

LA CHROMATOGRAPHIE

1: GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE

La **chromatographie** Elle est utilisée 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, etc., et de celles des deux phases.

La chromatographie est utilisée pour connaître la concentration de chaque composé d'un mélange (qualité et quantité) et même leur structure quand elle est couplée (GC-MS, LC-MS, LC-RMN, etc.).

Histoire

Le botaniste russe **Mikhail Tswett (1872-1919)** fut, en 1906, le premier à utiliser le terme *chromatographie*.

À partir de 1903, **Tswett** utilisa des colonnes d'adsorption pour séparer des pigments de plantes. On spécula donc l'étymologie du mot *chromatographie* à partir du **grec *chrôma***- pour couleur et donc pigment.

Principe

La chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire. Celle-ci retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon dilué selon l'intensité des forces d'interactions de faible énergie (comme les forces de van der Waals, les liaisons hydrogène, etc.) réalisées entre les différentes espèces moléculaires et la phase stationnaire.

Il existe de nombreux types de chromatographie ; on peut notamment les classer selon la nature de la phase mobile :

- la chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC en anglais) également appelée CPV (chromatographie en phase vapeur) ;
- la chromatographie en phase liquide (CPL ou LC en anglais) ;

- la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP ou HPLC en anglais) ;
- la chromatographie en phase supercritique ou fluide supercritique (CPS ou SFC en anglais).

On peut aussi les nommer selon les interactions développées par la phase stationnaire :

- la chromatographie chirale (qui est, soit de la CPG, soit de la CPL) ;
- la chromatographie d'exclusion stérique (CES ou SEC en anglais).

Ou selon le support de la phase stationnaire :

- la chromatographie sur colonne (regroupant notamment HPLC et CPG) ;
- la chromatographie planaire (qui recouvre chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie sur papier) ;

A. SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non miscibles: l'une mobile et l'autre stationnaire. En chromatographie les constituants d'un mélange se partagent entre les deux phases: l'une phase mobile et l'autre stationnaire (figure 1.1 mais où la répartition entre les deux phases peut être différente). Ce phénomène est dynamique, les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre; ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier. À ce moment le rapport des concentrations est égal au rapport des répartitions dans les deux phases ou coefficient de partage λ .

$$\lambda = C_s/C_m$$

où C_s = concentration dans la phase stationnaire

C_m = concentration dans la phase mobile

Plus λ est grand, plus le composé est absorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement.

La valeur de λ dépend - de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des phases

- de la nature de la phase stationnaire qui est un adsorbant ou un solvant pour chacun des composés
- de la phase mobile, seulement si elle est un liquide, et donc un solvant pour chacun des composés
- de la température qui affecte les pressions de vapeur et les solubilités

B. CLASSIFICATION DES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES SELON LES PHASES MOBILES ET SELON LES MÉCANISMES DE SÉPARATION

(http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm)

Chromatographie en phase gazeuse		
Phase mobile/ Phase stationnaire	type	phase stationnaire
gaz/solide (CGS)	adsorption	solide poreux
gaz/liquide (CGL)	partage (partition)	dans les colonnes remplies, solide poreux inerte enrobé de liquide
		dans les colonnes capillaires, paroi interne de la colonne qui sert de support

Chromatographie en phase liquide		
Phase mobile/ Phase stationnaire	type	phase stationnaire
liquide/solide (CLS)	adsorption	solide poreux
	échange d'ions	solide à la surface duquel se trouvent des sites ioniques qui permettent à l'aide d'un solvant approprié l'échange d'ions présents dans la phase mobile
	exclusion stérique (filtration sur gel, perméation de gel)	solide dont la dimension des pores permet la séparation des espèces selon leur taille
liquide/liquide (CLL)	partage phase normale	solide poreux inerte enrobé de liquide (de moins en moins utilisée)
	partage phase inversée	solide poreux sur lequel sont greffées des chaînes hydrocarbonées non-polaires

C. SÉPARATION EN CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

En chromatographie d'adsorption, la répartition des molécules se fait entre la phase mobile et la surface de la phase stationnaire qui n'est pas liquide, donc qui ne joue pas le rôle de solvant. La figure 1.1 représente le mécanisme de l'adsorption et de la désorption.

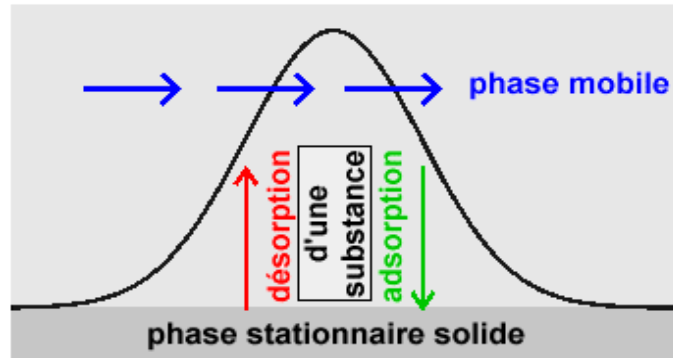


Figure 1.1. Répartition des molécules entre les deux phases dont l'une est solide. Ici les molécules sont adsorbées à la surface du solide. (

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm)

Les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogène, etc., jouent aussi un rôle dans l'affinité qu'ont les molécules pour l'une ou l'autre phase.

La phase mobile

La phase mobile peut être un gaz (gaz vecteur) ou un liquide (ou solvant). Si la phase mobile est un gaz elle ne sert qu'à entraîner les constituants à travers la colonne. Si la phase mobile est un liquide elle a un double rôle : celui d'entraîner les composés à travers la colonne et celui de solubiliser les constituants du mélange.

D. SÉPARATION EN CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

Différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non miscibles; l'une mobile et l'autre stationnaire constituée d'un liquide. Les différents composés d'un mélange sont entraînés par une phase mobile à travers une couche d'absorbant qui est fixe. Ils se déplacent plus ou moins rapidement selon leur répartition entre les deux phases décrites plus haut. Plus leur répartition dans la phase stationnaire est grande plus leur rétention est grande et inversement. L'affinité de chaque constituant pour la phase stationnaire dépend de sa solubilité dans cette phase et de sa polarité. Les forces qui entrent en jeu sont donc les forces de Van der Waals, les ponts hydrogène, etc.

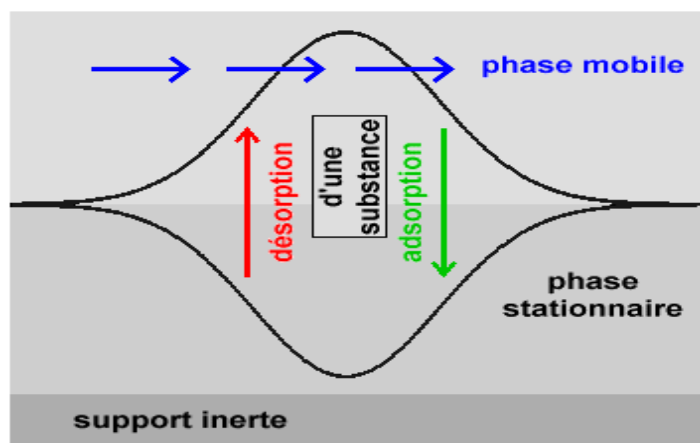


Figure 1.2. Répartition (elle peut être différente) des molécules d'un composé entre les deux phases. L'absorption se produit devant le pic et la désorption derrière.

(http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm)

La phase stationnaire en chromatographie de partage doit être chimiquement inerte, c'est-à-dire qu'elle ne doit réagir avec aucun des constituants du mélange au cours de la séparation.

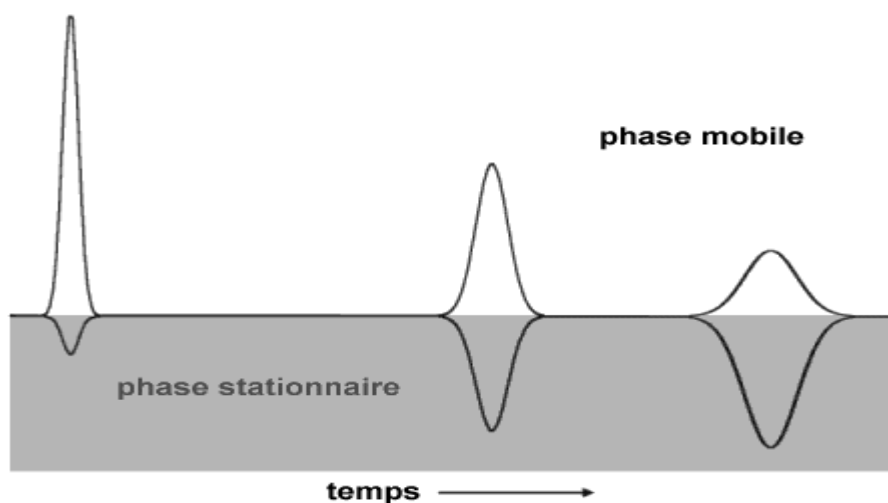


Figure 1.3. Migration de trois composés en fonction de leur répartition entre les deux phases. Plus l'affinité des différents constituants pour la phase stationnaire est grande plus leur rétention est grande et inversement. Un constituant plus soluble qu'un autre dans la phase stationnaire est retenu davantage et migre plus lentement.

(http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm)

E. ÉQUILIBRE EN CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE - ISOTHERMES

Si un composé se partage d'une manière égale entre la phase mobile et la phase stationnaire, comme le montre la figure 1.4 a, il apparaît sous la forme d'un pic parfaitement symétrique. Ce qui signifie que le partage (absorption dans la phase stationnaire ou adsorption) se réalise dans des conditions idéales. En réalité, la plupart du temps, les pics en chromatographie se présentent sous des allures bien différentes en figures 1.4 b et c.

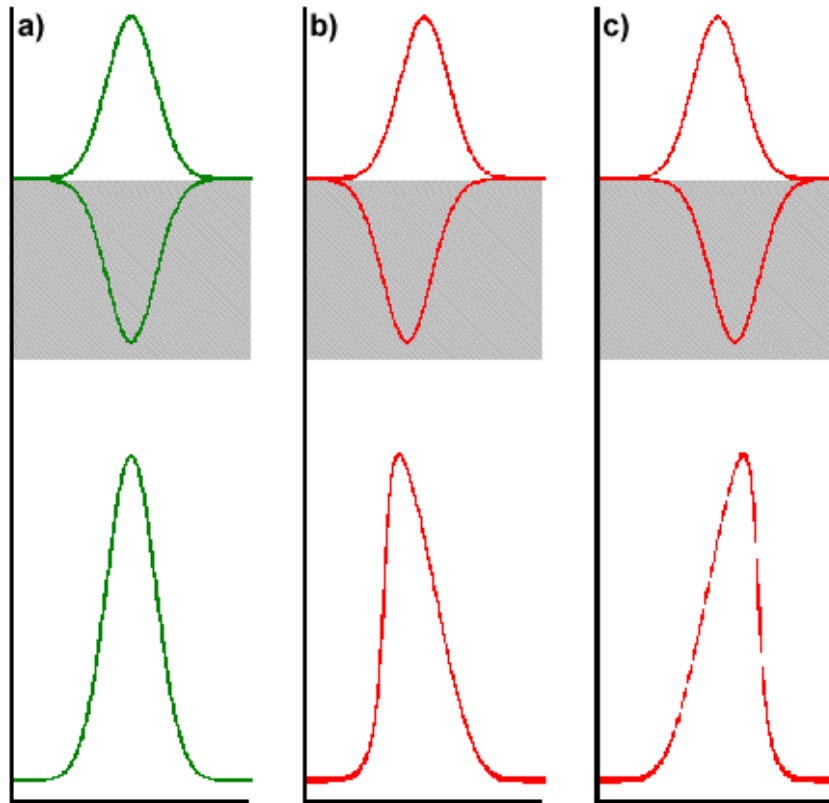


Figure 1.4. a) le composé se partage également entre les deux phases;
b) le composé est absorbé trop rapidement dans la phase stationnaire, il migre trop vite et laisse un effet de queue;
c) le composé est absorbé trop lentement dans la phase stationnaire, sa migration est trop lente. http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm

F. GRANDEUR DE RÉTENTION ET RÉOLUTION

1. Le volume ou le temps de rétention

Soit la séparation de deux composés par chromatographie de partage (**figure 1.5**). Un des paramètres les plus importants en chromatographie sur colonne est le volume de rétention qui s'exprime comme :

$$V_r(\text{ml}) = t_r(\text{sec}) \cdot D(\text{ml/sec})$$

où t_r = temps de rétention

D = débit de la phase mobile

et pour un soluté non retenu, ce volume devient:

$$V_m(\text{ml}) = t_m(\text{sec}) \cdot D(\text{ml/sec})$$

où V = volume mort

t_m = temps de rétention

D = débit de la phase mobile

Le temps de rétention est habituellement utilisé à la place du volume de rétention et sa grandeur dépend:

- de la nature de la phase stationnaire
- de la nature de la phase mobile
- du débit de la phase mobile
- de la longueur de la colonne

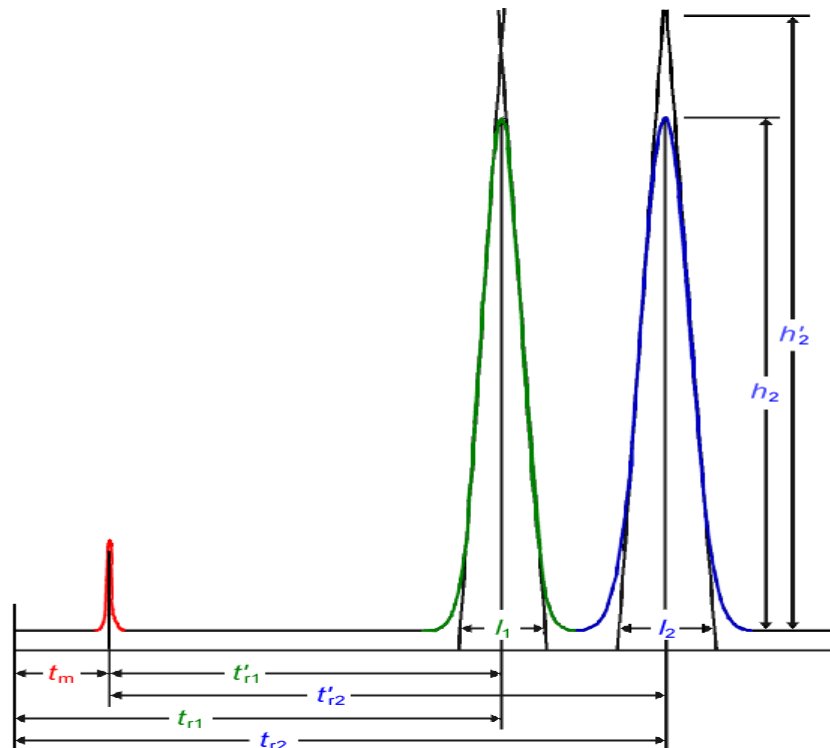


Figure 1.5. Chromatogramme typique montrant la séparation de deux constituants d'un mélange et les différents paramètres mesurables.

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm

où :

- t_m = temps de rétention d'une substance non retenue sur la colonne,
- t_r = temps de rétention,
- t'_r = temps de rétention corrigé par rapport à t_m ($t'_r = t_r - t_m$),
- l = largeur du pic à la base,
- h = hauteur du pic,
- h' = hauteur corrigée du pic

2. Le facteur de capacité k'

Ce facteur s'apparente au coefficient de partage puisqu'il 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. Il a l'avantage de ne dépendre ni du

débit ni de la longueur de la colonne. Il est facilement calculé pour une substance dont le temps de rétention est t_r par l'expression:

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

3. Le facteur de sélectivité α

Il mesure la capacité de la colonne à séparer les maxima des pics. Plus elle est supérieure à 1, plus les temps de rétention sont éloignés.

Ce facteur de sélectivité ou de séparation, sans dimension, est égal au rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser la séparation. Il s'exprime comme ceci :

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

où k'_2 = facteur de capacité du composé 2
 k'_1 = facteur de capacité du composé 1
 t_{r2} = temps de rétention du composé 2
 t_{r1} = temps de rétention du composé 1
 t_m = temps de rétention d'une substance non retenue

4. La résolution R

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics:

- la distance séparant les sommets de deux pics mesurée par $t_{r2} - t_{r1}$;
- la largeur des pics à la base l.

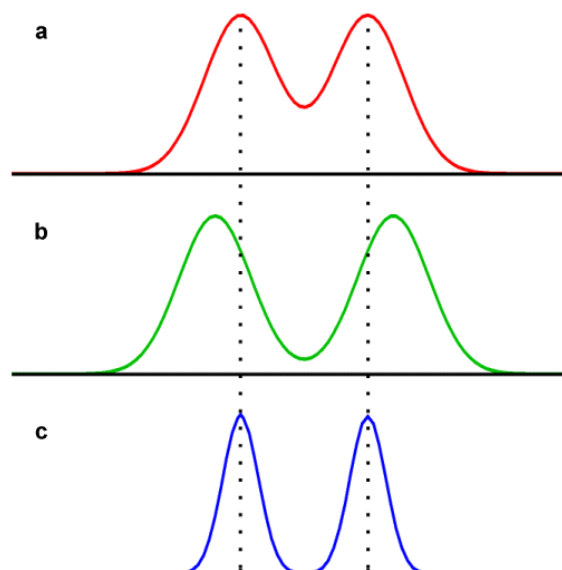


Figure 1.6. a) les pics se recouvrent; b) la distance séparant les sommets des pics est plus grande mais les largeurs à la base sont les mêmes qu'en a); c) la distance séparant les sommets des pics est égale à celle trouvée en a) mais les largeurs à la base sont plus petites qu'en a).

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm

Comme le montre la figure 1.6, la séparation idéale est réalisée en c) où la valeur de **R** est un peu plus grande que 1. Pour des valeurs de **R** beaucoup plus grande que 1, la séparation des pics n'est pas meilleure mais le temps de la séparation devient inutilement long. Si **R** = 1, les 2 pics se chevauchent.

Exprimée en termes de volume de rétention, la résolution est égale à

$$R = 2 \left(\frac{V_{r2} - V_{r1}}{I_2 + I_1} \right)$$

Exprimée en termes de temps de rétention, la résolution est égale à

$$R = 2 \left(\frac{t_{r2} - t_{r1}}{I_2 + I_1} \right)$$

5. Le nombre de plateaux théoriques N

C'est un paramètre qui sert à mesurer la performance d'une colonne à distillation fractionnée. Autant il est souhaitable dans une distillation fractionnée d'avoir le plus de distillations simples possibles pour obtenir la meilleure séparation des constituants d'un mélange autant il est souhaitable que le passage d'une substance de la phase mobile à la phase stationnaire et inversement se fasse sur la distance la plus courte possible. Le nombre de fois que ce phénomène se passe correspond à un plateau théorique.

$$N = 16 \left(\frac{t_r - t_m}{I} \right)^2 \quad \text{où } I = \text{largeur du pic à la base}$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_r - t_m}{W} \right)^2 \quad \text{où } W = \text{largeur du pic à mi-hauteur}$$

La hauteur équivalente à un plateau théorique **h** est

$$h = \frac{L_c}{N} \quad \text{où } L_c = \text{longueur de la colonne} \\ \text{et } N = \text{nombre de plateaux théoriques}$$

L'équation de la résolution **R** vue plus haut est très utile pour mesurer le degré de séparation mais ne relie pas les paramètres fondamentaux de la chromatographie, sélectivité, facteur de capacité et nombre de plateaux théoriques à la résolution.

C'est pourquoi on utilise:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_1} \times 2 \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \right) \times 2 \frac{\bar{k}'}{(1 + k'_1) + (1 + k'_2) \times \sqrt{N_1/N_2}}$$

où \bar{k}' = est la moyenne arithmétique des facteurs de capacité des 2 substances

6. Variation de R avec α

Si $\alpha = 1$, il n'y a pas de séparation quelle que soit la valeur de N.

Si α passe de 1,1 à 1,2, la valeur de R double.

Si $\alpha > 2$, la valeur de R ne change presque pas comme le montre la figure 1.7.

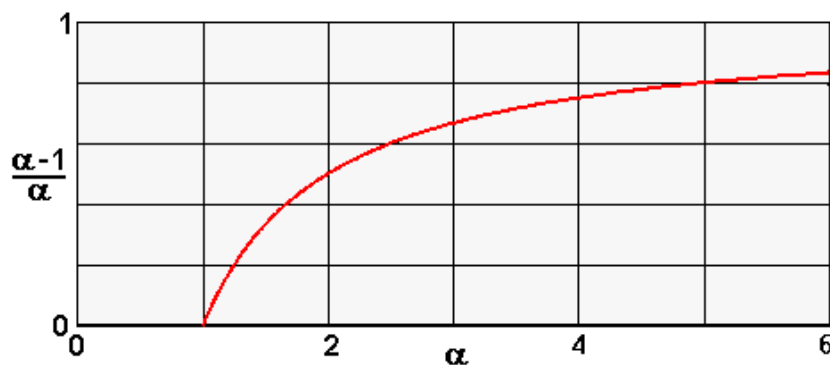


Figure 1.7. Variation de R avec α .

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm

7. Variation de R avec k'

Si $k' = 0$, $R = 0$.

Si k' augmente, R augmente mais si k' devient très grand, $\frac{k'}{1+k'}$ approche l'unité et n'influence plus R.

À ce moment le temps de rétention devient très long et le pic de plus en plus large (figure 1.8).

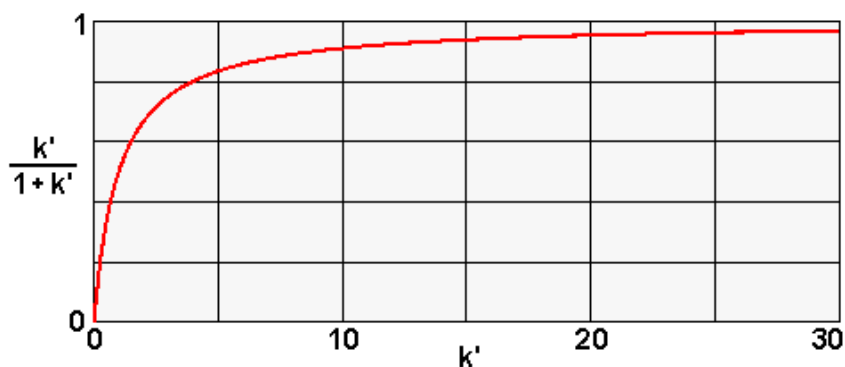


Figure 1.8. Variation de R avec k' .

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm

Variation de R avec N La valeur de **R** est proportionnelle à la racine carrée du nombre de plateaux théoriques. Si la longueur de la colonne est multipliée par 2, **R** est multiplié par 1,4. Cependant, N demeure un facteur important dans le processus de séparation des pics en chromatographie.

8. Facteurs dépendant des conditions d'opération

a) Le débit du gaz vecteur (phase gazeuse) ou du solvant (phase liquide)

La hauteur d'un plateau théorique h peut être affectée par la vitesse du gaz vecteur ou son débit. En effet plus le débit du gaz vecteur est grand, plus le soluté migre rapidement et inversement car le débit modifie le coefficient de partage. Cette relation entre débit ou vitesse moyenne du gaz vecteur et la hauteur d'un plateau théorique moyenne h a été mise en évidence par Van Deemter (équation et figure ci-après).

$$\bar{h} = A + \frac{B}{V_m} + C \times V_m$$

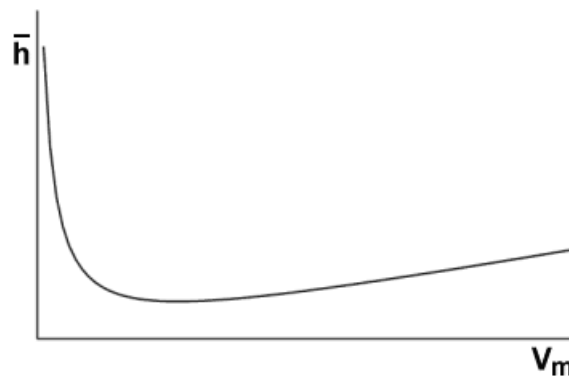
où A, B et C = constantes

V_m = vitesse moyenne du gaz vecteur

A dépend de la diffusion tourbillonnaire dans les canaux formés par les grains du support (colonnes remplies). A est inexistant dans une colonne capillaire.

B est le facteur de la diffusion moléculaire dans la phase gazeuse.

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



Courbe de Van Deemter. Variation de la hauteur d'un plateau théorique en fonction du débit du gaz vecteur.

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm

1: CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ET SUR COUCHE MINCE

La chromatographie sur papier (ou sur couche mince) est une technique de **chromatographie en phase liquide**. Pour effectuer une telle séparation, une petite quantité de la ou des solutions à analyser est déposée sur le bord d'une bande de papier de chromatographie (ou plaque CCM). Cet échantillon est **adsorbé** par le papier ; ce qui signifie que les molécules interagissent avec ce dernier et qu'elles auront tendance à rester au même endroit.

Le papier est ensuite trempé dans un solvant (éluant : phase mobile) comme un mélange **eau/éthanol** et placé dans un récipient fermé. Pendant que le solvant (éluant) monte le long du papier par capillarité, il rencontre l'échantillon et l'entraîne.

Les différentes substances constituant l'échantillon migrent à différentes vitesses selon qu'elles interagissent plus ou moins fortement avec le papier.

Une fois l'opération terminée, généralement quand le front de solvant (éluant) est presque arrivé en haut du papier, le papier est retiré de la cuve et on laisse évaporer le solvant. Le résultat est appelé **chromatogramme**.

Il y a plusieurs façons d'identifier les endroits où se trouvent les produits ainsi séparés :

1. les produits sont colorés (absorbent dans le visible), rien de spécial à faire.
2. les produits sont fluorescents, on peut les identifier sous une lampe ultraviolette.
3. sinon, il faut utiliser un révélateur (l'iode par exemple) qui réagira chimiquement avec les produits (en les transformant) et dont le résultat sera des taches apparentes.

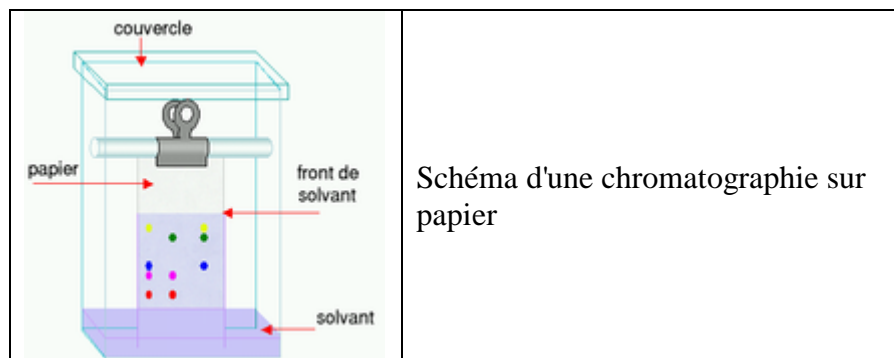
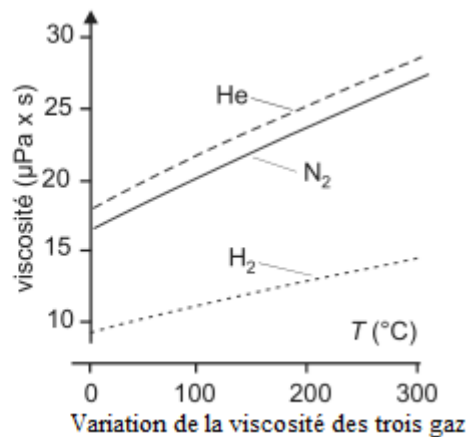
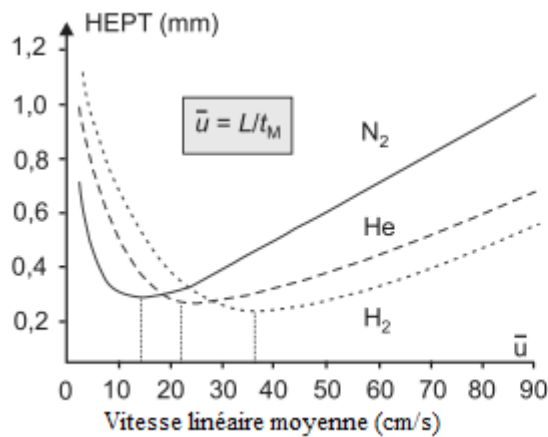


Schéma d'une chromatographie sur papier

2: CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Cette technique a été développée par Archer John Porter Martin, Richard Laurence Millington Synge, lauréats du Prix Nobel de chimie 1952 pour l'invention de la chromatographie de partage.

Dans cette technique la phase mobile est constituée d'un neutre dit gaz vecteur. Ce dernier ne modifie pas de manière significative les valeurs des coefficients de distribution K des composés car il n'existe aucune interaction entre gaz et solutés, la température étant le seul facteur de modification important. En revanche, la viscosité et la vitesse du gaz dans la colonne ont une influence sur la dispersion des composés dans la phase stationnaire et sur la diffusion dans la phase mobile (équation de Van Deemter) et par conséquent sur le paramètre d'efficacité N et sur la sensibilité de la détection (figure ci-après).



1. Schéma d'appareillage

Un appareil de CPG comprend schématiquement 3 modules spécifiques : un injecteur, une colonne contenue dans un four thermostaté et un détecteur relié à un intégrateur ou un ordinateur sur lequel apparaît le chromatogramme.

Le mélange à analyser est injecté sous forme d'un fluide et est vaporisé dans l'injecteur. Le gaz vecteur l'entraîne dans la colonne. Les composés se répartissent différemment dans les 2 phases (stationnaire et mobile), se déplacent donc à des vitesses différentes puis sortent à des temps différents. A leur sortie, ils sont détectés et un pic apparaît sur l'enregistreur (chromatogramme).

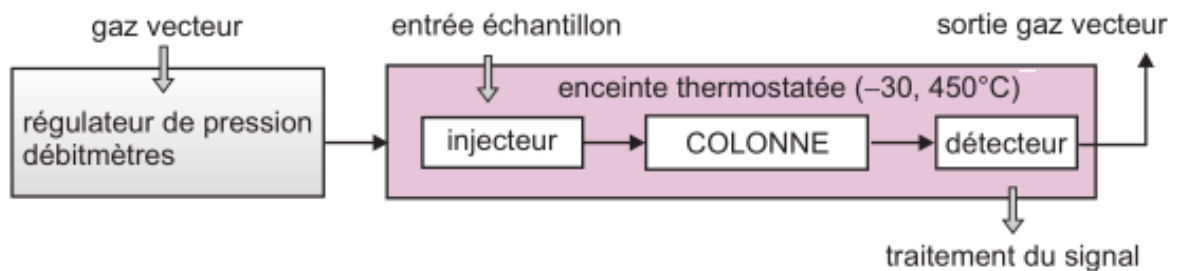
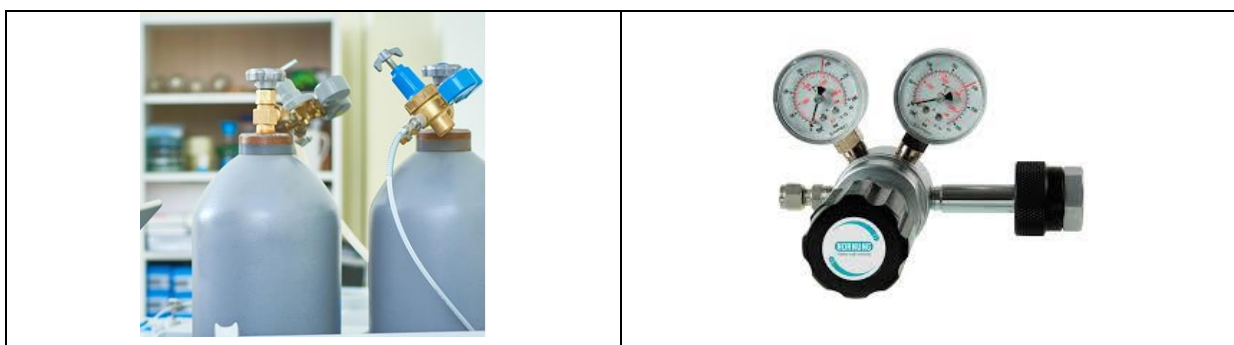


Schéma d'un appareil à chromatographie en phase gazeuse.

Le gaz vecteur le plus utilisé est l'hélium, les autres sont l'hydrogène, l'azote ou l'argon. Il doit être très pur et surtout ne contenir ni oxygène, ni eau. Le débit du gaz est ajusté par un régulateur de pression (ou manomètre, figure ci-après).

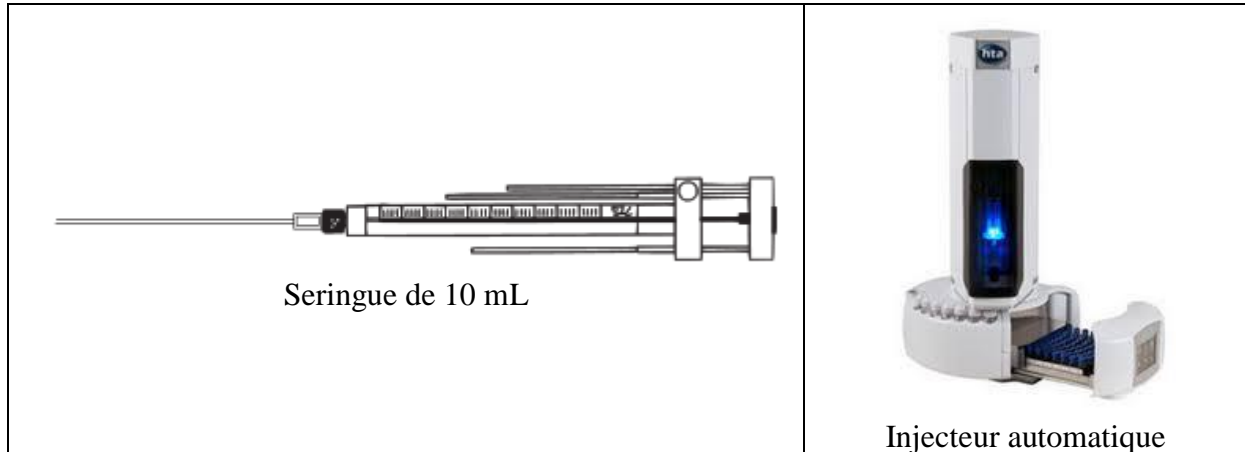


Régulateur du débit du gaz vecteur

2. Injecteur

Il permet : l'introduction de l'échantillon, son évaporation et son entraînement par le gaz vecteur vers la colonne : un volume précis est injecté dans l'injecteur qui va vaporiser le liquide et permettre le transfert de l'échantillon vaporisé vers la colonne de chromatographie. Cette injection est faite dans un tube chauffé. Le gaz vecteur arrive par l'une des extrémités du tube et entraîne les solutés vaporisés vers la colonne raccordée à l'autre extrémité.

a) L'injection : se fait par le biais d'une seringue de faible volume (microseringue de 1 à 10 μL) ou d'un injecteur automatique (figure ci-dessous).



L'aiguille de la microseringue entre dans l'injecteur en traversant un septum (une pastille d'élastomère siliconé) qui évite les fuites de gaz au niveau de l'entrée. L'état du septum doit régulièrement être contrôlé.

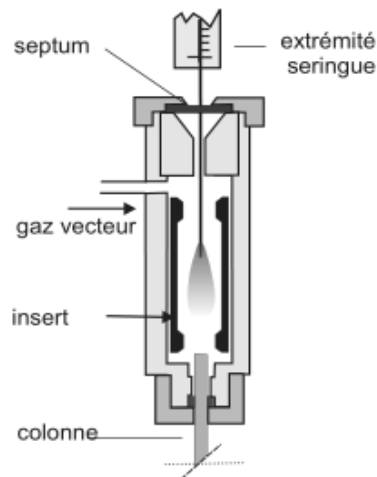
b) Température de l'injecteur : L'injecteur est thermostaté à une certaine température de manière à ce que le solvant et les différents solutés de l'échantillon soient vaporisés.

Pour éviter la condensation des produits injectés. $T^{\circ}_{\text{injecteur}} = T^{\circ}_{\text{produit le moins volatil}} + 20^{\circ}\text{C}$

c) Différents types d'injecteurs : Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes utilisées. D'autre part, la qualité des séparations dépend de cette phase de l'analyse.

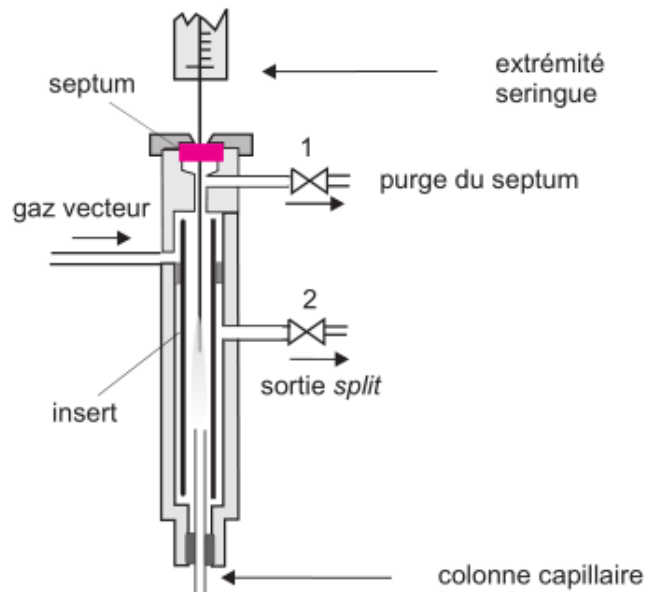
- **Injecteur à vaporisation directe :**

Ce type d'injecteur est utilisé pour les colonnes remplies et les colonnes capillaires de gros diamètre. Tout l'échantillon introduit par la seringue est entièrement entraîné dans la colonne.



- **Injecteur avec système de fuite :**

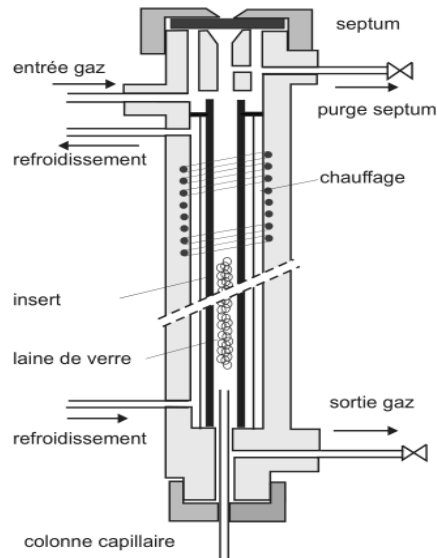
Une grande partie de l'échantillon injecté, vaporisé et mélangé au gaz vecteur est éliminée de l'injecteur par une vanne de fuite. Ainsi, une petite fraction du mélange pénètre dans la colonne. Il existe deux modes selon que l'on injecte vanne de fuite ouverte (mode split) ou vanne fermée pendant environ 1 minute après l'injection (mode splitless).



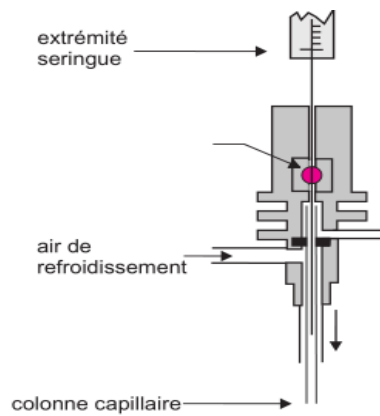
- **Injecteur à température programmable (PTV) :**

Le mélange est introduit liquide dans l'injecteur à froid puis l'injecteur est chauffé en mode split ou splitless pour vaporiser les composés.

L'injecteur PTV permet de faire des gradients rapides de température, la chambre d'injection est entourée d'une résistance et d'une circulation de gaz froid.



- **Injection à froid dans la colonne :** le mélange est injecté directement froid et liquide dans la colonne.



3. Four

La colonne est placée dans une enceinte chauffée appelée four dont la température peut-être réglée au $1/10^{\text{ème}}$ de °C près.

La température du four peut-être :

- stable et identique du début à la fin de la manipulation (= conditions isothermes)
- programmée par palier successif (= en gradients).

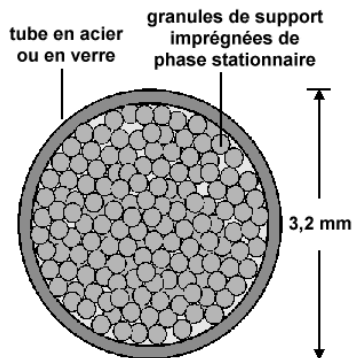


Four thermostaté contenant la colonne

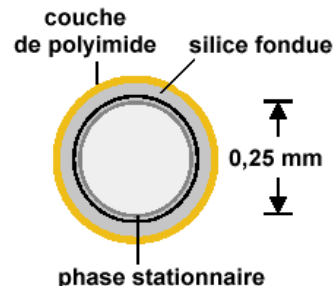
B. COLONNES

Il existe deux types de colonnes avec des variantes:

- colonnes remplies ou à garnissage (packed);
- colonnes capillaires (open tubular).



Colonne remplie



Colonne capillaire.

Caractéristiques des colonnes remplies ou à garnissage (packed)

- diamètre interne : 3,2 mm ou 6,4 mm
- longueur : 0,5 à 3 mètres
- tube : acier inoxydable - assez inerte et bon conducteur de chaleur
- verre - inerte mais mauvais conducteur de chaleur

1. Garnissage pour chromatographie gaz-solide

Granulé polymérique de gel de silice traitée à très haute température ou par un procédé hydrothermique par lequel il est possible d'obtenir des pores de dimensions voulues. La surface de ce matériel poreux peut atteindre 500 m²/g.

Polymère organique du type éthylvinylbenzène-divinylbenzène qui possèdent des pores dont le diamètre varie de 0,0075 à 0,8 mm.

2. Garnissage pour chromatographie gaz-liquide

Support solide poreux et inerte, imprégné d'un liquide non volatil appelé phase stationnaire qui peut être de nature diverse.

Nature du support : surtout gel de silice

L'efficacité des colonnes remplies est limitée par:

- la dispersion des molécules du soluté dans les diverses trajectoires à travers les grains;
- la différence de rétention provenant de la non uniformité de la répartition de la couche stationnaire sur les grains.

3. Caractéristiques des colonnes capillaires

- Diamètre interne : les différents diamètres sont donnés sur le tableau suivant.

- Longueur : 15 à 100 mètres
- Tube : silice fondue recouvert d'une mince couche de polyimide

L'efficacité des colonnes capillaires ne dépend que de la vitesse de passage dans la phase stationnaire.

Tableau : Quelques caractéristiques des colonnes remplies et colonnes capillaires (http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm)

Diamètre interne (mm)	Capacité ^a (ng)	N/m ^c	Débit optimal (ml/mn)
0,20	5-30	5000	0,40
0,25	50-100	4170	0,70
0,32	400-500	3330	1,40
0,53	1000-2000	1670	2,50
0,75	10000-15000	1170	5,00
2,00 ^b	20000-	2000	20,00

^a capacité en fonction de l'épaisseur de la couche de la phase stationnaire

^b colonne remplie, ^c N : nombre de plateaux théoriques

4. Choix des phases stationnaires

Ce choix se fait en fonction de la nature des substances à séparer. Des exemples sont donnés dans le tableau qui suit.

Tableau : Nature des substances à séparer en fonction de la phase stationnaire (http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm)

Molécules	Exemples	Phases stationnaires
non polaires liaisons C-H et C-C	hydrocarbures normaux (n-alcanes)	SPB-octyl
		poly(méthylsiloxane), SE-30
		SPB-5, PTE-5, SE-54
polaires liaisons C-H et C-C liaisons C-Cl, -Br, -F liaisons C-N, -O, -P, -S	alcools, éthers, thiols, amines, acides carboxyliques, esters et cétones	poly(méthylphénylsiloxane)
		poly(cyanopropylméthylsiloxane)
		PEG, Carbowax 10, 20M
polarisables liaisons C-H et C=C et acétyléniques	alcènes aromatiques	poly(cyanopropylsiloxane)
		poly(cyanopropylphénylsiloxane)
		TCEP

C. DÉTECTEURS

1. Généralités

Ils peuvent être plus ou moins spécifiques des composés à détecter.
S'il n'y a pas de spécifications sur la notice de l'appareil

$$T^{\circ}_{\text{détecteur}} = T^{\circ}_{\text{produit le moins volatil}} + 20^{\circ}\text{C}$$

On détermine :

- Sa quantité minimale détectable (QMD)
- Sa sensibilité : correspond au rapport entre signal / concentration (mg/mL) ou entre signal / débit (mg/s)

Il existe différents types de détecteurs comme le montre le tableau ci-dessous :

DETECTEUR	Gaz vecteur	Linéarité	QMD	Sélectivité (spécificité)	Applications
Catharomètre	H ₂ /He	10 ⁵	1 à 10 ng	NS	Tous composés
FID	He/N ₂	10 ⁷	20 à 100 pg	NS	Composés organiques
Capture d'e ⁻	N ₂	10 ⁴	0,1 pg	S	Composés halogénés
Thermoionique	N ₂	10 ⁴	P : 1 pg / N : 10 pg	S	Composés avec N ou P
Photométrie de flamme	N ₂ /H ₂	10 ³	P : 10 pg S : 1 ng	S	Composés avec S ou P

2. Principes des principaux détecteurs

a) Détecteur à ionisation de flamme (FID)

Le plus utilisé pour les composés organiques et de grande sensibilité.

Les composés (gazeux) qui sortent de la colonne pénètrent dans la flamme du détecteur. Leur combustion entraîne la formation d'ions et de particules chargées qui sont alors collectés par 2 électrodes. Le courant très faible qui en résulte est fortement amplifié et transformé en une tension mesurable par un électromètre.

L'air du pic reflète la quantité de composé élué.

b) Détecteur à conductibilité thermique (TCD)

Détecteur universel mais de sensibilité moyenne. Il est formé d'un catharomètre composé de 2 thermistors (= filaments chauffés) dont un est balayé par le gaz vecteur seul et l'autre par le gaz en sortie de colonne; Quand un courant gazeux passe sur les filaments, ils sont refroidis en fonction de la température, du débit et de la nature du gaz; la température et le débit sont les mêmes pour le gaz arrivant sur les 2 filaments mais la présence d'1 composé en sortie de colonne modifie la nature du gaz qui alors refroidi moins le 2^{ème} filament. Il en résulte une variation de résistance proportionnelle à la concentration du composé.

c) Détecteur thermoionique (NPD) (détecteur catharomètre)

Spécifique aux composés azotés ou phosphorés. Un petit cylindre en céramique est chauffé par une résistance électrique à 800°C et est alimenté par un mélange air/hydrogène. Les composés contenant N et P sont décomposés en ions négatifs qui sont recueillis par une électrode collectrice reliée à un électromètre qui traduit le courant obtenu en un signal.

d) Détecteur à capture d'électrons (ECD)

Spécifique des dérivés halogénés et est très sensible. Une source radioactive émet des particules β et génère des électrons au contact d'un courant d'azote. Ces électrons produisent un courant constant qui diminue lors du passage de composés contenant un halogène (F, Cl, Br) car ces composés captent une partie des électrons provoquant une diminution du courant, celle-ci se traduit par un pic.

e) Détection par spectroscopie infrarouge

Cette détection peut se faire de deux façons. La première consiste en la condensation à froid de l'éluant gazeux sur du KBr et l'enregistrement des spectres des différents échantillons. Cette méthode, mieux adaptée aux appareils dispersifs ne permet pas d'obtenir le chromatogramme en temps réel.

Le développement des spectromètres à transformée de Fourier a permis de prendre les spectres des solutés pendant le temps de sortie des pics en faisant passer l'échantillon à travers un tube chauffé dans le faisceau infrarouge.

f) Détection par spectrométrie de masse

Le couplage du chromatographe et du spectromètre de masse technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, voire en traces. La différence des propriétés chimiques entre les différentes molécules dans un échantillon les sépare quand celui-ci se déplace le long de la colonne. Les molécules ainsi séparées sont captées par le spectromètre de masse puis ioniser, accélérer, dévier et détecter séparément.

g) autres

- détecteur à photométrie de flamme: sélectif pour S et P
- détecteur à photo-ionisation: l'envoi de photons (lampe UV) sur les composés entraîne leur ionisation.
- Détecteur à émission atomique
- Détecteur à torche à plasma (ICP)
- Couplage de plusieurs détecteurs en série.

3: CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE (CLHP ou HPLC en anglais)

Selon la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules de soluté, les séparations chromatographiques sont classées en 5 principaux types:

1. Chromatographie de partage en phase normale ou inversée,
2. Chromatographie d'adsorption,
3. Chromatographie d'exclusion stérique (Chromatographie de filtration sur gel, Chromatographie par perméation de gel),
4. Chromatographie sur échangeur d'ions (ou échangeuse d'ions),
5. Chromatographie d'affinité,
6. Electrochromatographie.

Dans le cas de la HPLC, une (**élution isocratique**) ou plusieurs (**élution par gradient**) pompes sont utilisées pour la circulation de la phase dite "mobile", c'est-à-dire le liquide circulant dans le système chromatographique.

Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit "**gradient**" ou "**élution graduée**" (en opposition au mode "**isocratique**", pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse). Par exemple, sur une colonne apolaire, en utilisant un mélange eau/méthanol comme phase mobile, les composants les plus hydrophobes sont élués avec une concentration élevée en méthanol alors que les composants plus hydrophiles sont élués préférentiellement avec une concentration faible en méthanol. Selon la nature de la phase stationnaire, on commencera par une concentration élevée en méthanol ou le contraire.

APPAREILLAGE

Un appareil de chromatographie en phase liquide comporte quatre parties : système de pompage, injecteur, colonne et détecteur à travers lesquelles un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer.

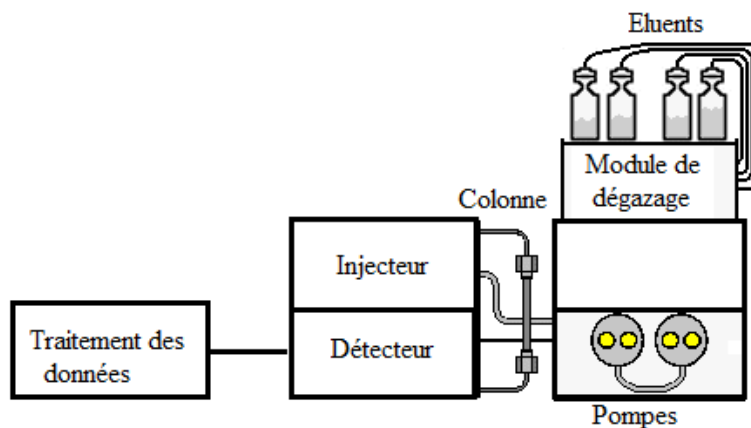


Schéma d'un appareil à chromatographie en phase liquide.

A. POMPES

Le dégazage de la phase mobile est une opération obligatoire en chromatographie phase liquide. Il se fait par barbotage d'Hélium dans la phase mobile.

Pompes à piston

Avantages :

- à débit constant, faible volume interne et débit continu;
- coût modéré à 1 tête; élevé à 2 têtes et plus;
- possibilité de gradient d'éluion;
- sans pulsation à 2 têtes et plus;
- permet le dégazage de la phase mobile en tout temps en y faisant barboter du He.

Inconvénients :

- si une seule tête, pulsations qu'on doit atténuer par des dispositifs appropriés qui sont des amortisseurs de pulsation mais qui introduisent un volume supplémentaire dans le système et augmentent, par conséquent, le temps nécessaire à un changement complet de phase mobile;
- entretien difficile.

B. INJECTEUR

- Boucle d'injection
- Injecteur seringue
- Extraction sur phase solide en ligne

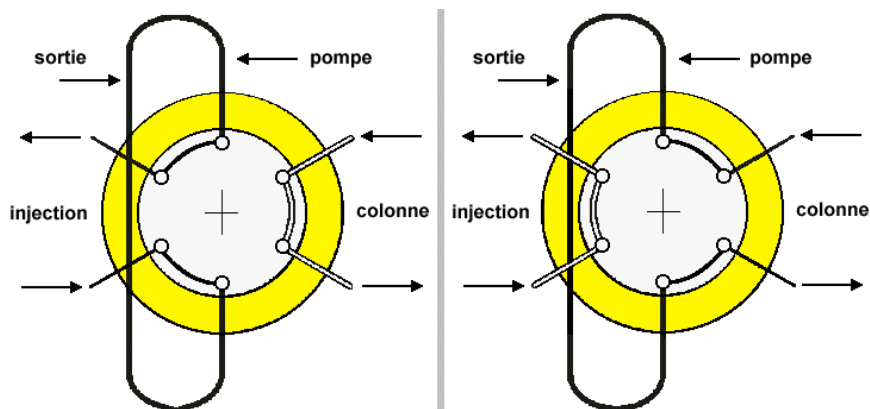
L'injecteur à boucle est le seul dont le fonctionnement sera décrit ici.

Avantages:

- permet des injections répétées qui donnent des résultats très reproductibles et donc adaptés aux analyses;
- ne comporte pas de septum;
- peut supporter des pressions qui dépassent 5000 psi.

Inconvénients :

- la boucle est difficile à remplir ;
- la boucle doit être changée si le volume injecté doit être modifié car la boucle possède un volume fixe.



Injecteur à boucle. À gauche, le remplissage de la boucle. À droite, l'injection dans la colonne.

(http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm)

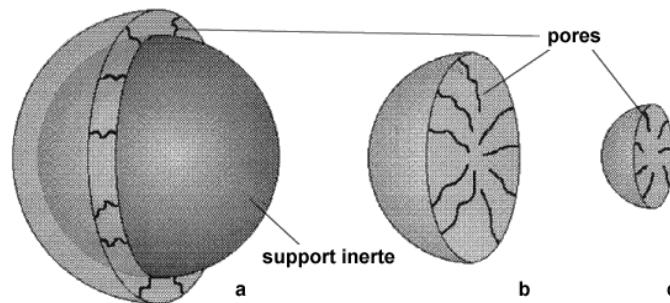
C. COLONNES

1. Chromatographie d'adsorption - chromatographie liquide-solide et sur résines échangeuses d'ions. Les différents type de supports sont donnés dans les tableaux C1 et C2

Tableau C1: Différents types de supports poreux

(http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm)

Support poreux		
support superficiellement poreux (figure a)	support poreux de faible diamètre (microparticules) (figure b) et figure c)	
30-45 mm avec pores peu profonds 1/30 à 1/40 de diamètre d'enveloppe poreuse - silice; - résines échangeuses d'ions. Surface 1 à 25 m ² /g	diamètre de 20 à 40 mm avec pores profonds - peu efficace	diamètre de 5 à 10 mm avec pores peu profonds - surface 200 à 400 m ² /g
avantages - transfert de masse rapide (vitesse d'échange élevée); - ne s'écrase pas sous la pression. désavantage - peu de capacité (faible k') à cause des pores peu profonds, ce qui diminue les possibilités de séparation.	avantages - permet l'utilisation de colonnes plus courtes et de pressions plus basses; - trajet réduit parcouru entre les particules; - remplissage en mélangeant avec le solvant; - capacité comparable à celle d'un support superficiellement poreux.	

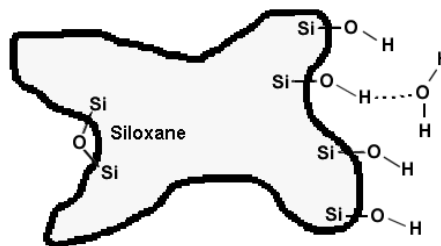


Nature des supports

- Silica gel comprend ou possède plusieurs types de fonction hydroxyles (voir figure) retient fortement les composés basiques comme les amines.

Les hydroxyles libres siloxane :

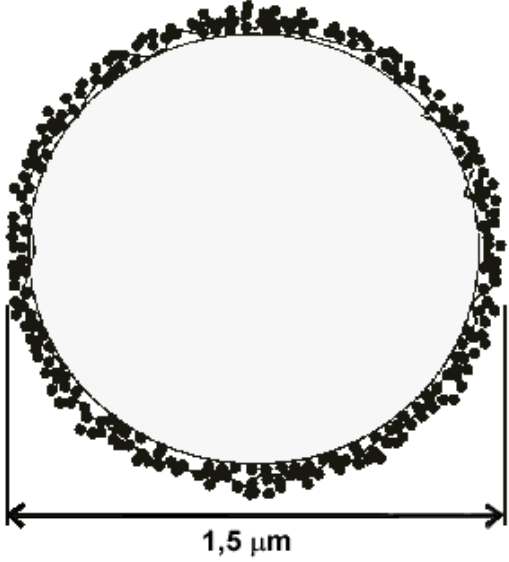
- peuvent provoquer de la chemisorption et par là des effets de queue;
- exigent de longues périodes de récupération. On doit quelquefois ajouter de l'eau pour désactiver ces sites.



Structure du silica gel

Tableau C2 : Support non poreux

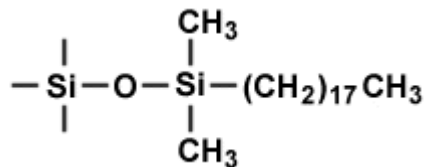
(http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm)

Support non-poreux	
<p>Puisque la surface de contact est beaucoup moins grande (la moitié) que celle de support poreux, le diamètre des granules sphériques doit être plus petit (entre 1 et 2 mm).</p> <p>Avantages: - conditionnement plus rapide en l'absence de pores;</p> <p>- temps de résidence sur la colonne est plus court, ce qui en fait un avantage dans le cas de séparation de substances biologiques sensibles;</p> <p>- plus faible consommation de solvant;</p> <p>- ne s'écrase pas sous la pression.</p>	

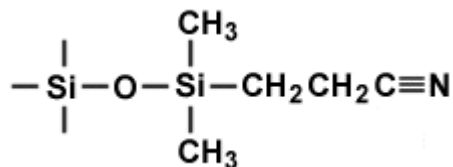
2. Chromatographie de partage - chromatographie liquide-liquide

a) Sur supports imprégnés de phase stationnaire - peu courants

b) Sur phases stationnaires chimiquement liées au support, exemples:



Avec phase stationnaire: octadécylsilane



Phase stationnaire contenant des fonctions nitriles

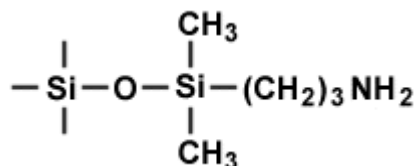


Figure 3.12. Phase stationnaire contenant des fonctions amines

c) En phase inversée (reversed phase ou RP) - la plus importante

Elle doit son nom au fait qu'elle est l'inverse d'une chromatographie dite normale. Elle fait référence à une séparation sur une phase non polaire par un solvant très polaire.

Le mécanisme de séparation sur colonnes à polarité de phases inversée n'est très bien connu. La rétention du soluté semble due à son adsorption sur la phase stationnaire sans privilégier l'une ou l'autre des théories qui associent cette phase ou aux chaînes hydrocarbonées ou à une couche du solvant le moins polaire qui se serait accumulé près de la phase stationnaire non polaire. Dans cette dernière hypothèse, il n'y aurait pas contact entre le soluté et la phase stationnaire proprement dite.

La longueur de la chaîne hydrocarbonée n'est pas limitée à 18 carbones; elle peut en contenir 2, 4, 6, 8 et 12. Plus la chaîne est courte, plus la colonne est polaire et inversement.

Avantages

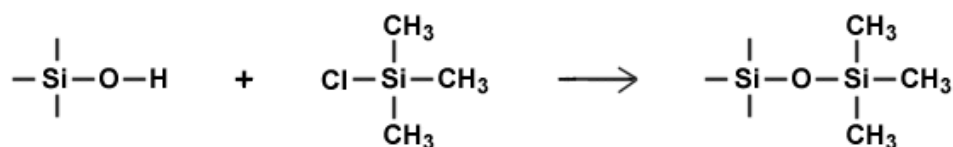
- la possibilité de séparation de solutés de nature non-ionique, ionisable et ionique;
- la séparation des solutés ioniques de ceux qui sont ionisables par création d'équilibres sélectifs tels que le pairage ionique ou l'échange de ligands;
- la détermination de paramètres physicochimiques comme l'hydrophobicité, constantes de formation de complexes et constantes de dissociation;
- séparations rapides et rééquilibration courtes dues aux faibles énergies de surface de ces phases greffées;
- utilisation d'appareillage simple;
- utilisation de phases liées chimiquement stables et donnant des résultats reproductibles.

Inconvénients :

- la plage des pH utilisables se situe entre 2 et 7,5 pour des phases stationnaires liées à la silice car à pH>7,5, il y a dissolution de la silice;
- les groupements silanols -Si-O-H retiennent fortement les composés polaires et encore plus les bases donnant des pics avec effets de queue.
- mécanisme de rétention complexe.

L'inconvénient provenant de la présence des groupements silanols peut être surmonté par:

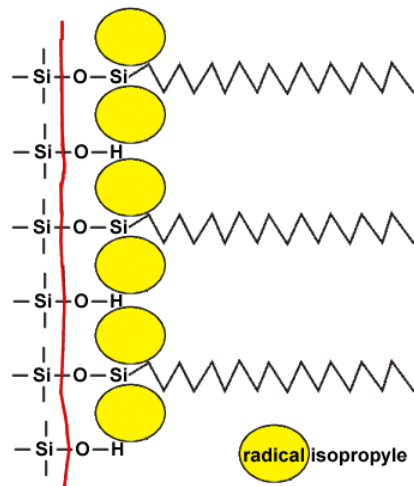
- le "endcapping" des silanols par des groupements plus petits - procédé analogue à celui de la silanisation en chromatographie en phase gazeuse. La réaction n'est pas nécessairement complète.



- l'utilisation d'une phase C18 mais dont les substituants sur le Si ne sont plus des

groupements méthyles (voir schéma réactionnel ci-dessus) mais des groupements isopropyles qui masquent les fonctions silanols.

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm



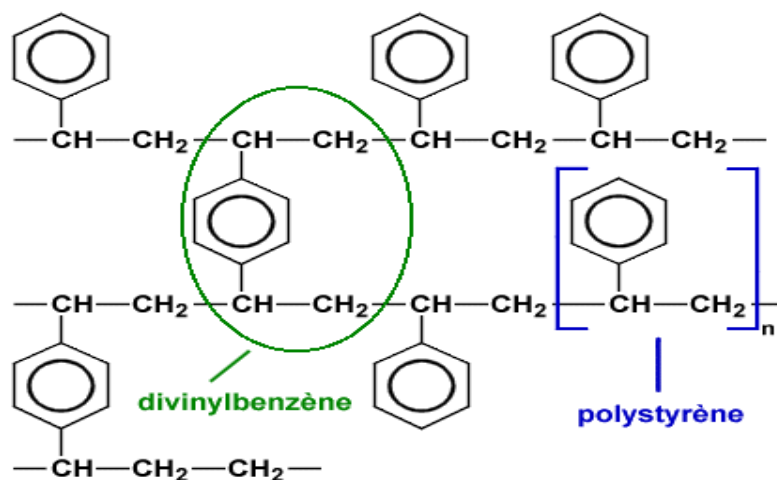
- l'utilisation de bases organiques comme la triéthylamine - mais elles sont difficiles à enlever (cette opération peut demander trois jours de lavage).

Support polymérique

Le développement de supports polymériques a permis de surmonter les difficultés associées à la présence des groupements silanols et aussi à élargir la plage de pH de façon à pouvoir faire des séparations avec une gamme de solvants beaucoup plus étendue.

Support: polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB)

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm



D. SOLVANTS

L'équilibre en adsorption est un phénomène de compétition. Les molécules de la phase mobile entrent en compétition avec les molécules de solutés pour les sites polaires

Pr. MEGHABAR Rachid (rachidmeghabar@yahoo.fr; meghabarrachid@gmail.com)

d'adsorption (séparation liquide-solide). Plus l'interaction entre la phase mobile et la phase stationnaire est forte moins l'adsorption du produit en solution sera importante et vice-versa. Les solvants sont donc classés selon leur force qui va dans le même sens que leur polarité.

Tableau 3.3

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm

Propriétés de quelques solvants utilisés en chromatographie liquide					
Solvant	UV (nm)	Viscosité (cP)	Eb (°C)	Indice de miscibilité (M)	Polarité (P)
Isooctane	215	0,50	99	29	0,1
Hexane	195	0,31	69	29	0,1
Toluène	284	0,59	111	23	2,4
Méthyl-t-butyléther	210	0,27	55	-	2,5
Dichlorométhane	233	0,44	40	20	3,1
Propanol-1	210	2,30	97	-	4,0
Tétrahydrofurane	212	0,55	66	17	4,0
Chloroforme	245	0,57	61	19	4,1
Éthanol	210	1,08	78	-	4,3
Acétate d'éthyle	256	0,45	77	19	4,4
1,4-Dioxane	215	1,37	101	17	4,8
Acétone	330	0,36	56	15	5,1
Méthanol	205	0,55	65	-	5,1
Acétonitrile	190	0,38	82	11	5,8
Acide acétique	-	1,10	118	-	6,0
Eau	190	1,00	100	-	10,20

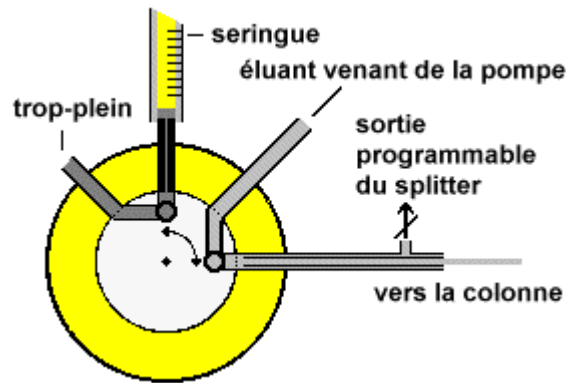
2. Chromatographie en phase liquide sur microcolonnes

Analogue à la chromatographie sur colonne en phase gazeuse.

Avantages - économie de solvant;
 - produits utilisés en quantité réduite;
 - temps de séparation beaucoup plus courts.

Inconvénients - exige des solvants et des solutions plus propres car le risque de voir la tuyauterie se bouche reste beaucoup plus grand (diamètre intérieur des tuyaux plus faible).

Les quantités injectées étant beaucoup plus petites, un injecteur split doit être utilisé.



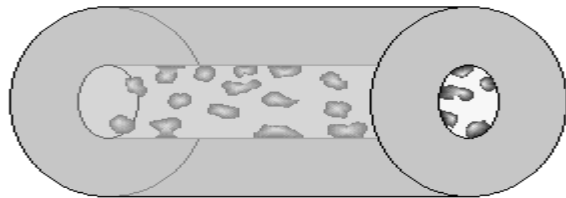
Injecteur utilisé pour injection dans les colonnes capillaires en HPLC.
Le volume de la boucle est 0,5 mL.

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm

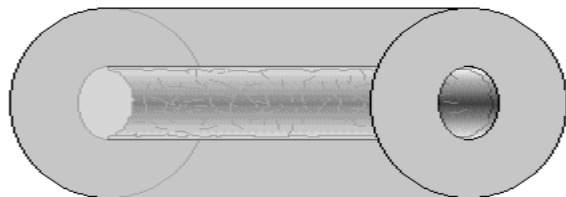
Les microcolonnes sont en silice fondue avec des parois assez épaisses. Ces colonnes ne supportent pas des pressions aussi élevées que les colonnes de métal.

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm

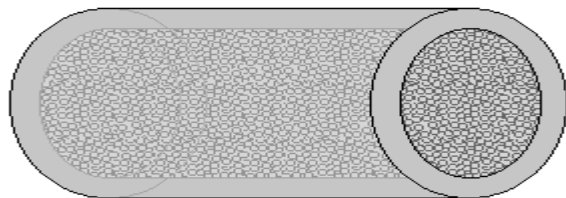
Microcolonne remplie
diamètre intérieur: 50 μ M ou moins



Colonne du type ouvert
(open tubular)
diamètre intérieur: 70 μ M ou moins



Colonne microbore remplie
d'un granulé enrobé de phase
stationnaire
diamètre intérieur: 1000 μ M ou moins



4: DÉTECTEURS EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Deux types de détections basées:

- sur les propriétés générales (solvant + soluté); ex: indice de réfraction, conductivité, constante diélectrique,...
- sur les propriétés des solutés; ex: UV, polarographie, radioactivité,...

LES TYPES DE DÉTECTEURS

A. SPECTROSCOPIE DANS L'ULTRAVIOLET ET LE VISIBLE

Mesure l'absorbance absolue d'un solvant + soluté ou la différence d'absorbance entre le solvant et le solvant + soluté (en présence d'une cellule de référence) à longueur d'ondes fixe de 254 ou 280 nm ou à longueur d'ondes variable entre 190 et 800 nm ou à longueurs d'ondes multiples comme les réseaux de diodes.

B. FLUORIMÉTRIE

Mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. L'émission de lumière est mesurée à angle droit du faisceau d'excitation.

Sert pour les composés fluorescents ou les dérivés fluorescents de certains composés.

C. RÉFRACTOMÉTRIE

Mesure de manière continue la différence d'indice de réfraction entre une phase mobile (éluant + substance) et l'éluant circulant respectivement dans la cellule de référence et la cellule de mesure.

Deux types:

- réfractomètre à déviation mesure la déviation d'un faisceau lumineux traversant une cellule séparée en deux compartiments de forme triangulaire par une cloison de verre, chaque compartiment contenant un liquide d'indice de réfraction différent;

- réfractomètre à réflexion mesure la fraction de lumière réfléchie ou transmise par une interface verre-liquide, fraction qui est proportionnelle aux indices de réfraction des deux substances.

D. AMPÉROMÉTRIE ET POLAROGRAPHIE

Mesure le changement de courant entre deux électrodes. Réactions d'oxydo-réduction sur des électrodes implantées dans des cellules et ajustées à des potentiels spécifiques.

E. CONDUCTIVITÉ

Mesure la conductivité électrique due à la présence d'un soluté dans la phase mobile (de façon absolue ou différentielle).

F. SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Mesure l'absorbance d'une substance dans l'infrarouge et permet l'acquisition du spectre IR des produits séparés par chromatographie liquide.

G. POLARIMÉTRIE

Mesure l'activité optique de substances possédant un ou des centres d'asymétrie. Cette activité optique est généralement associée à l'activité biologique.

H. SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Sensibilité de quelques détecteurs en CPL

http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma1.htm

Détecteurs en chromatographie phase liquide				
Type	Limite de détection		Sensibilité	
	commercial	optimum	au débit	à la température
Absorption UV	100 pg - 1 ng	1 pg	non	faible
Fluorescence	1 - 10 pg	10 fg	non	faible
Réfractométrie	100 ng - 1 µg	10 ng	oui	10 ⁻⁴ / °C
Électrochimie	10 pg - 1 ng	100 fg	oui	1,5% / °C
Conductimétrie	500 pg - 1 ng	500 pg	non	2% / °C
FT-IR	1 µg	100 ng	non	faible
Polarimétrie	-	1 ng	-	oui
Spectrométrie de masse	100 pg - 1 ng	1 pg	-	-