré-saturé avec la phase stationnaire avant d'entrer dans la colonne, assurant un équilibre thermodynamique. La polarité de la phase mobile influence le coefficient de partage des solutés, ajustable par l'ajout de modificateurs polaires.

L'inversion de phase, modifiant le support de la phase stationnaire, permet l'utilisation d'éluant très polaires, normalement incompatibles, en adsorbant une

solution stationnaire moins polaire. Ainsi, des solvants tels que l'eau ou les alcools peuvent être utilisés, élargissant les applications de la chromatographie.

5. Les supports :

Les supports sont inertes vis-à-vis des composés à séparer. Ils ne servent qu'à immobiliser, par adsorption ou formation de liaisons chimiques covalentes, la phase stationnaire liquide. Ce sont des solides très finement divisés qui présentent une très grande surface afin de retenir, sous un petit volume, une grande quantité de phase stationnaire. Il est nécessaire que leur rétention soit énergique et qu'ils ne réagissent pas avec le soluté. Leurs propriétés d'adsorption doivent être totalement masquées. Les phases stationnaires décrites en chromatographie d'adsorption peuvent être utilisées comme support sous forme poreuse ou pelliculaire (couche superficielle poreuse).

6. Application :

La chromatographie de partage est particulièrement efficace pour la séparation de molécules très polaires ayant des masses moléculaires inférieures à 3000, ainsi que pour les homologues d'une série qui présentent une mauvaise séparation lors de la chromatographie d'adsorption.

II.12. 4. Chromatographie d'exclusion:

1. Définition:

La chromatographie d'exclusion sur gel est une technique chromatographique qui permet de séparer des molécules, en fonction de leur taille et de leur forme.

2. Principe:

Cette méthode de chromatographie utilise des granules de gels poreux dont les pores ont une taille similaire à celle des molécules des composés. La séparation résultant de la différence de taille est basée sur la capacité du soluté à pénétrer ou à ne pas pénétrer dans les pores de la phase stationnaire. Les molécules de l'échantillon ; certaines sont assez petites pour entrer dans la matrice poreuse, tandis que les plus grandes restent

dans le volume interstitiel de la phase stationnaire. Par conséquent, les solutés sont classés dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

3.Phase stationnaire :

Les phases stationnaires sont constituées de polymères réticulés organiques ou minéraux sous forme de grains sphériques de 3 à 10 μm de diamètre avec des pores de 4 à 200 nm et des billes ou des perles parfaitement calibrées. En leur présence, le solvant pénètre dans chaque particule et les gonfle. Le gel est le matériau principal utilisé dans cette méthode. La chromatographie d'exclusion sur un support hydrophile est utilisée pour séparer les espèces polaires. Tandis que la chromatographie d'exclusion sur un support utilisée pour séparer des espèces non polaires est appelée perméation de gel.

4. Phase mobile:

Lorsque le gel est mou, le solvant doit aussi le gonfler puisque la taille des pores de ce gel dépend de la quantité de solvant imbibée. Les solvants les plus couramment utilisés sont : Eau, chloroforme, trifluoroéthanol. Cette méthode chromatographique est pratiquement indépendante de la nature du solvant donc on n'utilise pas de gradient d'éluion puisqu'il n'y a pas d'interaction soluté/phase mobile. Le volume d'éluion dans la colonne décomposée en deux parties : Le volume interstitiel ou volume mort V_I (extérieur aux pores laissé libre entre les grains du gel) et le volume V_P le volume total des pores. V_I : volume nécessaire pour transporter une grosse molécule $V_e = V_I + V_P$ La phase mobile doit surtout être capable de mouiller la phase stationnaire et d'éviter l'adsorption. V_P est le volume de la phase mobile correspondant pour une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores

6. Applications :

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

biopolymères dans le domaine biochimique.

II.12. 4. Chromatographie d'affinité :

1. Définition :

La chromatographie d'affinité repose sur les interactions entre un effecteur, qui est fixé en tant que phase stationnaire fixe sur un support inerte, et son partenaire d'affinité en solution. Dans les complexes biologiques à la base de cette méthode, au moins l'un des partenaires est une protéine, qui peut être soit le partenaire d'affinité en solution, soit le ligand fixe. Les complexes biologiques peuvent être des enzymes-substrats, des hormones-récepteurs ou des antigènes-anticorps.

2. Principe:

Le principe de cette technique consiste à préparer le gel d'affinité (Résine), en fixant les effecteurs (ligand) sur un support inerte. Une colonne est remplie de ce gel d'affinité, on y fait passer la solution aqueuse contenant la molécule à purifier. Celle-ci est retenue, alors que les contaminants en solution passent librement. On élimine toute trace de produits indésirables par des lavages successifs. Enfin, on élue la molécule retenue en décomposant le complexe. Pour cela, on modifie les conditions de milieu: changement de pH, utilisation d'un dénaturant réversible ou l'on fait passer une solution contenant un ligand ayant, pour la macromolécule retenue, plus d'affinité que le ligand fixe (inhibiteur compétitif réversibles).

3. Caractères de supports

Les supports utilisés en chromatographie d'affinité doivent posséder certaines propriétés spécifiques pour assurer le succès de la séparation. Voici quelques-unes des propriétés essentielles recherchées dans les supports de chromatographie d'affinité :

- être insolubles dans l'eau
- être poreux
- être stables chimiquement et mécaniquement

➤ porter des groupements fonctionnels réactifs permettant la fixation des effecteurs

4. Effecteurs (Ligand) :

Peuvent être effecteurs toutes les substances capables de former des complexes stables avec les molécules à isoler. Les effecteurs utilisés sont :

❖ □ pour la purification des enzymes :

- Des substances et analogues de substrats
- Des inhibiteurs réversibles
- Des coenzymes

❖ □ En immunologie

- Des antigènes.
- Des anticorps.

❖ Pour l'étude des protéines réceptrices :

- Des hormones

6. Application de la chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité a été utilisée :

- en enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extraits enzymatiques
- en immunologie, pour la purification d'anticorps
- en protéinochimie, pour l'étude des protéines membranaires

II.12. 4. Chromatographie liquide de haute performance HPLC/CLHP :

1. Définition:

La chromatographie liquide haute performance, également connue sous le nom de CLHP, est une technique instrumentale qui permet d'identifier et de quantifier les composants d'un mélange non volatil, thermosensible et de polarité élevée. Elle

effectue des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion en fonction de la nature de la phase stationnaire. Son développement rapide, à partir de 1970, compense les inconvénients de la chromatographie liquide classique, qui a toujours été peu utilisée en raison de la lenteur de la séparation, de l'absence de détecteur qui aurait permis de suivre facilement le développement du chromatogramme et de la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

3. Appareillage

Dans tous les appareils HPLC, on retrouve un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre. Une, ou plusieurs pompes assurent le débit du solvant d'éluion. En aval de l'injecteur se trouvent la ou les colonnes où s'effectuera la séparation, puis au bout de la chaîne se trouve le détecteur (Figure II.5). Par la suite, nous allons aborder un peu plus en détail chacun des composants essentiels d'une HPLC.

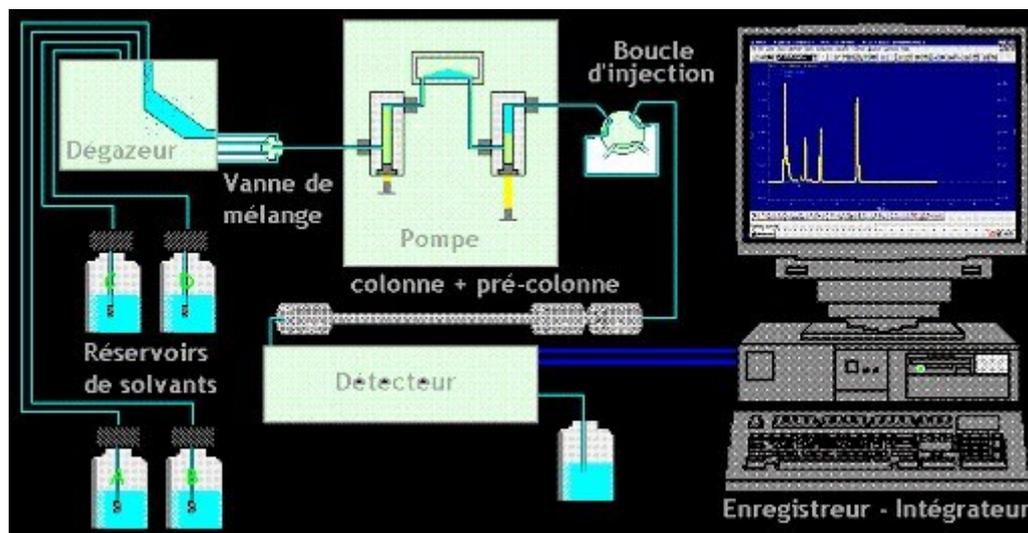


Figure II.9: Schéma général d'un système HPLC

1. Réservoir de phase mobile : (un ou plusieurs réservoirs de phase mobile)

Un réservoir de solvant (éluant) qui contient la phase mobile en quantité suffisante mode ISOCRATIQUE OU Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluion

(mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) mode GRADIENT, à l'aide de la pompe.

2. Système de pompage: La pompe est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler :

➤ en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.

➤ en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant. Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques microlitres/mn à plusieurs ml/min.

3. un système d'injection (vanne d'injection) : Le système d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative, il est constitué le plus souvent d'une vanne d'injection, la boucle d'injection (capacité de 5 à 5000 μ l).

4. Colonnes : Les colonnes de HPLC sont usuellement en acier inoxydable. La plupart des colonnes ont une longueur de 5 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 mm. La colonne est souvent précédée pour augmenter sa durée de vie, d'une pré-colonne dite colonne de garde, courte de 1cm, qui retient les composés indésirables. On change périodiquement cette pré-colonne, bien qu'il soit par ailleurs conseillé de faire passer les échantillons avant analyse à travers un filtre de porosité inférieure à 0,5 μ m

5. Détecteurs : Permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés, dans un mélange.

- a) Spectrophotomètre UV-Visible
- b) Détecteur à fluorescence
- c) Détecteur réfractométrique

3. Phase stationnaire

Les phases stationnaires en CLHP sont très variées:

- **HPLC d'adsorption** : La phase stationnaire est constituée d'un solide polaire et adsorbant : silice non greffée, silice greffée polaire..... la phase mobile est un éluant isocratique apolaire ou un gradient de polarité.
- **HPLC phase inversée** : La phase stationnaire est un solide apolaire, c'est une silice greffée apolaire, par exemple une silice greffée 18 carbones, la phase mobile est un éluant isocratique, ou un gradient de polarité.
- **HPLC d'exclusion** : La phase stationnaire est un solide poreux, silice poreuse à groupements silanol bloqués ou supports organiques. La phase mobile est un éluant isocratique inerte.
- **HPLC ionique** : La phase stationnaire est une silice greffée chargée ou un support acrylique chargé. La phase mobile est un gradient de pH ou de force ionique.

5. Applications

Les domaines d'applications sont nombreux et vastes, l'HPLC est particulièrement employée en cosmétologie ou en biochimie.

- elle permet l'analyse de substances thermiquement instables, puisqu'opération s'effectue à T° ambiante
- L'analyse de substances peu volatiles.
- L'analyse des substances ionisés (protéines, acides aminés...)

II.12. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

1. Définition

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation dont les principes généraux sont les mêmes que ceux énoncés pour la chromatographie en général, c'est-à-dire fondés sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser au travers d'un substrat choisi. La particularité du procédé est d'opérer en totalité sur des produits volatilisés, ce qui implique de maintenir une température minimale convenable, mais sans qu'il y ait volatilisation du substrat, et de travailler en circuit étanche aux gaz.

2. Principe

La chromatographie en phase gazeuse est une transposition de la chromatographie sur colonne dans laquelle la phase mobile liquide a été remplacée par un gaz.

La CPG gaz-solide est une chromatographie d'adsorption, la phase stationnaire étant un solide adsorbant, la migration différentielle est assurée par les différences d'adsorbance.

La CPG gaz-liquide est une chromatographie de partage, la phase stationnaire étant un liquide non volatil réparti sur un support inerte. Le gaz vecteur est le gaz qui véhicule les solutés, la migration différentielle est obtenue par les différences de solubilité dans le liquide fixe. Le soluté se partage entre le gaz vecteur et le liquide stationnaire.



Figure II.10: Schéma général d'un système HPLC

2.1. Alimentation en gaz vecteur (phase mobile) par bouteille à haute pression

Le gaz vecteur peut être de l'hélium, de l'azote, de l'hydrogène ou de l'argon, son choix dépend de facteurs tels que la disponibilité, la pureté, la consommation et le type de détecteur utilisé (avec des détecteurs à conductivité thermique, on choisit l'hélium en raison de sa conductivité thermique élevée par rapport à la plupart des vapeurs de composés organiques).

L'alimentation en gaz vecteur à haute pression implique des débitmètres et des régulateurs de pression, l'efficacité de l'appareil dépend beaucoup du maintien d'un

débit constant du gaz vecteur

2.2. Injecteur

Les échantillons liquides sont injectés à l'aide d'une micro-seringue graduée dans la chambre de vaporisation, au travers d'un bouchon généralement constitué de téflon, la température doit être suffisante à l'entrée de l'échantillon pour permettre une vaporisation du liquide sans que l'échantillon se décompose ou que s'effectue une séparation partielle des constituants, en règle générale on choisit la température d'ébullition du constituant le moins volatil, pour plus d'efficacité, on prélèvera le plus faible volume d'échantillon (1 à 10 μ l) qui soit compatible avec la sensibilité du détecteur.

2.4. Nature d'échantillon injecté

Le traitement de l'échantillon varie selon les substances analysées :

- Lorsque les solutés à analyser sont directement volatilisables, les substances sont extraites, purifiées, solubilisées dans un solvant volatil pur et chromatographies.
- Lorsque les solutés ne sont pas volatils à la température du chromatographe ou bien sont décomposés à cette température, il faut les transformer avant l'analyse en dérivés volatils stables ; les acides aminés sont estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés...

2.5. Colonne

La colonne est placée dans un four fermé à thermostat pour maintenir la température constante à 0,5°C près et pour que les conditions soient reproductibles. Cette température peut être choisie dans une gamme allant de la température ambiante jusqu'à plus de 400°C et pour une opération isotherme.

Les colonnes remplies (classiques): Constituées de tubes ayant jusqu'à 5m de long, de 2 à 4 mm de diamètre intérieur, en verre, en métal (aluminium, acier inoxydable ou cuivre) ou en plastique résistant aux hautes températures (téflon).

Les colonnes capillaires :

Les premières colonnes capillaires en quartz étaient préparées en revêtant la surface interne d'un tube de silice vitreuse, de 50m de longueur et de 0,22 mm de diamètre intérieur.

2.4. Détecteur

Placé à la sortie de la colonne de séparation, leur fonction est de détecter et de mesurer, après séparation la présence de petites quantités de constituants dans l'éluat de la colonne. Les résultats sont envoyés à un appareil qui trace une courbe appelée chromatogramme. Le choix du détecteur dépend de plusieurs facteurs tels que le niveau des concentrations à mesurer et la nature des constituants séparés. On distingue trois types de détecteur :

-  Détecteur à ionisation de flamme.
-  Détecteur à capture d'électron.
-  Détecteur à cathétomètre

3. Applications

-  Détection des traces (toxicologie, la répression des fraudes...)
-  Dosages en biologie (stéroïdes, acides gras, oses...)
-  Microbiologie (analyse des produits de fermentation, taxonomie ...)