

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Abderahman Mira

Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Alimentaires

POLYCOPIE DE COURS

Méthodes Séparatives

Dr . HADDADI GUEMGHAR H.

Polycopié destiné pour
les étudiants en Licences
du département des
Sciences Alimentaires

Sommaire

Partie I : Chromatographie et notions fondamentales	1
1. Historique	1
2. Principe de la chromatographie	2
3. Classification des méthodes chromatographiques	3
3.1. Classification selon la nature des phases	3
3.2. Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu	3
3.3. Classification selon la technique mise en jeu	4
4. Grandeurs fondamentales et définitions	4
4.1. Notion de temps	4
4.2. Notion de volume	5
4.3. Notion de concentration	6
4.4. Notion d'efficacité	8
5. Qualité de la séparation	13
5.1. Sélectivité	13
5.2. Résolution	14
6. Notion de pression	14
Références bibliographiques	15
Partie II : Chromatographie liquide à haute performance	17
1. Appareillage	17
2. Etude détaillée des éléments d'un appareil HPLC	19
2.1. Réservoir de solvant (éluant)	19
2.2. Pompe	19
2.3. Vanne d'injection	20
2.4. Colonne	20

2.5. Phase stationnaire	21
2.5.1. Phase normale	21
2.5.2. Phase inverse	21
2.6. Phase mobile	22
2.7. Détecteurs	23
3. Analyse quantitative	24
3.1. Méthode de l'étalonnage externe	24
3.2. Méthode des ajouts	25
3.3. Méthode de l'étalon interne	25
Références bibliographiques	26
Partie III : Chromatographie par échange d'ions	27
1. Schéma de principe d'une installation de chromatographie ionique.	27
2. Les résines échangeuses d'ions	28
2.1. Groupements fonctionnels	29
2.2. Support	30
3. Principe	31
4. Equilibre d'échange ionique	32
5. Séparation des acides aminés	33
Références bibliographiques	35
Partie IV : Chromatographie d'exclusion stérique	36
1. Principe	36
2. Théorie de la CES	38
3. Phase stationnaire	39
4. Applications de la CES	41
Références bibliographiques	42
Partie V : Chromatographie planaire	43
1. Généralités	43
2. Principe	43

3. Mode Opérateur	44
4. Paramètres de la chromatographie planaire	45
5. Application de la chromatographie planaire	46
Références bibliographiques	47
Partie VI : Chromatographie en phase gazeuse	48
1. Introduction	48
2. Principe	48
3. Grandeurs de rétentions	49
4. Instrumentation	52
5. Optimisation d'une analyse CPG	59
Références bibliographiques	59
Partie VII : Electrophorèse capillaire	61
1. Introduction	61
2. Instrumentation	61
3. Principe	62
3.1. Théorie de l'électrophorèse	62
3.2. Ordre de migration	66
4. Efficacité et résolution	67
Références bibliographiques	67

Partie I :
Chromatographie et
notions
fondamentales

Partie I : Chromatographie et notions fondamentales

1. Historique

La chromatographie est une science très ancienne. Ainsi on trouve la première référence d'un processus chromatographique dans l'Ancien testament qui fait mention de propriétés adsorptives de certaine variété de bois pour adoucir de l'eau amère. Ce sont les tanins hydrophobes qui constituaient une phase stationnaire apolaire (chromatographie d'adsorption). Aristote décrit les propriétés que possèdent certaines terres pour purifier l'eau de mer. Les phénomènes mis en jeu relèvent ici de l'échange d'ions. Au XVIème siècle, le strasbourgeois BRUNSWIG purifiait de l'éthanol en faisant passer la vapeur à travers une éponge imprégnée d'huile d'olive et réalisait une expérience de chromatographie gaz-liquide 400 ans avant la "découverte" de cette technique.

Le mot **chromatographie** vient du grec chroma (croma), couleur. Cette origine s'explique historiquement : dans les années 1900, Tswett, botaniste russe, sépara des pigments végétaux grâce à une nouvelle technique, qu'on appela par la suite chromatographie, par référence aux composés colorés qui avaient été alors séparés. De nos jours, ce terme **recouvre plus généralement toutes les techniques de séparation de substances en solution par passage au travers d'un matériau sélectif.**

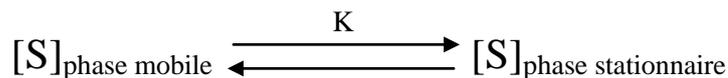
C'est effectivement au début du siècle qu'eut lieu la première expérience de chromatographie sur papier. Le botaniste russe Tswett sépara des pigments végétaux grâce à cette technique, qui fut dès lors utilisée dans de nombreux cas en chimie organique. En 1950 apparut la chromatographie en phase gazeuse, puis dans les années 60 la chromatographie d'exclusion. C'est en 1969, après le 5e Symposium International « Advances in Chromatography », que la chromatographie en phase liquide s'est véritablement développée.

En fait, dès 1958 Spackman, Stein et Moore analysèrent des acides aminés pour la première fois de manière automatique. Ceci marqua le début de la chromatographie en phase liquide moderne. Giddings oeuvra pour le développement de cette technique (cf. Son ouvrage Dynamics of chromatography), jusqu'à ce que Scott (Oak Ridge National Laboratory)

obtienne de très bonnes résolutions en séparant plusieurs centaines de composés différents par échange d'ions sous haute pression. C'est grâce à ce nouveau procédé, et grâce surtout aux nouvelles technologies (notamment le traitement par ordinateur) que la chromatographie en phase liquide sur colonne a atteint l'efficacité de la chromatographie en phase gazeuse. Cette chromatographie en phase liquide sous haute pression, ou haute performance (HPLC) est désormais la seule utilisée en analyse. Aujourd'hui la chromatographie liquide est la technique analytique la plus utilisée à l'heure actuelle.

2. Principe de la chromatographie

Le principe de la chromatographie repose sur l'équilibre de concentrations des composés (soluté S) présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire et la phase mobile (gaz ou liquide) qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...).



L'éluion d'un soluté S en chromatographie est donc caractérisé par la constante d'équilibre **K**, appelée aussi constante de partition, de distribution ou constante de Nernst.

C'est le paramètre physico-chimique de base en chromatographie qui quantifie le rapport de concentration de chaque composé entre les deux phases en présence.

$$K = \frac{[S]_{\text{phase stationnaire}}}{[S]_{\text{phase mobile}}}$$

Les facteurs qui contrôlent la séparation sont surtout d'ordre thermodynamique: la rétention de l'échantillon sur la colonne est donc contrôlée thermodynamiquement.

$$\ln K = \frac{-\Delta_r G^\circ}{RT} \quad (\text{eq. 1})$$

K varie avec la température T suivant l'équation classique (eq.1), où $\Delta_r G^\circ$ est la différence d'énergie libre de dissolution du soluté S entre les 2 phases. **K** est $\gg 1$ donc $\Delta_r G^\circ$ est négative.

3. Classification des méthodes chromatographiques

On peut classer les méthodes chromatographiques de trois manières:

- selon la nature des phases
- selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation
- selon la technologie mise en œuvre.

3.1. Classification selon la nature des phases

Selon la nature de **la phase mobile** on distingue:

- la chromatographie en phase liquide CPL
- la chromatographie en phase gazeuse CPG
- la chromatographie en phase supercritique CPS

Selon la nature de **la phase stationnaire** on distingue:

- la chromatographie gaz / solide CGS
- la chromatographie gaz / liquide CGL
- la chromatographie liquide / solide CLS
- la chromatographie liquide / liquide CLL

3.2. Classification 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. On distingue ainsi:

- **La chromatographie d'adsorption :**

La séparation entre les molécules est fondée sur le processus répété d'adsorption et désorption par la phase stationnaire. Dans les premières études les phases stationnaires « modèles d'études » étaient la silice et la cellulose. En conséquence, les phénomènes étudiés correspondaient essentiellement à des interactions de type liaison hydrogène. D'autres phases ont été utilisées depuis avec des mécanismes d'échange impliquant des liaisons Van der Waals, hydrogène et des interactions hydrophobes. Il s'agit d'une chromatographie liquide-solide.

- **La chromatographie de partage :**

La séparation est fondée sur les différences de solubilité des molécules à séparer entre phase mobile et phase stationnaire liquide (phase qui imprègne ou qui est greffée sur un solide). Il s'agit alors de chromatographie liquide-liquide (CLL).

- **La chromatographie d'échange d'ions :**

La phase stationnaire est un solide à la surface duquel se trouvent des groupements ionisés. La rétention des solutés ce fait grâce à des interactions de type ioniques.

- **La chromatographie d'exclusion :**

La phase stationnaire est un solide poreux les molécules sont séparé selon leur forme et leur masse moléculaire.

- **La chromatographie d'affinité :**

Elle consiste à fixer par exemple une enzyme sur la phase stationnaire

3.3. Classification selon la technique mise en jeu

Selon le support de la chromatographie on distingue:

- la chromatographie sur colonne
- la chromatographie planaire (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

4. Grandeurs fondamentales et définitions

4.1. Notion de temps

4.1.1. Temps de rétention t_r

Un constituant est caractérisé par son *temps de rétention* t_r qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Le temps de rétention est indépendant de la quantité injectée.

4.1.2. Temps mort t_m

Le temps mort t_m est le temps mis par un soluté non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).

4.1.3. Temps de rétention réduit tr'

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du soluté tr' . En d'autres termes c'est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$tr' = tr - tm \quad (\text{eq. 2})$$

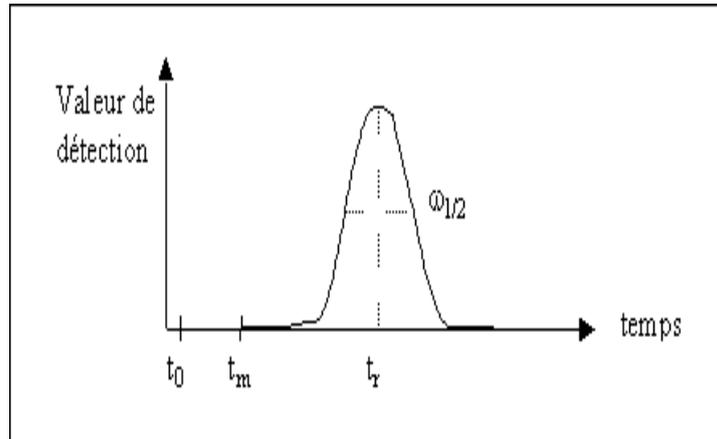


Figure 1. Caractéristique d'un pic d'éluion en chromatographie

Ici t_0 est le temps du début de l'injection, cependant dans certains ouvrages il symbolise le temps mort.

4.2. Notion de volume

4.2.1. Volume d'éluion ou volume de rétention Vr

Le volume d'éluion (de rétention) Vr de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si le débit D est stationnaire,

$$Vr = tr \cdot D \quad (\text{eq. 3}).$$

4.2.2. Volume d'un pic, $Vpic$.

Il correspond au volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne. Il vaut par définition :

$$Vpic = \omega \cdot D \quad (\text{eq. 4}).$$

ω : correspond à la largeur du pic à la base.

4.2.3. Volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort V_m)

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) V_m correspond au volume interstitiel accessible. Il peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. On peut l'exprimer en fonction de t_m et du débit D :

$$V_m = t_m \cdot D \quad (\text{eq. 5})$$

4.2.4. Volume de la phase stationnaire

Ce volume désigné par V_s n'apparaît pas sur le chromatogramme. Dans les cas simples on le calcule en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

4.3. Notion de concentration

En chromatographie chaque soluté injecté dans la colonne est soumis à deux effets antagonistes : un effet d'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble et un effet de rétention avec la phase stationnaire avec laquelle il interagit. On caractérise la distribution de chaque soluté entre les deux phases par le coefficient de partage ou coefficient de distribution.

4.3.1. Coefficient de partage

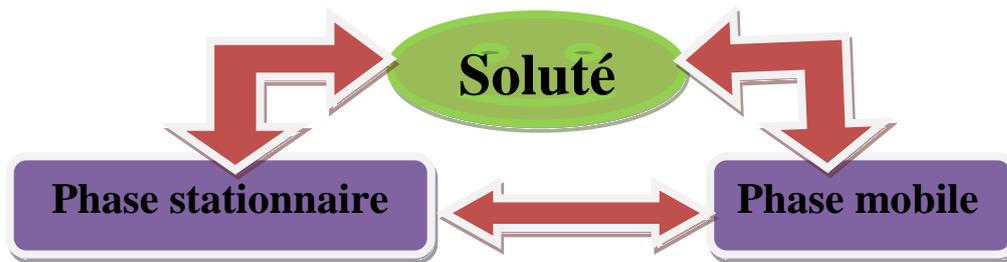
A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (\text{eq. 6})$$

Lorsque le soluté n'a aucune affinité avec la phase stationnaire, C_s est nulle, donc $K=0$. Le soluté n'est pas retenu dans la colonne si la phase mobile est très différente du solvant d'injection, il y'a un risque de faire précipiter le soluté en tête de colonne, donc de la boucher. Dans ce cas le soluté peut ne jamais sortir du système chromatographique. Ce qui veut dire que la C_m ne peut pas être nulle.

Le coefficient de partage est fonction de trois types d'affinités :

- celle entre le soluté et la phase mobile
- celle entre le soluté et la phase stationnaire
- mais aussi celle entre les phases stationnaire et mobile.



4.3.2. Facteur de capacité K'

Le facteur de capacité K' est le rapport de la quantité d'un même soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = \frac{C_s}{C_m} \times \frac{V_s}{V_m} = K \frac{V_s}{V_m} \quad (\text{eq. 7})$$

V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

K' est un paramètre très important en chromatographie. Il est défini en régime isocratique. Ce n'est pas une constante, bien qu'il ne varie pas avec le débit ou la longueur de la colonne, car il dépend des conditions opératoires. Ce paramètre rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque composé (*capacité*). Dans la mise au point des séparations on fait en sorte que K' ne dépasse pas 10, afin de ne pas trop allonger le temps de passage des composés.

K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile. K' peut être déterminé expérimentalement par l'équation suivante :

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (\text{eq. 8})$$

Le temps de rétention est ainsi lié au facteur de capacité par la relation :

$$t_r = t_m(1 + K') \quad (\text{eq. 9})$$

Remarque

La mesure de t_m peut se faire en injectant un composé dont on est sûr qu'il n'est pas retenu sur la colonne dans les conditions choisies.

Compte tenu des équations 3 et 5 le volume de rétention V_r d'un soluté pourra s'écrire :

$$V_r = V_m (1 + k) \quad (\text{eq. 10})$$

Ou :

$$V_r = V_m + KVs \quad (\text{eq. 11})$$

4.4. Notion d'efficacité

4.4.1. Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par le nombre de plateaux théoriques N_{th} .

4.4.2. Model des plateaux théoriques

Une colonne de N plateaux théoriques est une colonne divisée en N petits disques cylindriques successifs. On admet que la phase mobile progresse non pas de façon continue, mais par sauts successifs d'un plateau théorique à l'autre. Dans chaque plateau théorique, on observe une rétention du soluté S , du fait de l'équilibre de ce produit entre la phase mobile $[S]_{pm}$ et la phase stationnaire $[S]_{ps}$.

Une colonne réelle aura donc " N plateaux théoriques" si elle se comporte comme une "colonne à distiller théorique" de N plateaux.

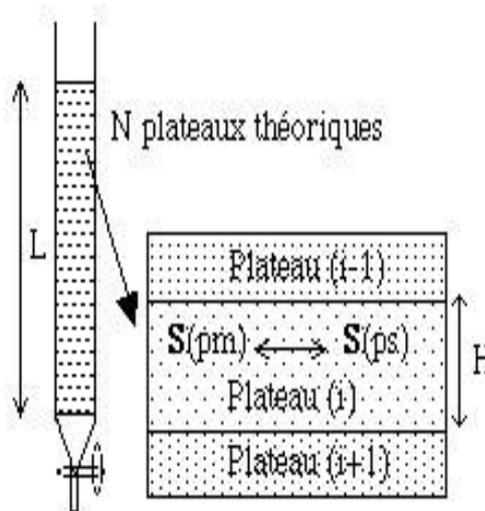


Figure 2. Model des plateaux théoriques

Dans cette théorie, les pics de chromatographie ont une forme gaussienne et la variance s^2 est reliée au nombre de plateaux théoriques N et au temps de rétention tr par la relation:

$$Ns^2=(tr)^2 \quad (\text{eq. 12})$$

N augmente donc avec le temps de rétention et diminue si la largeur des pics (s) augmente. D'après la relation 12, une « bonne » colonne de chromatographie qui conduit à des pics fins (s petit) pour des temps de rétention (tr) élevés, est donc caractérisée par un nombre de plateaux théoriques N élevé.

Sur le chromatogramme (figure 3), s représente la demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur et tr le temps de rétention du composé. tr et s doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant). Si on exprime s en unités de volume (en faisant intervenir le débit), $4s$ correspond au « volume du pic » soit 95 % du composé injecté. Par suite des propriétés de la courbe de Gauss ($\omega = 4s$), il en résulte l'équation 13.

$$N = 16 \frac{tr^2}{\omega^2} \quad (\text{eq. 13})$$

Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée : on utilise de préférence la formule équivalente 14.

$$N = 5,54 \frac{tr^2}{\delta^2} \quad (\text{eq. 14})$$

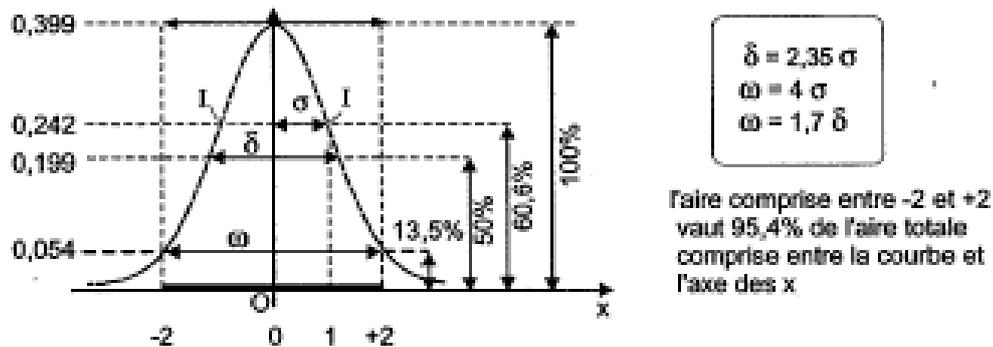


Figure 3. Caractéristiques d'un pic chromatographique

4.4.3. Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

N est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser N_{eff} (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{eff} = 16 \frac{tr'^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{tr'^2}{\delta^2} \text{ (eq. 15)}$$

4.4.4. Hauteur équivalent à un plateau théorique H

Connaissant la longueur L de la colonne et le nombre de plateaux théoriques N on définit une Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT ou H).

$$HEPT = \frac{L}{N} \text{ (eq. 16)}$$

La HEPT permet de comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs. Elle est fonction de différents paramètres qui eux-mêmes sont susceptibles de varier avec la vitesse de la phase mobile.

En HPLC les HEPT sont comprises entre 0,001 et 1 mm. Dans la théorie des plateaux, la HEPT ($= L \cdot s^2 / tr^2$) déduite de la variance n'apparaît que comme une mesure globale de l'influence de tous les paramètres expérimentaux. Divers modèles ont été élaborés pour préciser les divers paramètres intervenant dans l'élargissement des pics.

4.4.5. Modèle cinétique de la chromatographie

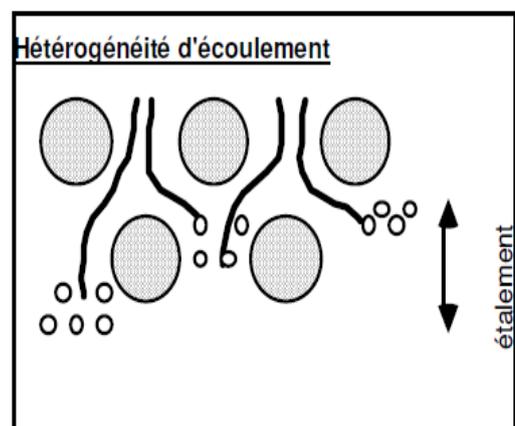
Ce modèle issu de la mécanique des fluides a été mis au point par J.J. Van Deemter. En 1956, ce physicien a mis au point l'équation (eq. 17) qui relie H (HEPT) aux caractéristiques physiques de la colonne et de la phase mobile.

$$H = A + B/u + C \cdot u \text{ (eq.17).}$$

Trois facteurs, représentés par les 3 termes de l'équation 17, contribuent à l'élargissement des pics

- **Diffusion turbulente (Terme A)**

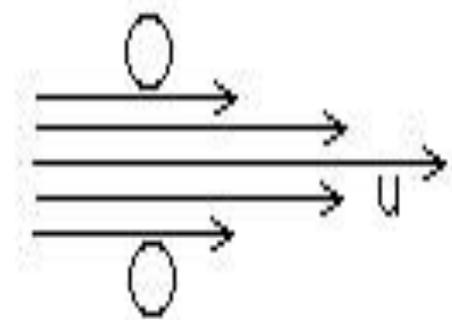
Suivant la taille et la forme des particules, ils existent pour la phase mobile, plusieurs trajets possibles, cette particularité contribue à l'élargissement des pics d'où $A = 2 l dp$. l est une constante voisine de 1. dp est le diamètre moyen des particules. Donc, plus les particules sont petites et plus le remplissage est homogène, plus l'efficacité de la colonne augmente.



La contribution de A est nulle pour une colonne capillaire de chromatographie en phase gazeuse.

- **Diffusion longitudinale (Terme B)**

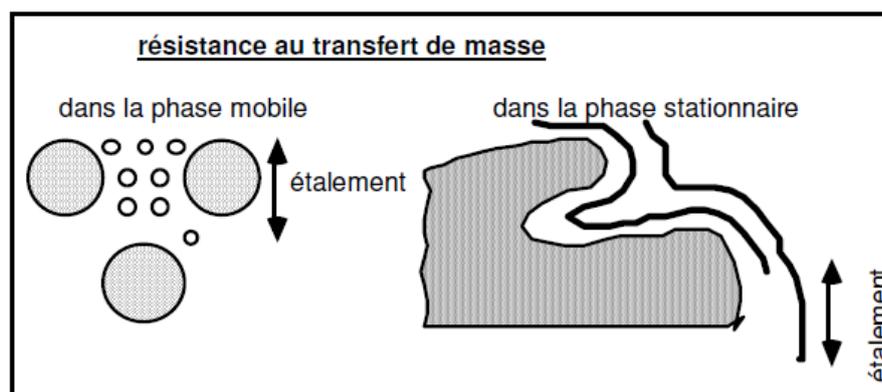
Le terme B/u traduit la dispersion du soluté à cause de la diffusion du soluté dans la colonne. Par exemple, dans un flux liquide, les molécules au centre du flux progressent plus vite que celles qui sont sur les bords au contact des particules; on a $B = 2g D_m$ où g est une constante ($g < 1$), et D_m est le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.



Le terme B/u est évidemment inversement proportionnel à u . L'efficacité d'une colonne augmente avec la vitesse de la phase mobile. Ceci peut expliquer les bonnes séparations obtenues en HPLC; de plus, comme le terme D_m est environ 5 fois plus grand en CPG qu'en CPL, il en résulte que la contribution de la diffusion longitudinale est presque négligeable en HPLC.

- **Résistance au transfert de masse (Terme C)**

Ce terme $C*u$ représente la résistance au transfert du soluté entre les phases mobiles et stationnaires, cette résistance empêche l'établissement de l'équilibre entre $S(pm)$ et $S(ps)$. Ce phénomène est dû par exemple au fait que certaines molécules stagnent dans les pores de la phase stationnaire.



Plus la vitesse (u) de la phase mobile diminue, plus les molécules de soluté peuvent pénétrer dans la phase stationnaire, plus l'équilibre entre les 2 phases est favorisé et plus la colonne est performante.

Le terme C est proportionnel à (dp^2/Dm) , les colonnes les plus efficaces seront celles régulièrement remplies et bien tassées où le diamètre des particules est le plus faible possible. Il faut également utiliser des solvants de faible viscosité pour minimiser ce terme.

4.4.6. Courbe de Van Deemter

La représentation graphique de l'équation (eq. 17) est appelée courbe de Van Deemter (figure 4). L'analyse de cette courbe montre l'existence d'un débit optimal de phase mobile pour lequel l'efficacité de la colonne est maximum (HEPT minimum).

Réduire le débit de la phase mobile en deçà de ce débit optimal peut diminuer fortement le pouvoir séparatif d'une colonne, surtout en CPG où la contribution du terme B/u est importante

Contrairement à la CPG, en HPLC au-dessus du débit optimal, l'efficacité de la colonne est pratiquement indépendante du débit de la phase mobile. Ceci permet de raccourcir les temps d'analyse, sans perdre trop de pouvoir de séparation.

Ils existent d'autres formulations de l'équation de Van Deemter plus adaptées à la HPLC

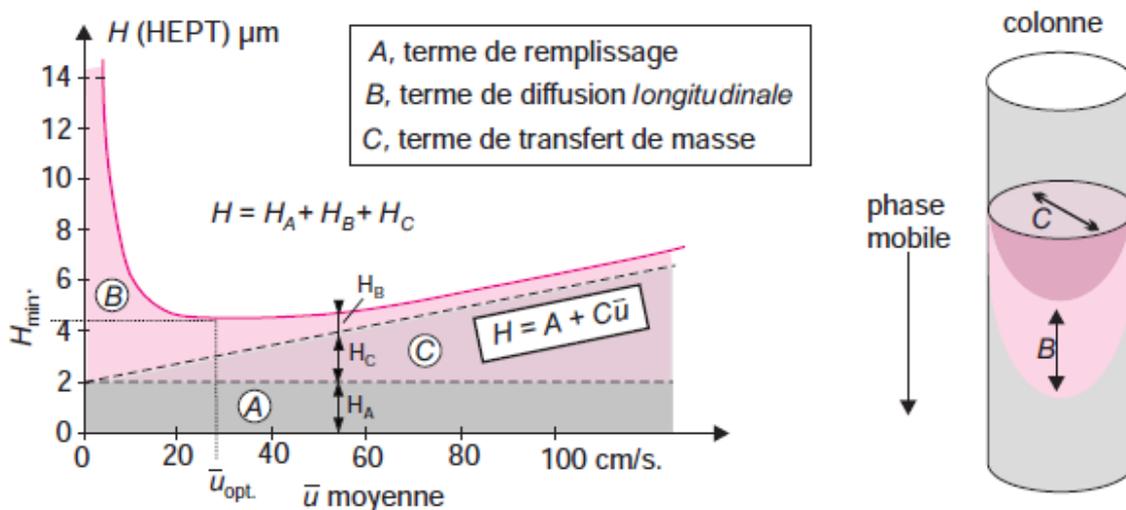


Figure 4. Courbe de Van Deemter

Les trois coefficients numériques expérimentaux A , B et C sont reliés à divers paramètres physico-chimiques, à la colonne et aux conditions opératoires. Si on choisit d'exprimer H en cm, A sera en cm, B en cm^2/s et C en s (la vitesse étant en cm/s). La courbe

représentative de cette fonction est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum

$$(H_{\min}) \text{ pour : } u_{\text{opt.}} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire.

5. Qualité de la séparation

5.1. Sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité :

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{K'_2}{K'_1} \quad (\text{eq. 18})$$

Le facteur de sélectivité mesure la différence de distribution thermodynamique des deux composés. On démontre que si $\Delta(\Delta G^\circ) = \Delta G^\circ_2 - \Delta G^\circ_1$ (différence des énergies libres de distribution des deux composés) on a :

$$\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \ln \alpha$$

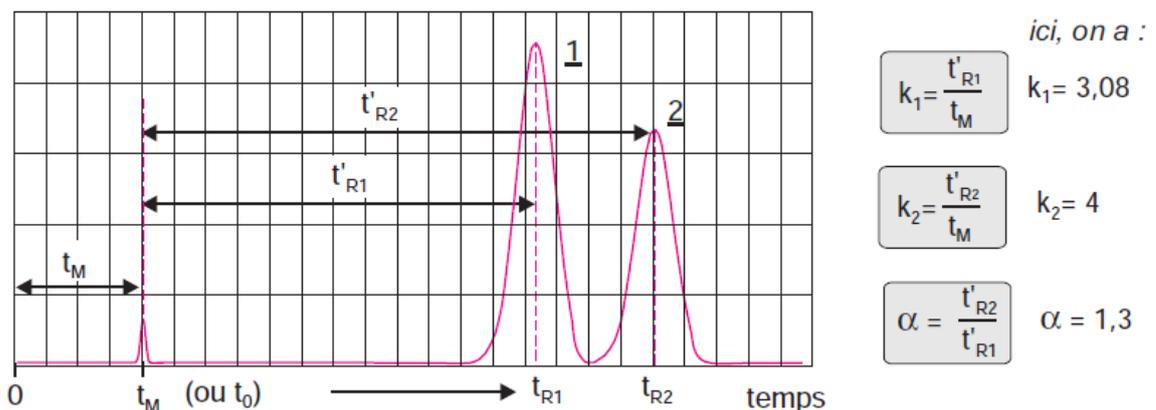


Figure 5. Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents.

5.2. Résolution

Si dans certaines conditions, deux constituants sortent à des temps proches, leurs pics risquent de se chevaucher. En optimisant les conditions analytiques, il est possible d'améliorer l'allure du chromatogramme. Le paramètre de résolution R quantifie la qualité de cette séparation. Bien qu'on la mesure, en général, sur deux pics contigus, elle peut être calculée sur n'importe quel couple de pics.

$$R = 2 \frac{tr_2 - tr_1}{\omega_1 + \omega_2} \quad (\text{eq. 19})$$

$R < 1$: mauvaise résolution

$1 < R < 1,4$: résolution acceptable

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale

$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé

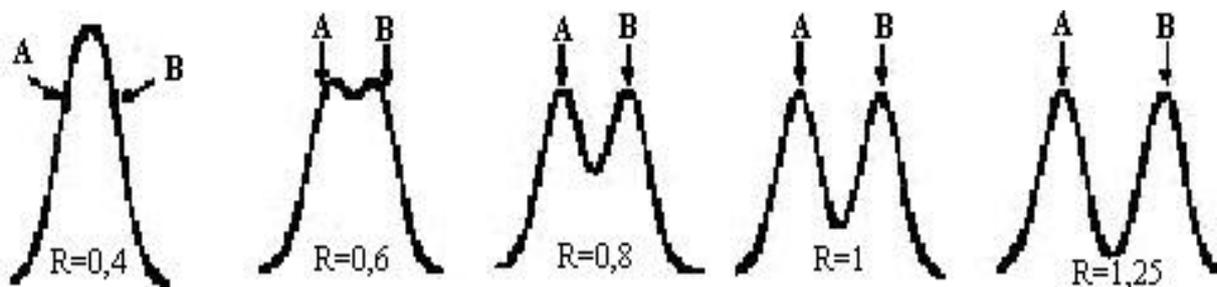


Figure 6. Influence du terme R sur la séparation de deux pics d'intensité égale

Remarque : Si les pics sont gaussiens $\omega = 1,7 \delta$

Il est parfois utile d'exprimer cette résolution en fonction de la sélectivité et de l'efficacité du dernier des 2 pics étudiés

$$R = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{K'_B}{1 + K'_B} \times \sqrt{N_{th}} = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \sqrt{N_{eff}} \quad (\text{eq. 20})$$

6. Notion de pression

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement. Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre

par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression plus la granulométrie de la phase stationnaire est faible.

En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars. La perte de charge qui est la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne est donnée par *la loi de Darcy* :

$$\Delta P = \frac{\phi \eta L u}{D^2} \text{ (Eq. 21)}$$

Φ (sans dimension) facteur de résistance à l'écoulement ;

D (m) diamètre moyen des particules ;

η (Pa . s) viscosité ;

L (m) longueur de la colonne ;

u (m . s⁻¹) vitesse de la phase mobile.

Références bibliographiques

Burgot, G., Burgot, J.-L., 2011. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. Lavoisier.

Huber, L., 1994. Principles and techniques of practical biochemistry. Wiley Online Library.

Khabchi, M.E., 1993. Chromatographie en phase liquide: contribution à l'optimisation d'une séparation préparative en gradient d'élution.

Mendham, J., Denney, R., Barnes, J., Thomas, M., 2005. Analyse chimique quantitative de Vogel. 1ère Edition edn. De Boeck.

Miller, J.M., 2005. Chromatography: concepts and contrasts. John Wiley & Sons.

Rosset, R., Caude, M., Jardy, A., 1982. Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. Issy-les-Moulineaux (Hauts-de-Seine): Masson.

Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., 2004. Analyse chimique-6ème édition-Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. De Boeck Supérieur.

Yost, R.W., Ettre, L.S., Conlon, R.D., Vaumoron, J., 1981. Pratique de la chromatographie liquide. Technique et Documentation.

Site Internet

<https://www.emse.fr/fr/transfert/spin/formation/ressources/sam96/hplc97htm/sep.htm>

[file:///C:/Users/bcs/Desktop/Cour%20chromato/Chromato liquide 2007%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/bcs/Desktop/Cour%20chromato/Chromato%20liquide%202007%20(1).pdf)

<http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/theoriechromato2.html#A23>

Partie II :
Chromatographie
liquide à haute
performance

Partie II : Chromatographie liquide à haute performance

La *chromatographie liquide haute performance*, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

Ces phases, constituées de micro-particules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 micromètres conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Ce qui a conduit à exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable. Pour marquer cette particularité de la technique, la lettre P du sigle CLHP a pendant longtemps correspondu au mot *pression*. Aujourd'hui le P a été attribué à **Performance** afin de marquer l'innovation de cette technique de séparation.

1. Appareillage

Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance on retrouvera toujours les éléments de base suivants :

- ✓ un ou plusieurs réservoirs de phase mobile contenant soit des solvants purs soit des mélanges de solvants dans des concentrations connues.
- ✓ un système d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée (généralement une vanne RHEODYNE).
- ✓ une colonne remplie, en acier inox, de quelques centimètres de long.
- ✓ Un détecteur 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.

La phase mobile est pompée à partir d'un réservoir et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante.

Le signal du détecteur est amplifié et enregistré.

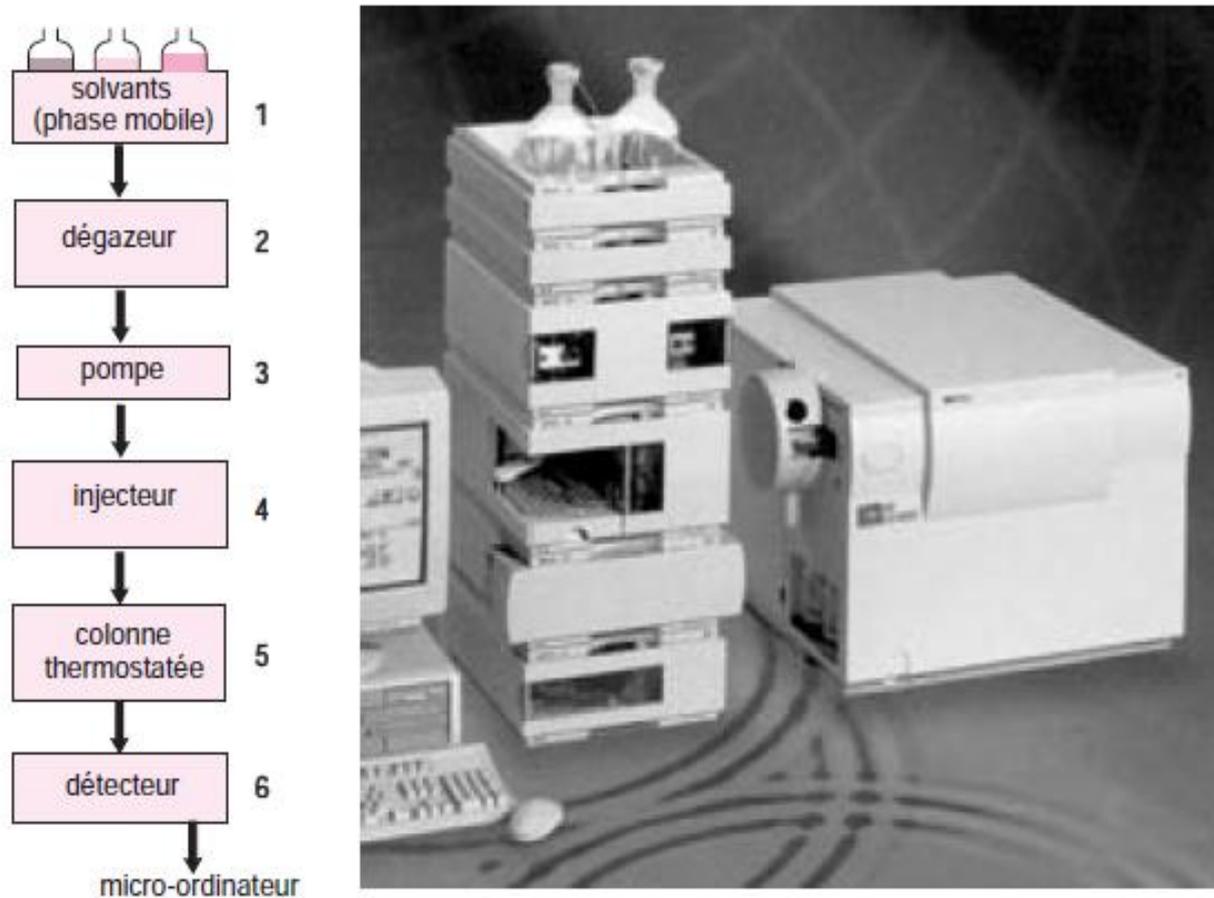


Figure 1. Schéma d'un système de chromatographie en phase liquide haute performance

L'utilisateur compose son installation en fonction des applications prévues. La présentation en colonne des différents modules est commune à de très nombreux modèles concurrents. Ici le chromatographe modèle HP 1100, comporte un injecteur automatique permettant un fonctionnement en continu et une colonne thermostatée pour améliorer la reproductibilité des séparations. Les composés élués, après passage par le détecteur UV sont identifiés avec encore plus de certitude au moyen d'un spectromètre de masse situé à droite de l'image.

2. Etude détaillée des éléments d'un appareil HPLC

2.1. Réservoir de solvant (éluant)

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

2.2. Pompe

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

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

en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

Les pompes actuelles ont des pressions maximales de refoulement voisines de 400 bar et un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min.

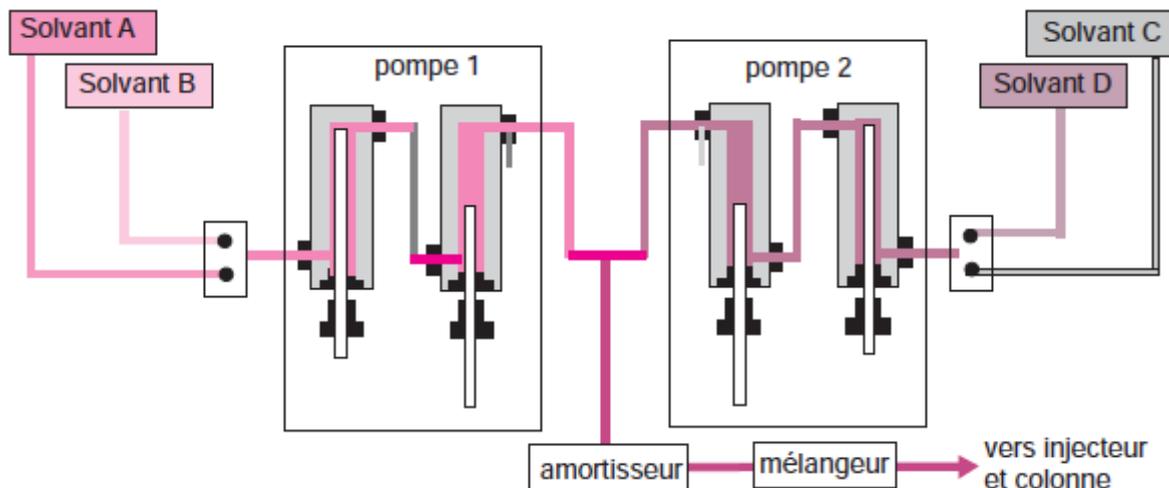


Figure 2. Exemple de configuration pour gradient haute pression.

Les pompes sont appelées binaires, ternaires, quaternaires suivant le nombre de solvants qu'elles peuvent mélanger (ici binaires).

2.3. Vanne d'injection

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utiliserons une boucle de 20 μ l. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

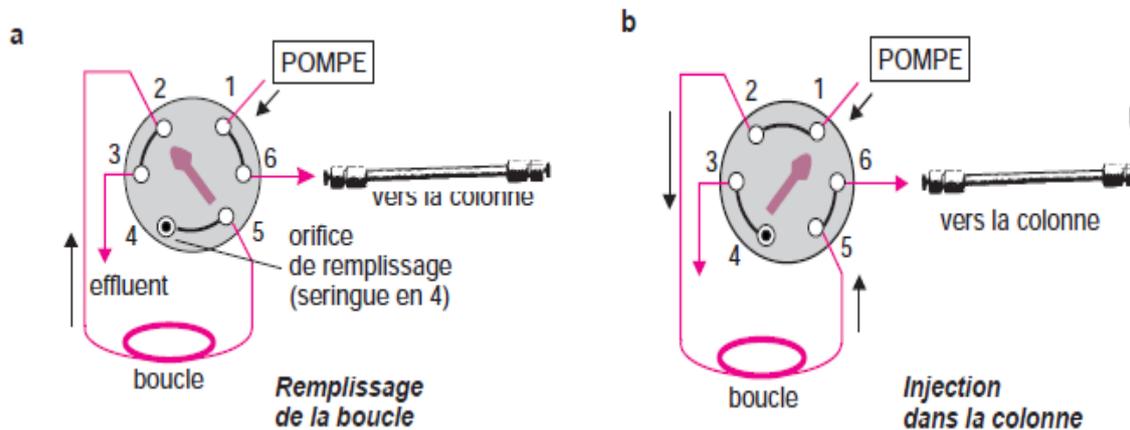


Figure 3. Injection avec une boucle.

a) Remplissage de la boucle. Dans cette étape, la seringue est introduite à la position n° 4 ; b) injection dans la colonne (noter la nouvelle position de la manette).

2.4. Colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées. La colonne est souvent précédée d'une précolonne, dite *colonne de garde*, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés (figure 4).

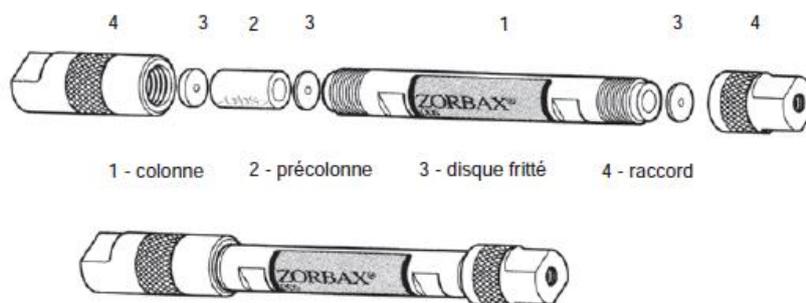


Figure 4. Colonne standard et précolonne de CLHP.

2.5. Phase stationnaire

2.5.1. Phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

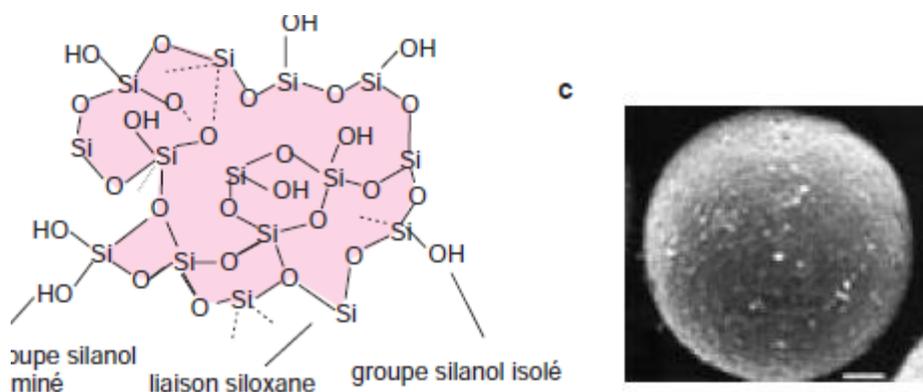


Figure 5. Le gel de silice pour chromatographie.

2.5.2. Phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

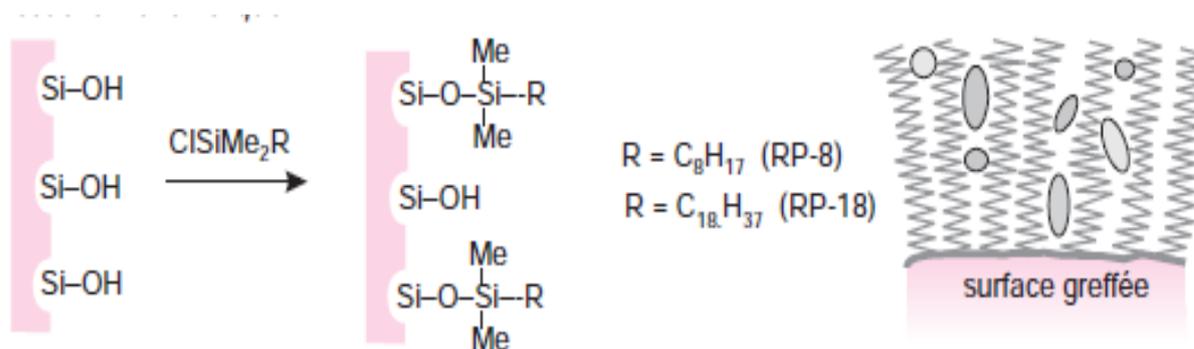


Figure 6. Gel de silice greffé

2.6. Phase mobile

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

permet de distinguer deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en *phase normale* ;

- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en *phase inverse*.

En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés. Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution). On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile.

En plus du pouvoir d'élution le choix de la phase mobile dépend aussi d'un certain nombre de facteurs dont les plus importants sont la solubilité de l'échantillon, la compatibilité de la phase mobile avec le détecteur et la viscosité de la phase mobile. Aucun de ces

paramètres n'est une variable indépendante et le meilleur solvant est donc celui qui donne une réponse optimale à toutes ces conditions.

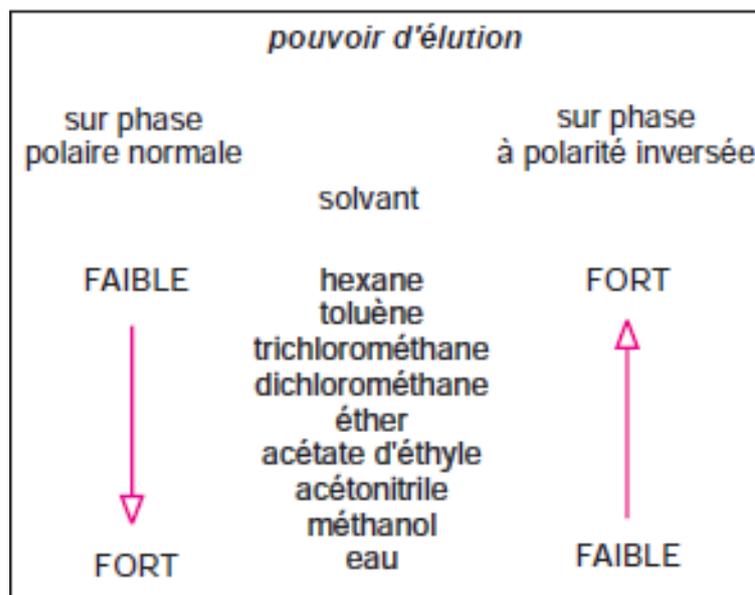


Figure 7. « Force d'élution » des solvants utilisés comme phases mobiles.

2.7. Détecteurs

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

Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

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

ainsi que différents types de couplage :

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

3. Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

3.1. Méthode de l'étalonnage externe

Il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante du produit afin de faire une courbe d'étalonnage $Aire = f(\text{masse ou concentration du produit})$, pour un volume injecté constant V .

L'injection ultérieure du même volume V de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la masse ou la concentration recherchée. Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire **qu'une mesure** avec l'étalon et à utiliser une règle de trois :

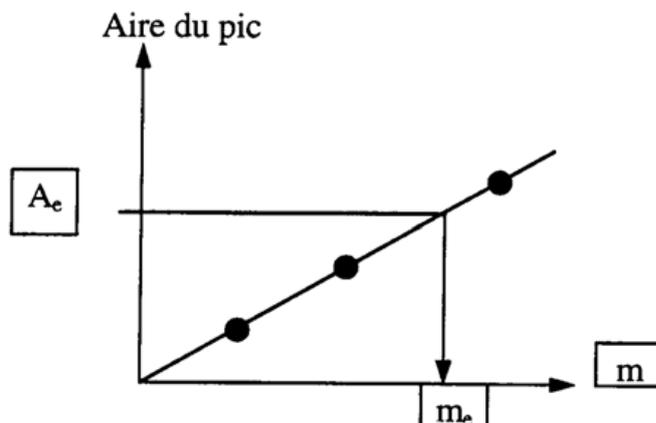
$$A_e/M_e = A_{et}/m_{et}$$

A: Aire des pics

e : échantillon

et : étalon

m : masse du produit remplaçable par la concentration



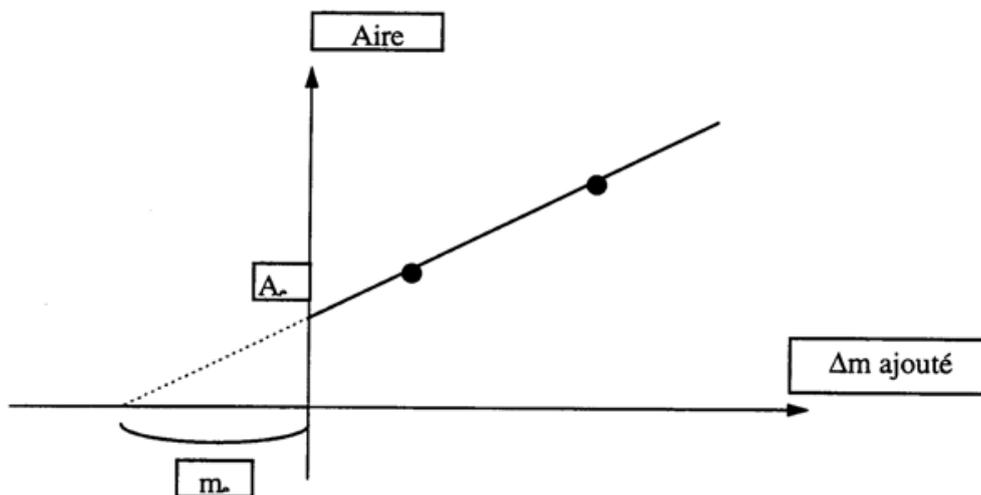
3.2. Méthode des ajouts

Comme la précédente, cette méthode nécessite de posséder le produit à analyser pur; après avoir analysé l'échantillon, on ajoute à celui-ci des quantités connues Δm du produit avant de le chromatographier à nouveau (faire au minimum deux ajouts), ce qui entraîne une variation de l'aire du pic ΔA .

Si m est la masse contenue dans l'échantillon à analyser,

$$(\Delta A/\Delta m) = a/m \text{ soit } m = A \cdot (\Delta m/\Delta A)$$

Si le produit ajouté est en solution, il faut tenir compte des effets de dilution.



1.1. Méthode de l'étalon interne (utilisée essentiellement en CPG) :

On compare la réponse du ou des produits à analyser à celle d'un étalon interne, donc introduit dans le mélange à doser et convenablement choisi.

Une solution étalon est préparée avec le ou les produits que l'on veut doser. Les masses sont connues $m'1$, $m'2$, et ... m_e pur l'étalon ; à ces masses correspondent les aires $A'1$, $A'2$, ..., $A'e$, sur le chromatogramme. Dans l'échantillon contenant les masses $m1$, $m2$, ... de solutés on ajoute m_e de l'étalon, ce qui donne les aires $A1$, $A2$, A_e .

On obtient :

$$m'1 = \alpha 1 A'1$$

$$m'2 = \alpha 2 A'2$$

$$m_e = \alpha_e A_e$$

avec α coefficient de proportionnalité

$$\text{et } k_1 = (\alpha_1 / \alpha_e) = (m_1 A_e / m_e A_1)$$

d'où la valeur k_1 puisque toutes les données sont connues.

Dans l'échantillon inconnu on aura :

$$m_1 = \alpha_1 A_1$$

$$m_e = \alpha_e A_e$$

$$(m_1/m_e) = (\alpha_1 A_1 / \alpha_e A_e) = k_1(A_1/A_e)$$

m_e , k_1 , A_1 , A_e sont connus.

Références bibliographiques

Burgot, G., Burgot, J.-L., 2011. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. Lavoisier.

Heftmann, E., 1983. Chromatography: fundamentals and applications of chromatographic and electrophoretic methods. P. A, Fundamentals and techniques.

Khabchi, M.E., 1993. Chromatographie en phase liquide: contribution à l'optimisation d'une séparation préparative en gradient d'éluion.

Mendham, J., Denney, R., Barnes, J., Thomas, M., 2005. Analyse chimique quantitative de Vogel. 1ère Edition edn. De Boeck.

Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., 2004. Analyse chimique-6ème édition-Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.

Yost, R.W., Ettre, L.S., Conlon, R.D., Vaumoron, J., 1981. Pratique de la chromatographie liquide. Technique et Documentation.

Site Internet

<http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>

<http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>

http://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/CHIM/Jumber/HPLC/Chromatographie_en_phase_liquide.htm

Partie III :
Chromatographie par
échange d'ions

Partie III : Chromatographie par échange d'ions

La chromatographie à échange d'ions (ou chromatographie à ions ou chromatographie échangeuse d'ions) est un type de chromatographie en phase liquide permettant d'isoler une substance chargée électriquement d'un mélange de molécules chargées (liquide). Pour cela, on fait passer le mélange sur une phase stationnaire (solide) chargée, déjà associée à des ions connus et on remplace ces ions par les ions/molécules chargées du mélange à séparer. C'est une technique chromatographique couramment utilisée en chimie analytique, notamment pour le contrôle de la qualité de l'eau. La chromatographie ionique est devenue depuis quelques années une des méthodes analytiques de références en analyse des eaux.

1. Schéma de principe d'une installation de chromatographie ionique.

On retrouve l'architecture modulaire classique de la chromatographie liquide, avec pour différence de pouvoir utiliser un mode de détection original basé sur la conductance des solutions. Cependant la nature et la concentration ionique de certaines phases mobiles sont à l'origine de difficultés avec ce mode de détection. On fait alors appel à un montage particulier comportant un « suppresseur », dispositif intercalé entre la colonne et le détecteur, qui a pour rôle d'éliminer les ions de l'éluant par réaction de type acido basique (Figure 2).

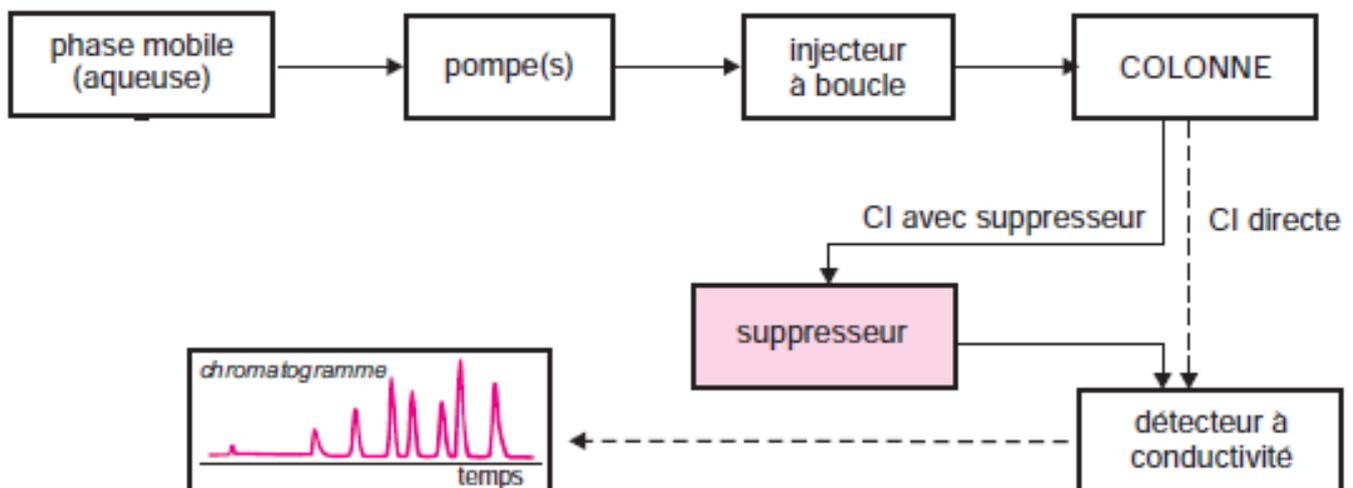
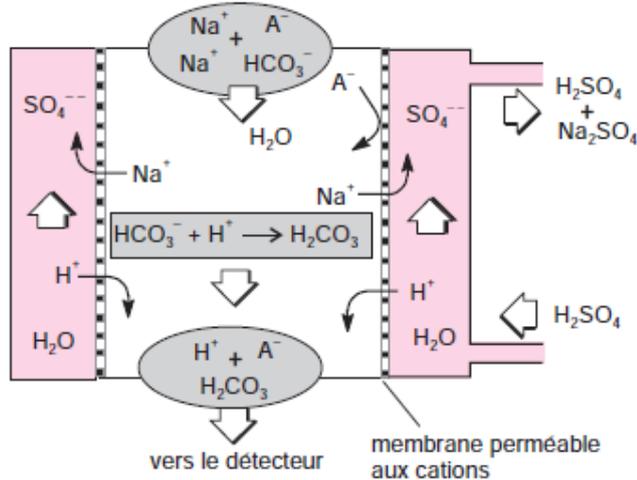


Figure 1. Schéma de principe d'une installation de chromatographie ionique.

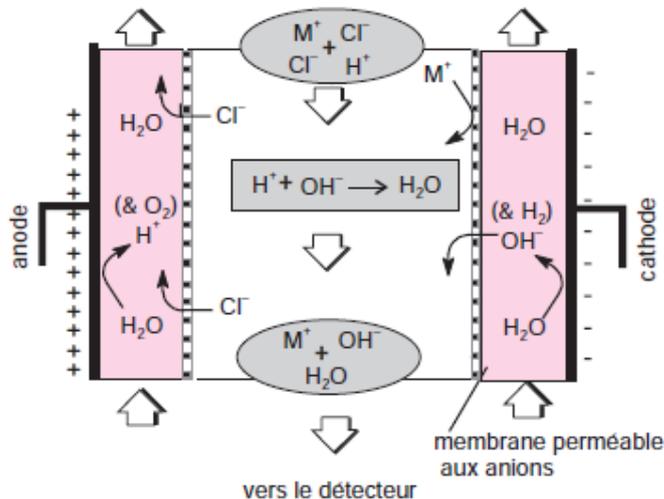
- a) suppresseur à fibre creuse installé en aval d'une colonne séparatrice anionique

élution de l'anion A-



- b) suppresseur à membrane autorégénérée installé en aval d'une colonne cationique

élution du cation M^+



c)

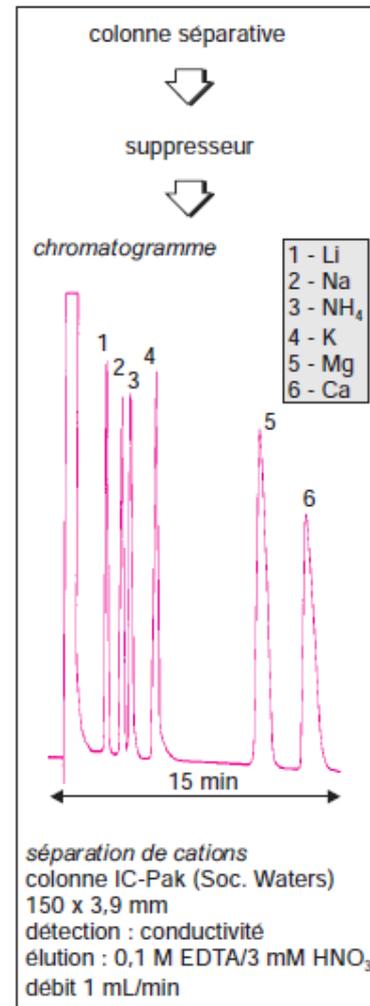


Figure 2. Principe de fonctionnement d'un suppresseur à membrane et d'un suppresseur à régénération électrochimique.

Il existe deux types de membranes, les unes perméables aux cations (H^+ et ici Na^+), les autres aux anions (OH^- et ici Cl^-). a) Le modèle à membrane microporeuse cationique est adapté à l'élution des anions. Seuls les cations peuvent traverser la membrane (qui correspond en fait à une paroi polyanionique fixe repoussant, par conséquent, les anions de la solution) ; b) le modèle à électro-désionisation fait ici appel à un suppresseur à membrane anionique, utilisé, par opposition au modèle précédent, en aval d'une colonne cationique. Il est régénéré en ions par électrolyse de l'eau. Noter, dans les deux cas, la circulation à contre-courant entre la phase

éluée et la solution du suppresseur post-colonne ; c) exemple d'une séparation de cations inorganiques (concentrations de l'ordre du ppm) utilisant un suppresseur de ce type.

2. Résines échangeuses d'ions

En chromatographie ionique la phase stationnaire est une résine échangeuse d'ion. Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution.

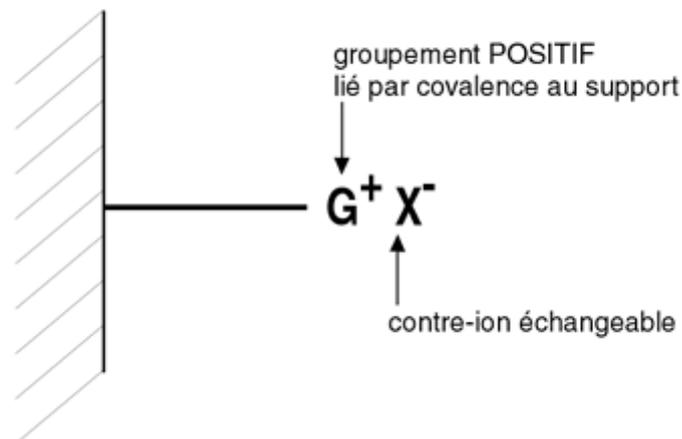
2.1. Groupements fonctionnels

On les classe selon leur charge en deux catégories :

- **Positif** : Résine échangeuse d'anions, qui échange réversiblement des anions



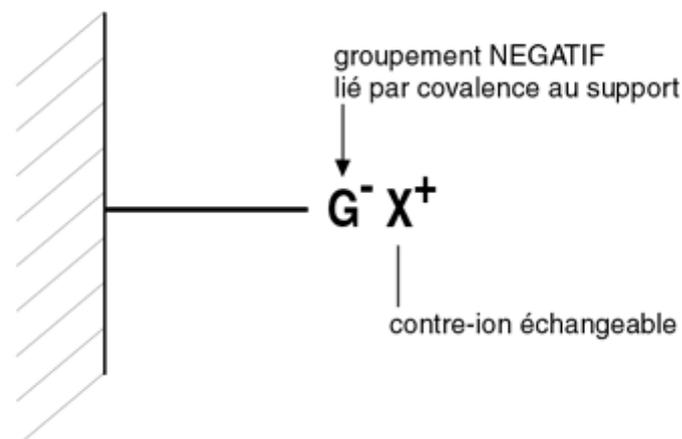
Résine échangeuse d'anions (anionique) :



- **Négatif** : Résine échangeuse de cations, qui échange réversiblement des cations



Résine échangeuse de cations (cationique) :



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

Echangeur de cations	Echangeur d'anions
<u>Forts</u>	
Résine- SO_3^- <u>Acide sulfonique</u>	Résine- $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ <u>Ammonium quaternaire</u>
<u>Faibles</u>	
Résine- COO^- <u>Groupement carboxylique</u>	Résine- NH_3^+ <u>Amine primaire</u>

Les groupements sont dit **forts** car leur capacité d'échange est constante et indépendante du pH, les groupements **faibles** ne sont pas ionisés à un certain pH.

2.2. Support

Les supports peuvent être de nature :

- **Minérale** : Silice
- **Organique** : synthétique ou naturelle
 - **Synthétique** : Résine polystyrénique
 - **Naturelle** : Cellulose ; Dextrane

Les phases stationnaires les plus connues sont obtenues par copolymérisation styrène/divinylbenzène afin d'obtenir des phases réticulées, résistantes à l'écrasement. Elles se présentent sous forme de particules sphériques d'un diamètre de quelques micromètres (**figure 3**). Ces particules sont ensuite greffées pour en faire des polyanions ou polycations.

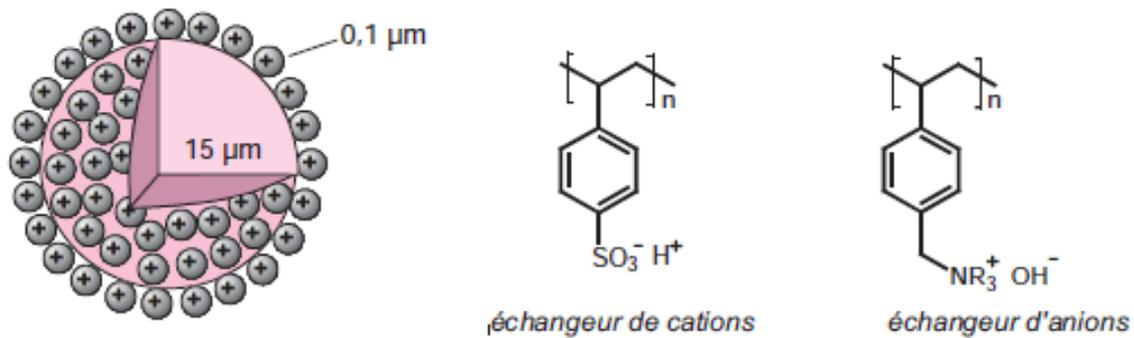


Figure 3. Résine échangeuse d'ions en polystyrène réticulé.

3. Principe

Dans un premier temps, la résine est équilibrée dans un tampon dont le pH est tel que le groupement porté par l'échangeur d'ion soit ionisé :

- Dans le cas d'une **base faible** le pH doit être **inférieur** au pKa du groupement ionisable (ex : pKa du diéthylaminoéthylammonium est de 9,5)



- Dans le cas d'un **acide faible** le pH doit être **supérieur** au pKa du groupement ionisable (ex : pKa du carboxyméthyl est de 4)



- Dans le cas d'une base ou un acide fort le groupement fonctionnel porte une charge net quelque soit le pH du milieu.

Pour comprendre le mécanisme d'une séparation, prenons pour exemple une colonne anionique comportant des groupements ammonium quaternaire, en équilibre avec une phase mobile riche en anions hydrogénéocarbonates (contre-anions). Ainsi, tous les sites cationiques de la phase stationnaire se trouvent appariés avec les ions de la phase mobile. Lorsqu'un anion A^- , apporté par l'échantillon, est entraîné par l'éluant, une suite d'équilibres réversibles se produit, régis par une équation d'échange qui détermine sa répartition entre les deux phases, mobile (PM) et stationnaire (PS).

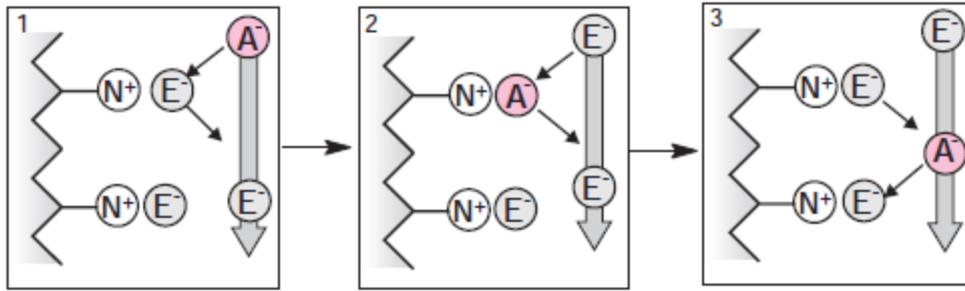
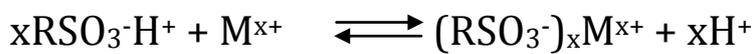


Figure 4. Principe de la chromatographie échangeuse d'ion

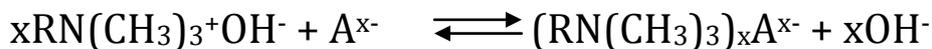
4. Equilibre d'échange ionique

Quand un échangeur de type acide sulfonique est mis en contact avec un solvant aqueux contenant un cation M^{x+} , il s'établit un équilibre décrit par



Solide
Solution
Solide
Solution

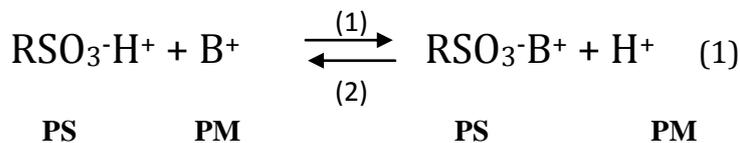
Où RSO_3H^+ représente l'un des nombreux groupements acide sulfonique fixé sur une molécule du polymère. De même, un échangeur de type base forte interagit avec un anion A^{x-} selon la réaction



PS
PM
PS
PM

L'équilibre de ces échanges ioniques est décrit par la loi d'action des masses.

Exp : Cas de la réaction entre un cation porteur d'une seule charge B^+ et une résine de type acide sulfonique placée dans une chromatographie



L'élution par une solution d'acide chlorhydrique déplace l'équilibre dans le sens 2, ce qui entraîne un transfert de B^+ dans la phase mobile. Ces ions progressent donc dans la colonne par une succession de transfert entre les phases stationnaire et mobile. Ces ions progressent par une succession de transfert entre les phases stationnaire et mobiles.

La constante d'équilibre K_{ex} de la réaction d'échange (1) s'écrit sous la forme

$$\frac{[\text{RSO}_3\text{-B}^+]_s [\text{H}^+]_m}{[\text{RSO}_3\text{-H}^+]_s [\text{B}^+]_m} = K_{\text{ex}} \quad (2)$$

$[\text{RSO}_3\text{-B}^+]_s$ et $[\text{RSO}_3\text{-H}^+]_s$ représentent les concentrations de B^+ et H^+ dans la phase solide. En réarrangeant les termes, on écrit

$$\frac{[\text{RSO}_3\text{-B}^+]_s}{[\text{B}^+]_m} = K_{\text{ex}} \frac{[\text{RSO}_3\text{-H}^+]_s}{[\text{H}^+]_m} \quad (3)$$

Pendant l'élution, la concentration des protons en solution aqueuse est supérieure à celle des ions B^+ . De plus le nombre de sites de l'échangeur est beaucoup plus élevé que le nombre de B^+ fixés. Par conséquent quand $[\text{RSO}_3\text{-H}^+]_s \gg [\text{RSO}_3\text{-B}^+]_s$ et $[\text{H}^+]_m \gg [\text{B}^+]_m$ le membre de droite de l'équation (3) est pratiquement constant et on peut écrire :

$$\frac{[\text{RSO}_3\text{-B}^+]_s}{[\text{B}^+]_m} = K = \frac{C_s}{C_m} \quad (4)$$

Où K est une constante qui correspond à la constante de distribution

Dans l'équation (2) K_{ex} représente l'affinité de la résine à l'ion B^+ par rapport à un autre ion (dans ce cas H^+). Les expériences montrent que les ions polyvalents sont retenus beaucoup plus fortement que les ions monovalents. Au sein d'un groupe d'ions de même charge, les différences de K_{ex} semblent surtout liées à la taille de l'ion hydraté. C'est ainsi que pour une résine sulfonée échangeuse de cations les valeurs de K_{ex} décroissent dans l'ordre $\text{Ag}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$. Pour les cations divalents, l'ordre est $\text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$.

Dans le cas des anions, K_{ex} pour une résine de type base forte décroît dans l'ordre $\text{SO}_4^{2-} > \text{C}_2\text{O}_4^{2-} > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{OH}^- > \text{F}^-$.

5. Séparation des acides aminés

La séparation et le dosage des mélanges d'acides aminés correspondent à une application classique de la chromatographie ionique couplée à une méthode colorimétrique. Les acides aminés ne pouvant être identifiés directement par absorption UV, on les fait réagir en sortie de colonne sur la ninhydrine pour faire apparaître, quel que soit l'acide aminé, le même dérivé coloré, aisément détectable par spectrophotométrie.

Pour séparer les acides aminés les uns des autres on utilise un appareillage spécialisé qui comporte une colonne cationique (polystyrène sulfoné) équilibrée avec une solution

d'hydroxyde de lithium de façon à ce que les groupements acides sulfoniques soient sous forme de sels de lithium (Figure 5). L'échantillon à doser étant porté à pH 2, les aminoacides, sous forme cationique, déplacent les ions Li^+ de la phase stationnaire et s'y fixent plus ou moins solidement en fonction de leur degré d'ionisation. L'élution se fait en augmentant progressivement le pH et les concentrations salines de la phase mobile. En sortie de colonne, ils sont mélangés à un réactif contenant de la ninhydrine puis chauffés. Mis à part les acides aminés secondaires (type R-NH-R'), qui donnent une coloration jaune (détectée à 440 nm), les acides aminés primaires (type R-NH₂) conduisent à la même coloration violette (détectée à 570 nm). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'acide aminé présente dans le milieu réactionnel. Dans des conditions déterminées, le rapport d'absorption optique 570 nm/440 nm est caractéristique pour chaque acide aminé. La limite de détectabilité est d'environ 30 picomoles.

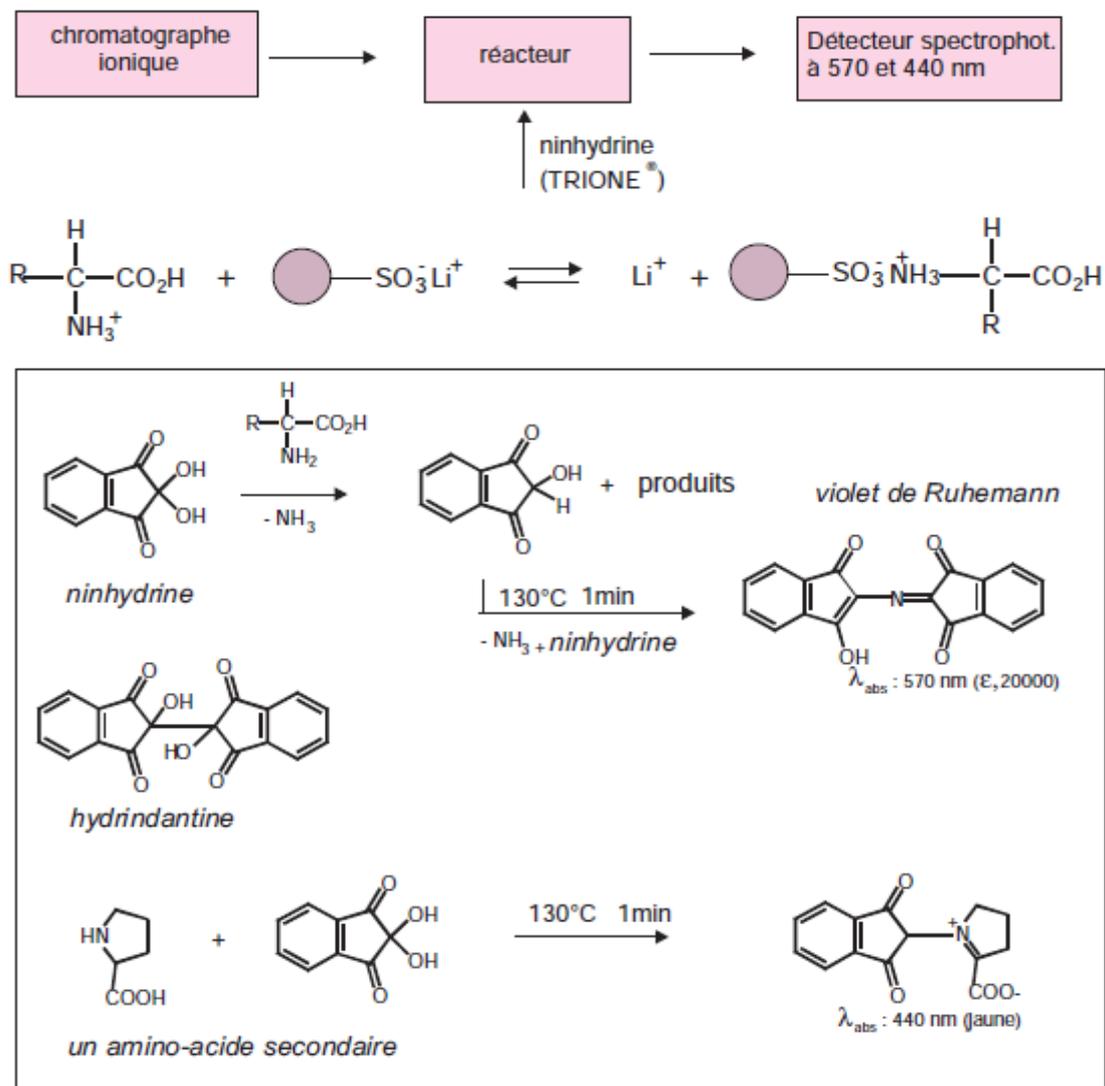


Figure 5. Analyse des acides aminés

Les molécules à séparer sont dans le même tampon (donc au même pH) et en fonction de leur point isoélectrique (pHi ou pI), elle porte une charge nette.

- ✓ **Négative** : Le pI de l'albumine du sérum bovin est de 4,9, cette protéine est chargée négativement au pH 7.
- ✓ **Nulle** : lorsque le pI de la molécule = pH du milieu.
- ✓ **Positive** : Le pI de la cytochrome c est de 10,7, cette protéine est chargée positivement à pH 7.

Il y a deux manière d'éluer les molécules fixées sur la résine :

- **En modifiant le pH** : de la phase mobile de telle sorte que les molécules qui sont chargées ne le soient plus ou qu'elles portent une charge du même signe que l'échangeur d'ion.
- **En ajoutant un sel à concentration croissante** : qui apportent forcément un ion de même charge que les molécules fixées à la résine ; cet ion s'appelle un contre ion.

Références bibliographiques

Mahuzier, G., Hamon, M., 1978. abrégé de chimie analytique, méthodes de séparation-tome 2, ed. masson.

Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., 2004. Analyse chimique-6ème édition-Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. De Boeck Supérieur.

Small, H., 2013. Ion chromatography. Springer Science & Business Media.

Small, H., Riviello, J., Pohl, C.A., 1997. Ion chromatography using frequent regeneration of batch-type suppressor. Google Patents.

Small, H., Stevens, T.S., Bauman, W.C., 1975. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. Analytical Chemistry 47, 1801-1809.

Weis, J., 2008. Ion chromatography. John Wiley & Sons.

Partie IV :
Chromatographie
d'exclusion stérique

Partie IV : Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie de perméation, plus souvent appelée chromatographie d'exclusion stérique "gel exclusion chromatography" (CES), gel filtration ou filtration sur gel ou tamisage moléculaire. On emploie surtout les deux derniers termes quand le solvant est aqueux et que la chromatographie se fait sous pression atmosphérique. On désigne la CES par *perméation de gel* quand elle est hydrophobe (la phase mobile est un solvant organique).

Divers fabricants vendent des matrices de filtration sur gel: "Sephadex", "Bio-Gel", ToyoPearl, etc. Il est à remarquer que l'usage le plus courant des résines "Sephadex" est bien la filtration sur gel même si un "Séphadex" peut être utilisé comme colonne d'affinité pour les protéines ayant une affinité pour les dérivés du dextran (glucose).

1. Principe

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) est basée sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon dans la phase stationnaire (Figure 1). La séparation résulte de l'existence de pores dans la phase stationnaire, dont le diamètre est comparable à celui des espèces présentes lorsqu'elles sont *en solution dans la phase mobile*.

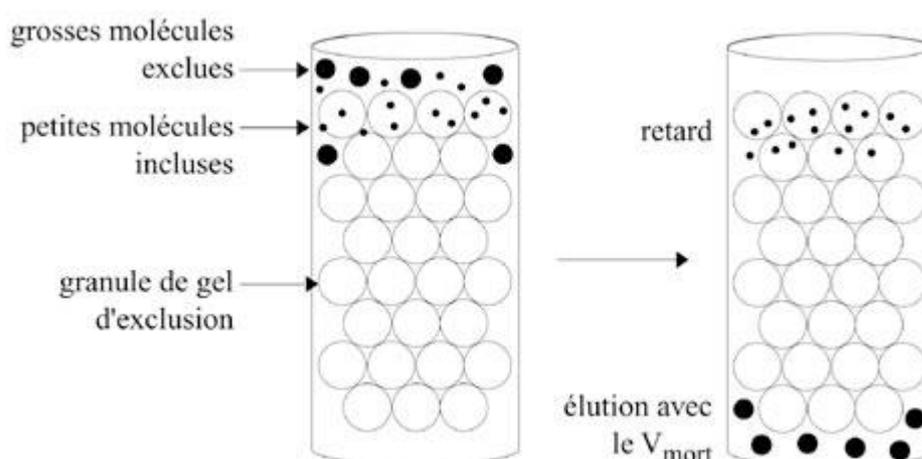


Figure 1. Schéma de la chromatographie d'exclusion stérique

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme plus spécifiquement leur rayon de Stokes. Cependant, puisque la taille d'une molécule d'une catégorie donnée est généralement proportionnelle à sa masse, cette technique est appliquée à la séparation selon la masse. Cependant, il ne faut jamais oublier que les relations entre le rayon de Stokes, la taille et la masse, sont affectées par de nombreux facteurs. La géométrie de la molécule est un des principaux facteurs. En effet une protéine fibrillaire (allongée) et une protéine globulaire de même masse ne se comporteront pas de la même façon dans un gel.

Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée (Figure 2).

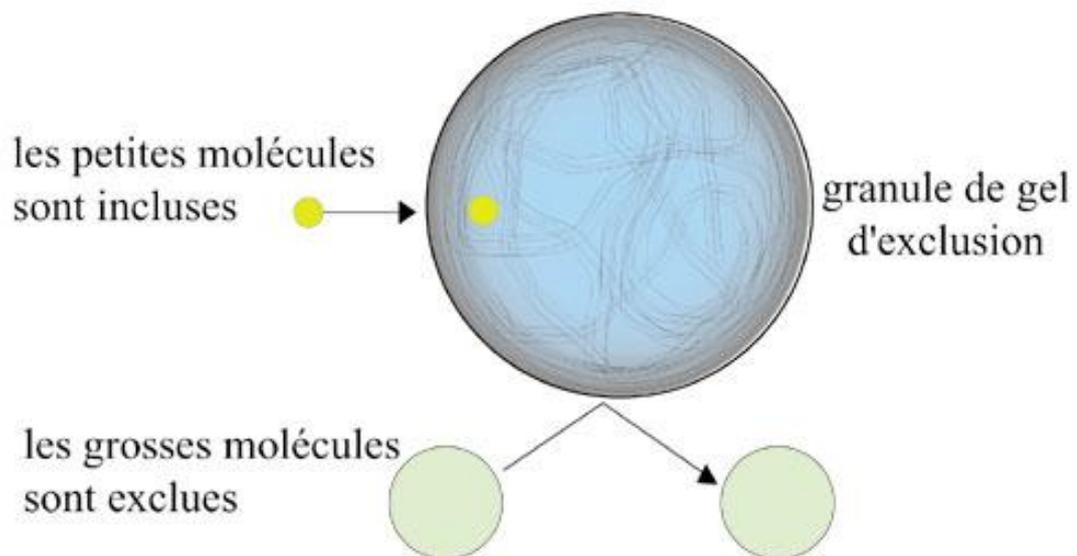


Figure 2. Représentation d'un gel d'exclusion.

Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. **Il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire.**

2. Théorie de la CES

Le volume total V_t (ou V_M : volume de la phase mobile) dans la colonne peut être décomposé en deux parties : le volume interstitiel V_I ou V_0 (extérieur aux pores) et le volume V_p qui est celui des pores. V_0 représente le volume de phase mobile nécessaire pour transporter, d'une extrémité à l'autre de la colonne, une grosse molécule supposée exclue des pores (Figure 3).

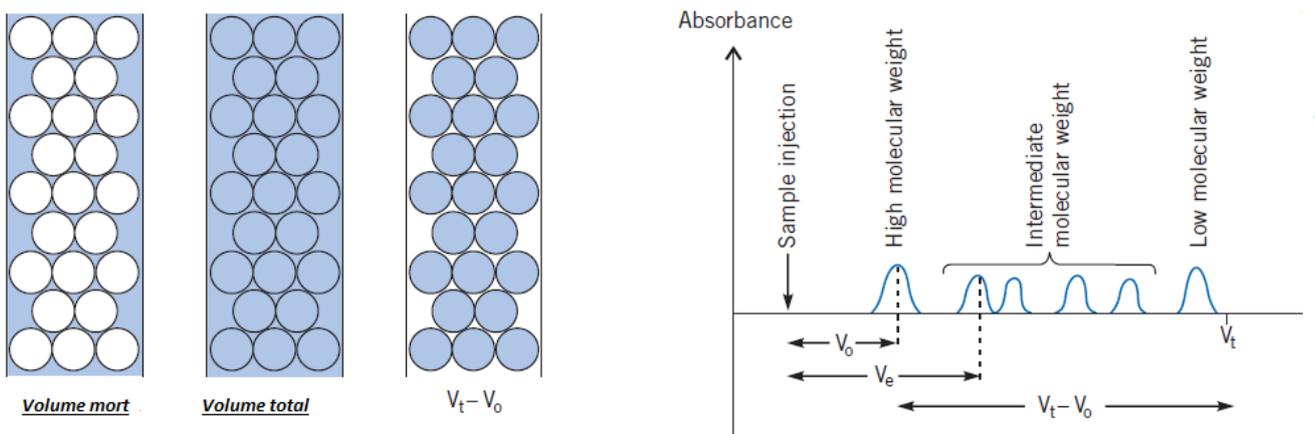


Figure 3. Les volumes caractéristiques de la CES

Nous avons V_t le volume correspondant pour une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores.

$$V_t = V_0 + V_p, \quad (1)$$

Les volumes d'éluion V_e sont donc compris entre V_0 et V_t On a :

$$V_e = V_0 + KV_p \quad (2)$$

Soit
$$K = \frac{V_e - V_0}{V_e - V_t} \quad (3)$$

K , coefficient de diffusion, représente le degré de pénétration d'une espèce dissoute dans le volume V_p ($0 < K < 1$). Pour la plupart des remplissages modernes.

Lorsque $K > 1$, le comportement du composé dans la colonne ne suit plus seulement le mécanisme d'exclusion stérique, mais il s'y ajoute des interactions physicochimiques avec le support comme en CLHP.

Le raisonnement ci-dessus est vérifié dans la pratique : les molécules dont le diamètre est plus grand que celui des plus larges pores ($K = 0$) sont exclues de la phase stationnaire (d'où vient l'expression d'*exclusion stérique*). Elles traversent la colonne sans être retenues et forment un seul pic sur le chromatogramme à la position V_0

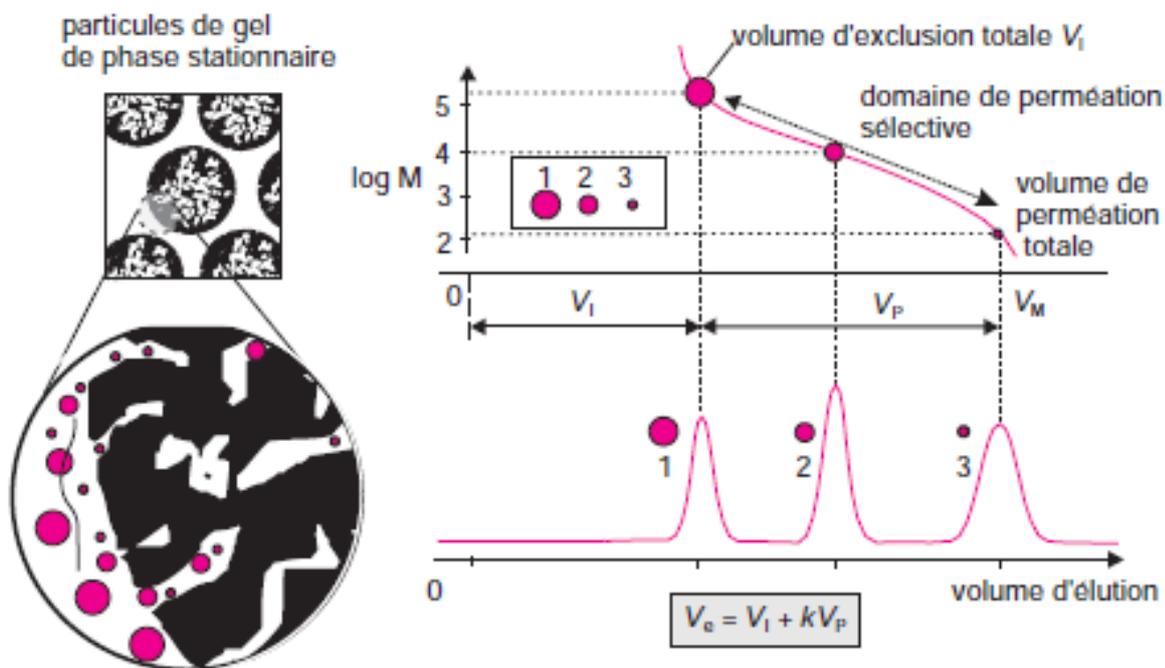


Figure 4. Principe de la migration dans la CES

Chromatogramme figurant une séparation de trois espèces (1,2,3) de tailles différentes en solution. Les molécules les plus grosses **1** arrivent en tête, suivies des molécules moyennes **2** et enfin des petites molécules **3**. Les volumes d'élué sont compris entre V_i et $V_t = V_P + V_i$. Image d'un gel poreux pour illustrer la notion de séparation selon la taille des pores.

3. Phase stationnaire

Un gel donné a un domaine de fractionnement spécifique (exprimé en termes de masse moléculaire) à l'intérieur duquel les protéines vont prendre, pour sortir du gel, un temps proportionnel à leur taille, donc à leur poids. À l'intérieur de cette marge, les molécules peuvent être séparées les unes des autres. Les molécules plus grosses que la limite supérieure

de fractionnement, la limite d'exclusion, vont donc sortir ensemble, assez rapidement. Les molécules plus petites que la limite inférieure sortiront ensemble beaucoup plus tard. Dans ces deux cas il est évidemment impossible de séparer les molécules selon leur masse. Les molécules ayant une masse entre ces deux limites pourront donc être séparées les unes des autres. Ces limites sont appelées domaine de fractionnement.

Il existe de très nombreuses marques de gels de filtration différents par leur stabilité, résistance à la pression et au débit, etc. On doit aussi comprendre que pour un gel ayant un domaine de fractionnement donné, on peut obtenir des préparations ayant une résolution plus ou moins fine. Les microbilles de faibles diamètres, de l'ordre de 20 mm, permettent d'obtenir une résolution très fine, alors qu'une préparation de billes plus de l'ordre de 200 mm ne permet qu'une résolution grossière.

C'est pourquoi certaines compagnies vendent des résines de qualités différentes, par exemple "coarse", "medium", "fine", "superfine". Les résines ayant une résolution supérieure ont l'inconvénient d'avoir un débit beaucoup plus lent et d'être beaucoup plus fragiles. De plus, elles sont beaucoup plus dispendieuses. Ces deux caractéristiques limitent évidemment leur emploi à des applications requérant une plus grande précision.

Exemples de gels de filtrations

Le Sephadex™ G, de la compagnie Pharmacia, est probablement la plus connue des résines de filtration sur gel. Il est constitué de dextran (un polymère linéaire de glucose) dont les fibres sont réticulées à l'épichlorohydrine pour former les microbilles poreuses. Les différentes variantes (G-25, G-100, G-200, etc.) sont obtenues en contrôlant la réaction de réticulation. Les variantes ont différentes capacités de rétention d'eau, porosités, domaines de fractionnement, limites d'exclusion, etc.

Le Sephadex LH, toujours de Pharmacia, est un dérivé hydroxypropylé du Sephadex G. Il est stable en présence de solvant organiques purs ou mélangés avec de l'eau.

Le Bio-Gel P est produit par Bio-Rad. C'est un polymère d'acrylamide réticulé avec du bisacrylamide.

Le Sephacryl, de Pharmacia, est plus ou moins l'équivalent du Bio-Gel P, sauf qu'il c'est un mélange composite de dextran et d'acrylamide.

Le Sepharose, de Pharmacia, est une préparation d'agarose gélifiée en microbilles et débarrassée de la grande majorité de ses contaminants chargés. La stabilité de cette matrice est due aux liens hydrogène qui lient les polymères d'agarose entre eux. On peut contrôler le domaine de fractionnement en modulant la quantité d'agarose qu'on fait

gélifier. Les limites d'exclusion sont extrêmement élevées, souvent de l'ordre du million de Da.

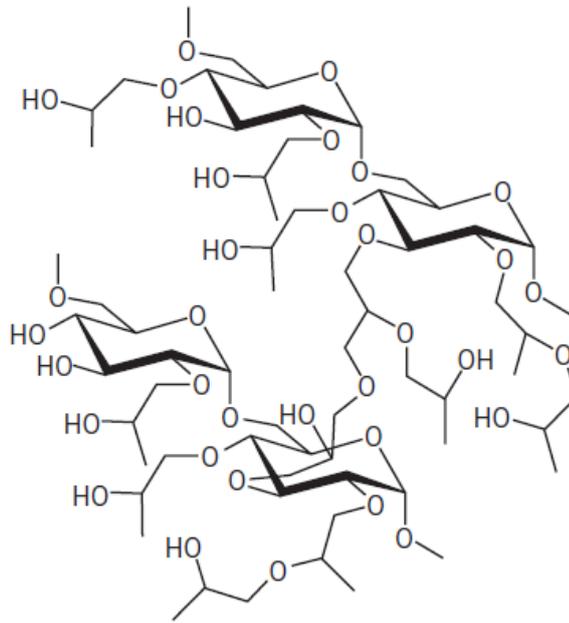


Figure 4. Structure du gel Sephadex LH

4. Applications de la CES

Il existe deux grands types d'application des filtrations sur gel couramment utilisé en biochimie: les séparations de groupe, pour obtenir une séparation grossière, et le fractionnement moléculaire pour une séparation fine.

La séparation de groupe consiste à séparer les petites molécules des grosses, en deux groupes distincts: les grosses molécules qui sortent dans le volume mort et les autres qui sortent plus tard. Ainsi, la filtration sur gel peut servir au "dessalage" de solutions: séparation brute des protéines d'une solution des molécules de petit poids moléculaire comme les sels (d'où le terme "dessalage"), sucres, acides aminés, etc. Dans ce cas on utilise une résine ayant un petit domaine de fractionnement où toutes les protéines iront dans le volume mort tandis que les sels et autres petites molécules pourront entrer dans les pores du gel. Il est alors facile de recueillir le volume mort contenant les protéines débarrassées des petites molécules.

Dans le fractionnement moléculaire, on sépare un mélange complexe (généralement de protéines) en plusieurs fractions de poids moléculaire spécifique. Le principal usage de ce type de procédure est la détermination de la masse moléculaire des protéines, ce qui est une application "analytique". C'est une technique assez précise qui permet de travailler sur des molécules non dénaturées et possédant encore leur structure quaternaire.

On peut aussi se servir du fractionnement moléculaire pour purifier une protéine donnée, ce qui est donc une application "préparative".

Références bibliographiques

Filtration, G., 1991. Principles and methods. Handbooks from Amersham Biosciences.[Can be downloaded from the following website: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_gelfiltration.pdf].

Huber, L., 1994. Principles and techniques of practical biochemistry. Wiley Online Library.

Mahuzier, G., Hamon, M., 1978. abrégé de chimie analytique, méthodes de séparation-tome 2, ed. masson.

Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., 2004. Analyse chimique-6ème édition-Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.

Site internet

ww.123bio.net/cours/chromato/exclusion.html

http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/chrfilgel.html

Partie V :
Chromatographie
planaire

Partie V : Chromatographie planaire

1. Généralités

La chromatographie planaire est une technique complémentaire de la CLHP et qui peut être une étape préliminaire à cette dernière, puisque le principe de la séparation et la nature des phases reste le même, seul diffère la mise en œuvre des deux techniques.

Les méthodes de chromatographie planaire comprennent :

- ✓ La chromatographie sur papier
- ✓ La chromatographie sur couche mince
- ✓ L'électrochromatographie

Les méthodes de chromatographie planaires utilisent une couche plane, relativement mince d'un matériau rigide ou déposé sur une surface de verre, de plastique ou de métal.

La phase mobile se déplace à travers la phase stationnaire par capillarité, par gravité ou encore sous l'action d'une tension électrique.

2. Principe

Le principe de la séparation par chromatographie planaire diffère selon qu'il s'agit d'une chromatographie sur papier ou d'une chromatographie sur couche mince, même si le mode opératoire reste pratiquement pareil pour les deux types de chromatographie planaire.

- La chromatographie sur papier est une chromatographie de partage basée sur la différence de solubilité des espèces à séparer. La phase stationnaire est formée par l'eau liée ou adsorbée aux molécules de cellulose du papier. La phase mobile est un liquide, l'éluant. Si une espèce est plus soluble dans l'éluant, elle se déplace plus rapidement qu'une espèce qui l'est moins et inversement.
- La chromatographie sur couche mince est semblable à la chromatographie sur colonne c'est une chromatographie d'adsorption; elle est basée sur la différence d'adsorption sur la phase stationnaire, des espèces à séparer entraînées par l'éluant. La phase stationnaire est un solide, généralement de la silice.

3. Mode Opérateur

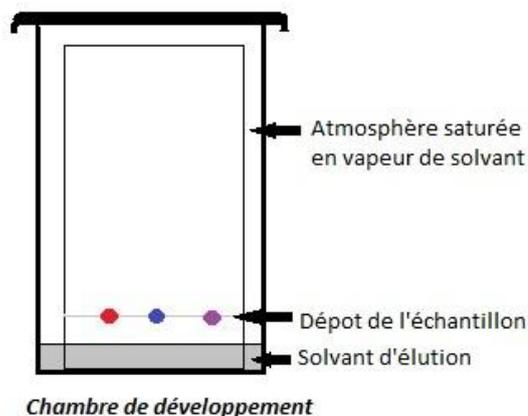
La mise en œuvre de la chromatographie planaire se fait en trois étapes :

3.1. Dépôt de l'échantillon : On dépose habituellement une goutte de solution contenant 0,01 à 0,1% de l'échantillon de 1 à 2cm du bord de la plaque.

Pour une meilleur séparation la tache doit avoir un diamètre minimum, environ 5mm pour une analyse qualitative et moins pour une analyse quantitative.

3.2. Développement de la plaque : (Processus au cours duquel l'échantillon est entraîné par une phase mobile à travers la phase stationnaire)

- Marquer avec un crayon l'endroit où est placée la goutte de l'échantillon.
- Après évaporation du solvant de l'échantillon, la plaque est placée dans un récipient clos que l'on sature par de la vapeur du solvant du développement.
- On immerge une extrémité de la plaque dans ce solvant, en prenant soin d'éviter tout contact direct entre l'échantillon et le solvant.
- Le solvant grimpe le long de la plaque par capillarité en emportant l'échantillon.
- Lorsque le front de solvant a parcouru la moitié ou les 2/3 de la longueur de la plaque on la retire du récipient et on la sèche.



3.3. Localisation de l'analyte : Plusieurs méthodes sont employées pour localiser les constituants de l'échantillon après leur séparation :

- Méthodes s'appliquant à la plupart des mélanges organiques, consistent à vaporiser une solution d'iodes ou d'acide sulfurique qui réagissent tous deux avec les composés organique pour donner naissance à des produits sombres
- Méthodes s'appliquant à des espèces particulières
Exp : La ninhydrine pour localiser les acides aminés
- Une autre méthode de détection est basée sur l'incorporation d'un matériau fluorescent à la phase stationnaire. Après développement, la plaque est examinée sous un éclairage ultraviolet. La plaque sera fluorescente partout, sauf aux endroits où se trouvent les constituants de l'échantillon.

4. Paramètres de la chromatographie planeaire

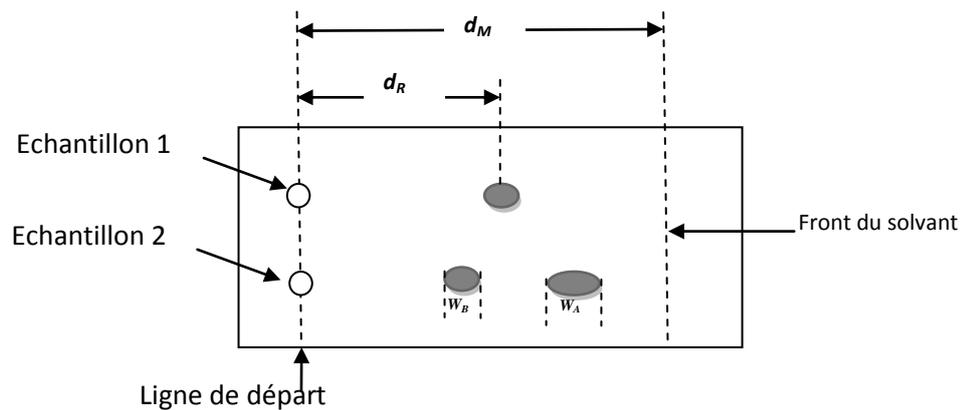
4.1. Facteur de retard

En chromatographie planeaire chaque soluté est défini par son facteur de retard R_f

$$R_f = d_R / d_M$$

Où d_R : distance parcourue par le soluté

d_M : distance parcourue par le front de solvant



4.2. Facteur de rétention

t_m et t_r correspondent aux temps nécessaire pour que la phase mobile et le soluté se déplacent d'une distance donnée dans ce cas d_R

Pour la phase mobile :

$$t_m = d_R / u$$

(u : La vitesse de la phase mobile)

Le soluté n'atteint ce point que lorsque la phase mobile s'est déplacée de la distance d_M , on a donc :

$$t_r = d_M / u$$

En combinant la relation $k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$ avec les deux précédentes on trouve :

$$k' = \frac{dR - dM}{dR}$$

Le facteur de rétention k' peut être exprimé en terme de facteur de retard.

$$k' = \frac{1 - Rf}{Rf}$$

4.3. Nombre de plateaux théoriques

On définit l'efficacité N de la plaque pour un composé dont la distance de migration est d_R et le diamètre du spot W par la relation :

$$N = \left[\frac{dR}{W} \right]^2$$

La hauteur équivalente à un plateau théorique est donc égale à :

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

4.4. Résolution

La résolution entre deux spot successive est défini par la relation :

$$R = 2 \frac{dR2 - dR1}{W1 + W2}$$

5. Application de la chromatographie planaire

- **Application qualitative :** L'identification d'une substance inconnue peut être présumée en comparant son R_f avec celle de composés connus, déposés sur le même chromatogramme. Cependant, une confirmation s'avère toutefois toujours nécessaire.
- **Application quantitative :** Il existe différentes méthodes qui permettent une analyse quantitative d'un soluté en chromatographie planaire.
- Une estimation semi-quantitative de la quantité d'un composant présent peut être obtenue par comparaison de l'aire de la tache avec celle d'un étalon.

- La mise en solution la tache et détermination de sa concentration par une méthode appropriée (spectrophotométrie, spectrofluorimétrie...).
 - Mesure des propriétés de réflexion ou de fluorescence de la tache à l'aide d'un densimètre.
- **Etude préliminaire à la chromatographie liquide haute performance (CCM) :** La CCM permet la mise au point de système chromatographique pouvant être ensuite transposés et adaptés sous certaines conditions à la chromatographie sur colonne.

Références bibliographiques

Burgot, G., Burgot, J.-L., 2011. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. Lavoisier.

Poole, C.F., 2003. The essence of chromatography. Elsevier.

Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., 2004. Analyse chimique-6ème édition-Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.

Partie VI :
Chromatographie en
phase gazeuse

Partie VI : Chromatographie en phase gazeuse

1. Introduction

Le concept de chromatographie en phase gazeuse a été introduit par Archer Martin et Richard Synge (Anglais) en 1941. C'est une **méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition**. C'est une **chromatographie** de partage dans laquelle la phase mobile est un **gaz**. Elle constitue la méthode la plus puissante et la plus fine pour séparer, identifier et quantifier les corps gazeux ou volatilisables. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges éventuellement très complexes dont les constituants peuvent différer de façon considérable par leur nature et leur volatilité.

Il existe deux types de chromatographies en phase gazeuse (CPG) :

- **Chromatographie gaz-solide (CGS)** : C'est une chromatographie d'adsorption, peu utilisée en raison des traînées dans les pics d'élutions provoquées par la non linéarité du processus d'absorption
- **Chromatographie gaz-liquide (CGL)** : basé sur le partage des constituants à séparer (les solutés) entre une phase gazeuse mobile inerte appelé gaz vecteur et une phase liquide fixée sur la surface d'un support poreux inactif. Cette dernière est très utilisée dans de nombreux domaines, son nom est parfois abrégé en **chromatographie en phase gazeuse**.

2. Principe

- L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile et qui n'interagit pas avec l'échantillon ; sa seule fonction est le transport de l'analyte dans la colonne. Les gaz utilisés comme phase mobile sont le **dihydrogène** ou l'**helium** ou le **diazote** ou le **dioxyde de carbone**. La fonction du gaz phase mobile est d'être le vecteur d'entraînement à travers la colonne des molécules analytes lorsqu'ils se trouvent à l'état gazeux en état de non rétention par la phase stationnaire. A la sortie, la molécule est fragmentée puis un

détecteur mesure la quantité de débris qu'il envoie comme signal sur une table traçante.

- On obtient un spectre où apparaissent des pics d'intégration proportionnelle à la quantité de produit injecté. Le pic est caractérisé par son temps de rétention, porté en abscisse.
- Selon la nature de la colonne (polaire ou pas) et de la température du four, du choix de gradient de température, le temps de rétention est variable.

Quels sont les facteurs de séparation des analytes en CPG ? Ils sont de deux ordres :

a) la volatilité (il suffira de comparer les valeurs de point d'ébullition des différents analytes à séparer) différente des analytes. La phase mobile est un gaz, elle ne permet donc l'avancement que des analytes qui sont à l'état gazeux à un instant donné. Ainsi, plus un analyte est volatil, plus son élution sera rapide toutes choses étant égales par ailleurs.

b) les interactions (faibles) plus ou moins importantes entre les analytes et la phase stationnaire :

- interactions faibles de surface de type **adsorption** en CPG gaz-solide
- **solubilisations différentielles** dans la phase stationnaire liquide en CPG gaz-liquide

On retiendra donc le couple (volatilité de l'analyte, interactions analyte-phase stationnaire) comme étant le couple permettant de caractériser le comportement d'un analyte.

3. Grandeurs de rétentions

3.1. Volume de rétention

La phase gazeuse mobile est compressible, la grandeur volume de rétention est utilisée avec un facteur de correction plutôt que la grandeur temps de rétention.

$$V_r = t_r \cdot D$$

V_r : Volume de rétention ou d'élution d'un soluté retenu par la phase stationnaire.

t_r : temps de rétention de ce soluté

D : Débit de la phase mobile (cm^3/s) ou (ml/s).

$$V_m = t_m \cdot D$$

V_m : Volume mort ; volume de la phase mobile ou d'un soluté non retenu par la phase stationnaire.

t_m : temps mort ; temps de rétention d'un soluté non retenu par la phase stationnaire.

$$V_r' = V_r - V_m$$

V_r' : Volume de rétention réduit

3.2. Volume de rétention réduit corrigé (V_n)

Pour tenir compte du fait que le gaz vecteur est compressible et que la pression dans la colonne augmente entre l'entrée et la sortie de la colonne et donc que le débit augmente, Archer Martin a introduit le facteur de correction j

$$V_n = j \cdot V_r' = j \cdot t_r' \cdot D$$

V_n : Volume de rétention réduit corrigé (volume net)

$$j = 3/2 \cdot [(P^2 - 1)/(P^3 - 1)]$$

$$P = P_e / P_s$$

j : Facteur de compression ou facteur de perte de charge

P_e : pression d'entrée

P_s : pression de sortie

3.3. Indice de rétention (I)

Kovats en 1958, a proposé l'indice de rétention I comme paramètre d'identification des solutés. Le chromatogramme en régime isotherme d'un mélange de n alcanes montre que les $\log(t_r)$ croissent linéairement en fonction du nombre n d'atomes de carbone (C) indépendamment du remplissage de la colonne, de T et des autres conditions de chromatogr.

$$I(n \text{ alcane}) = 100 \times \text{nbre d'atomes de carbon}$$

I (soluté) peut être obtenu à partir d'un mélange du soluté et d'au moins 2 alcanes normaux (hydrocarbures aliphatiques linéaires saturés C_nH_{2n+2}) qui encadrent I (soluté).

Explication

soluté A dans phase mobile \rightarrow soluté A dans phase stationnaire $\Delta_r G^0$

pour qu'il y ait séparation chromatographique, il faut $\Delta_r G^0 < 0$

$$K = [A]_{\text{Stat}} / [A]_{\text{Mob}}$$

K est donc la constante d'équilibre et le rapport de distribution

puisque $\Delta_r G^0 = RT \cdot \ln K$ (cf. chapitre "Equilibre chimique")

et que $K = \beta \cdot k' = \beta \cdot t_r' / t_m$ (cf. chap. Notions fond. Chromatographie)

$$\ln t_r' = \ln K + \ln (t_m / \beta) ; \ln t_r' = \Delta_r G^0 / RT + \ln (t_m / \beta) \text{ pour A}$$

La courbe $\ln t_r'$ en fonction de n des n alcanes A, B, C, ... varie comme $(\Delta_r G^0)$ à T° cste.

Il en est de même pour $\log t_r'$

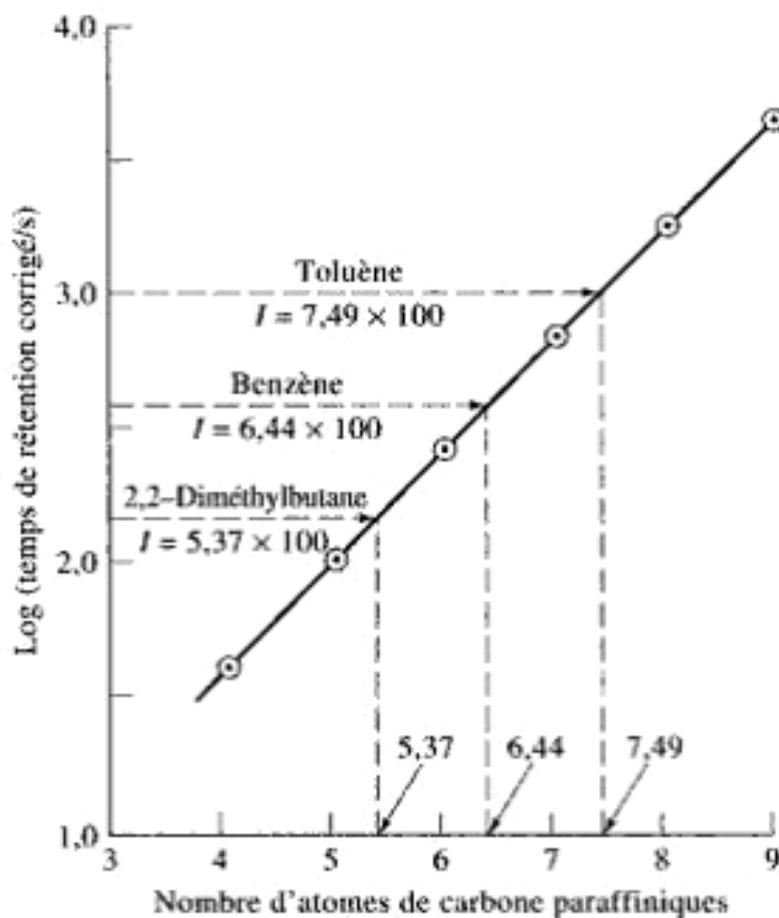


Figure 1. Droite de Kovats

des 6 n alcanes de C4 à C9 : $\log (t_r'(n)) = f(n) = a \cdot n + b$

La pente de la droite dépend de la colonne et du réglage du chromatographe.

L'indice de rétention ne dépend que de la phase stationnaire.

Indice de rétention du toluène = 749

4. Instrumentation

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse *comporte trois parties : injecteur, colonne et détecteur* (figure 2) à travers lesquels un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer. *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.

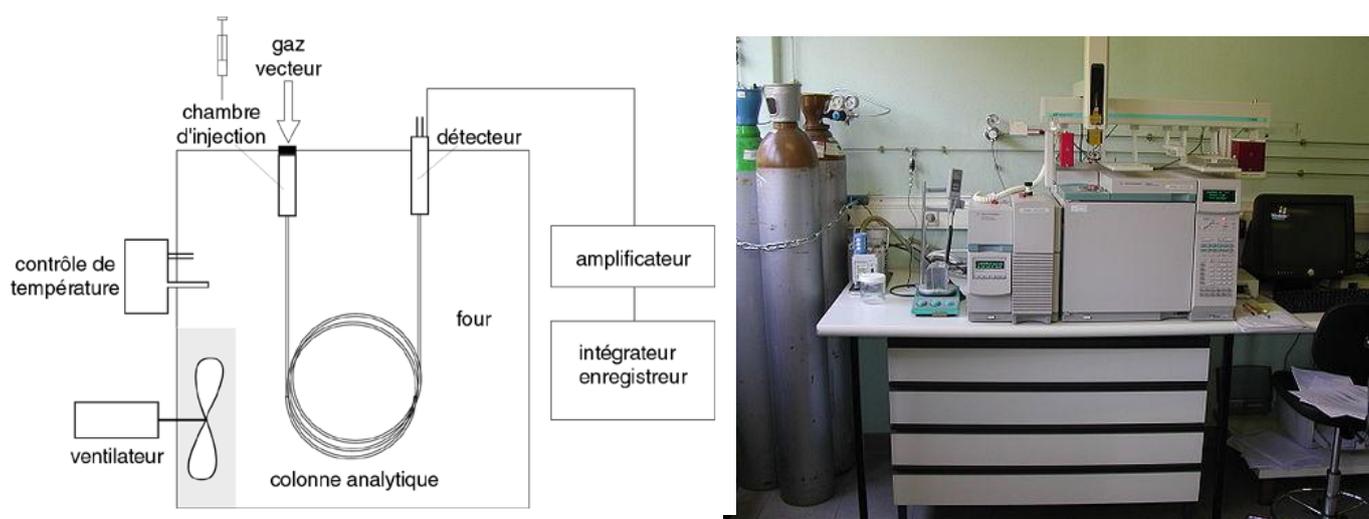


Figure 2. Une installation de CPG

4.1. Échantillons

Les limites de sensibilité sont, selon les appareils, de l'ordre du nanogramme et même du picogramme. Le traitement de l'échantillon varie selon les substances analysées :

- Lorsque les *solutés sont directement volatilisables*, les substances sont *solubilisées dans un solvant et chromatographiées*.
- Lorsque les solutés ne sont *pas volatils* à la température du chromatographe ou bien sont décomposés à cette température, *il faut les transformer en dérivés volatils* stables : les acides aminés sont ainsi estérifiés par le butanol, les acides gras estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés,...

4.2. Injecteur

Il sert à l'introduction du mélange à analyser dans la colonne. Cette opération est faite :

- A l'aide d'une *microseringue* pour les liquides et les solutions.
- A l'aide d'une *vanne à boucles* pour les mélanges gazeux.

En règle générale, la *chambre d'injection doit être à une température plus élevée que celle de la colonne pour faciliter l'évaporation des échantillons*. La température idéale est celle qui est 20°C plus élevée que le point d'ébullition de la substance la moins volatile.

Le *choix de l'injecteur est dicté par le type de colonne* utilisée (remplie ou capillaire) *et* par la *nature des produits à séparer* (leur résistance à la décomposition lorsqu'ils sont soumis à de hautes températures).

Il y a essentiellement *deux techniques d'injection*, si on ne tient pas compte de *colonne d'une fraction de ce qui est injecté (split / splitless)*. Cette dernière technique est utilisée avec les colonnes capillaires.

4.3. Colonnes

Elles peuvent être *métalliques, en plastique* pour des séparations à basse température, *en verre* et joints Téflon. Diverses formes ont été utilisées : *rectilignes, en U, en spirales* (la plus répandue).

Il existe *deux grands types* de colonnes avec des variantes (Figure 3) :

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

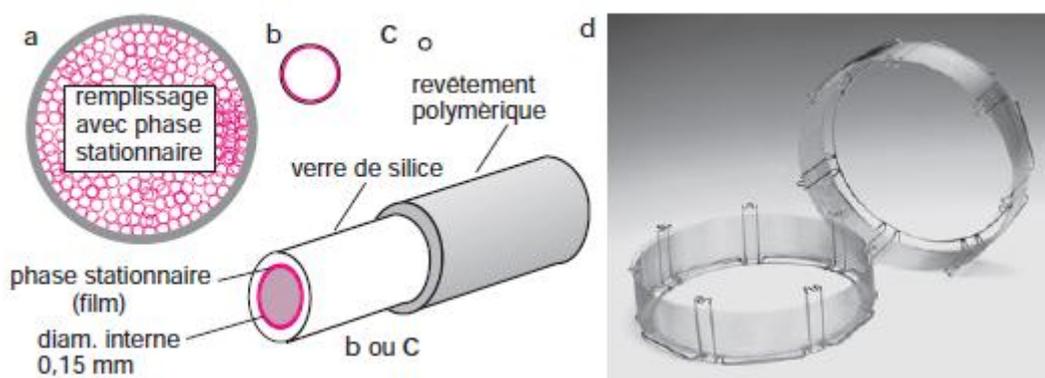


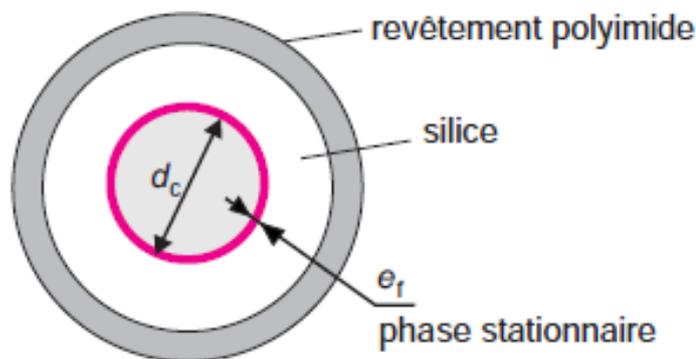
Figure 3. Colonnes en CPG

Représentation à la même échelle des sections des trois types de colonnes. a) Colonne remplie de 2 mm de diamètre ; b) colonne capillaire « 530 » de 0,53 mm; c) colonne capillaire de 0,1 mm; détail d'une colonne capillaire. À cette échelle, l'épaisseur de phase stationnaire serait à peine visible ; d) colonnes commerciales de 50 m de longueur.

- **Caractéristiques des colonnes remplies ou à garnissage (packed)**
 - Diamètre interne : 1/8 " (3,2 mm) ou 1/4 " (6,4 mm).
 - Longueur : 0,5 à 3 mètres.
 - Tube : acier inoxydable (assez inerte et bon conducteur de chaleur) ou verre (inerte mais mauvais conducteur de chaleur).
- **Caractéristique des colonnes capillaires**
 - Diamètre interne : de 0,1 à 2 mm.
 - Longueur : de 15 à 100 m.
 - Tube : silice fondue recouverte d'une mince couche de polyimide.
 - **Grande efficacité** : 200000 plateaux (≈ 1000 pour une colonne remplie). A noter que le terme de remplissage A de l'eqt de Van Deemter est ici nul.
 - coût, fragilité (casse, oxydation), faible capacité : injecteur split-splitless

Influence de l'épaisseur du film (colonne capillaire)

Pour comparer ou prévoir le comportement des colonnes capillaires, il est utile de calculer le rapport de phase $\beta = V_m/V_s$. En appelant d_c le diamètre interne de la colonne et e l'épaisseur du film déposé.



Nous avons $k' = K/\beta$ (k' : facteur de capacité)

Le volume de la phase mobile est égal à $V_m = 2\pi r^2 L$ (où L est la longueur de la colonne)

Le volume de la phase stationnaire est égal au volume de la couronne d'épaisseur e soit

$$V_s = 2\pi r e L.$$

On obtient donc pour le rapport de phase : $\beta = \frac{2\pi r^2 L}{2\pi r e L} = \frac{r}{e} = \frac{d_c}{4e}$ (eq. 1)

et par conséquent : $k' = \frac{(t_r - t_m)}{t_m} = \frac{K}{\beta} = \frac{4Ke}{d}$ (eq. 2)

$$t_r = t_m \left(1 + \frac{K}{\beta} \right) = \left(1 + \frac{4Ke}{d} \right) t_m \quad (\text{eq. 3})$$

D'après l'**eq. 3**, on peut déduire que le temps d'analyse (**tr**) augmente si :

- le diamètre intérieur de la colonne capillaire (**d**) diminue
- l'épaisseur du film de phase stationnaire (**e**) augmente.

En outre s'il n'y a aucune affinité entre un produit et la phase stationnaire soit **K=0**, on a **tr = tm**, ce qui est le cas de l'air ou en première approximation du méthane.

On peut déduire de l'**eq. 2** que :

- pour bien analyser une substance volatile, il faut augmenter **k'**, donc diminuer le diamètre (**d**) de la colonne et (ou) augmenter l'épaisseur du film de phase stationnaire (**e**).
- pour bien analyser une substance peu volatile, il faut diminuer **k'**, donc augmenter le diamètre (**d**) de la colonne et (ou) diminuer l'épaisseur du film de phase stationnaire (**e**).

En pratique si les composés à séparer sont volatils, on choisira une colonne dont le rapport **β** sera petit (< 100), et inversement. Une colonne de 320 mm dont la phase stationnaire fait 1 mm d'épaisseur, conduit à **β = 80** alors que pour une colonne de 250 mm et une épaisseur de phase de 0,2 mm, **β = 310**.

Remarque : **β**, accessible à partir des caractéristiques physiques de la colonne permet de calculer les coefficients de partage **K** dont les valeurs sont généralement très grandes (1 000 par exemple), ce qui est dû à la nature de la phase mobile qui est ici un gaz.

4.4. Phases stationnaires

Pour les colonnes remplies, la technique d'imprégnation, de mise en œuvre très simple, permet de choisir de nombreux composés organiques peu volatils à usage de phases stationnaires. Mais, pour les colonnes capillaires, les contraintes de fabrication imposent un choix beaucoup plus limité. Les phases actuelles correspondent à deux principaux types de composés : les *polysiloxanes* et les *polyéthylèneglycols*, chaque catégorie pouvant faire l'objet de modifications structurales mineures (Figure 4).

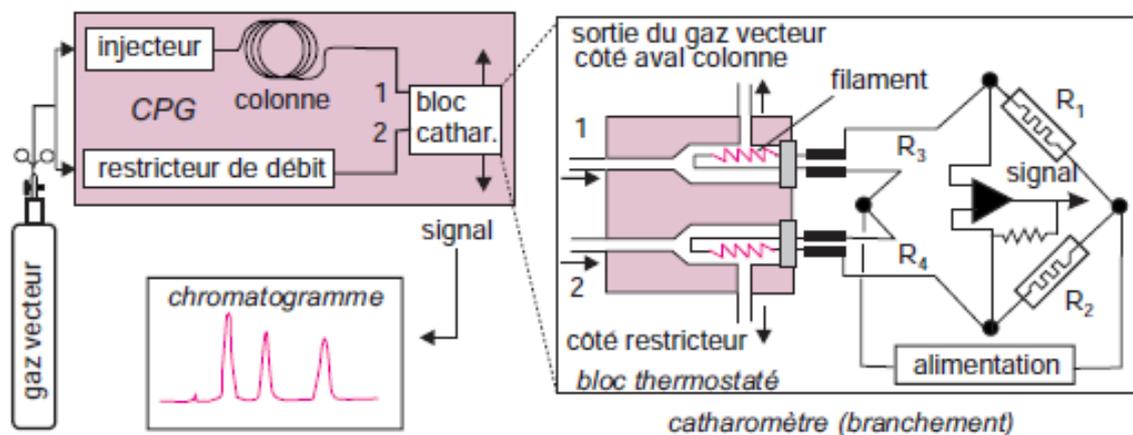


Figure 5. Catharomètre

4.5.2. Détecteur à ionisation de flamme (FID)

C'est le détecteur par excellence de la CPG actuelle. Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans la flamme d'un petit brûleur alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées, responsables du passage d'un courant ionique extrêmement faible (10^{-12} A) entre deux électrodes (*ddp* de 100 à 300V). L'extrémité du brûleur sert d'électrode de polarisation (masse). La seconde électrode, de forme annulaire, entoure la flamme. Le signal est amplifié par un électromètre en une tension mesurable (Figure 6).

4.5.3. Détecteur thermoionique (NPD)

Ce détecteur est très sensible aux composés azotés (N) ou phosphorés (P). Il comporte un petit cylindre en céramique dopée avec un sel alcalin (ex. sulfate de rubidium) auquel on applique une tension électrique pour entretenir un petit plasma (800 °C) alimenté par combustion d'un mélange air/hydrogène (figure 6). À la différence du FID la flamme est plus petite. Les composés contenant N ou P donnent, assez spécifiquement, des fragments de décomposition transformés en ions négatifs. Ces ions sont recueillis sur une électrode collectrice. Le diazote de l'air est inactif. La sensibilité est typiquement de 0,1 pg/s pour N ou P.

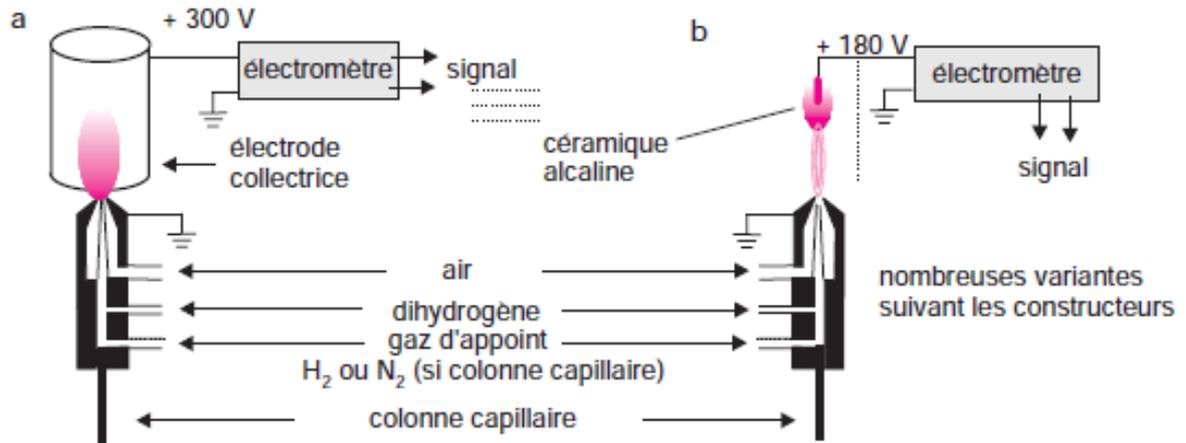


Figure 6. Détecteur FID (a) et détecteur NPD (b).

4.5.4. Détecteur à capture d'électrons (ECD)

Une source telle que le tritium (^3H) ou le (^{63}Ni) envoie des électrons libres dans le détecteur. Quand ce détecteur est traversé par des substances ayant une affinité pour les électrons libres, il se produit des ions qui, comme pour le détecteur à ionisation de flamme, dans le champ électrostatique existant, sont recueillis par une électrode et forment un courant d'ionisation à amplifier convenablement.

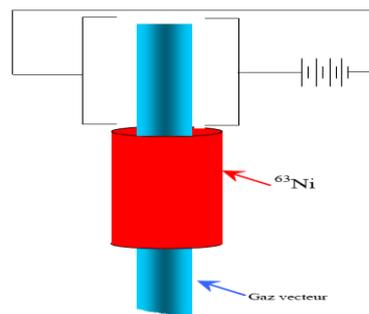


Figure 7. Détecteur à capture d'électrons (ECD)

5. Optimisation d'une analyse CPG

En CPG il y a quatre paramètres opérationnels pour une phase stationnaire donnée : L , longueur de la colonne et u , vitesse de la phase mobile (qui conditionnent N), T température de la colonne et β rapport de phase (qui conditionnent k). Les réglages du chromatographe permettent d'agir sur T et sur u , donc sur l'efficacité et sur les facteurs de rétention.

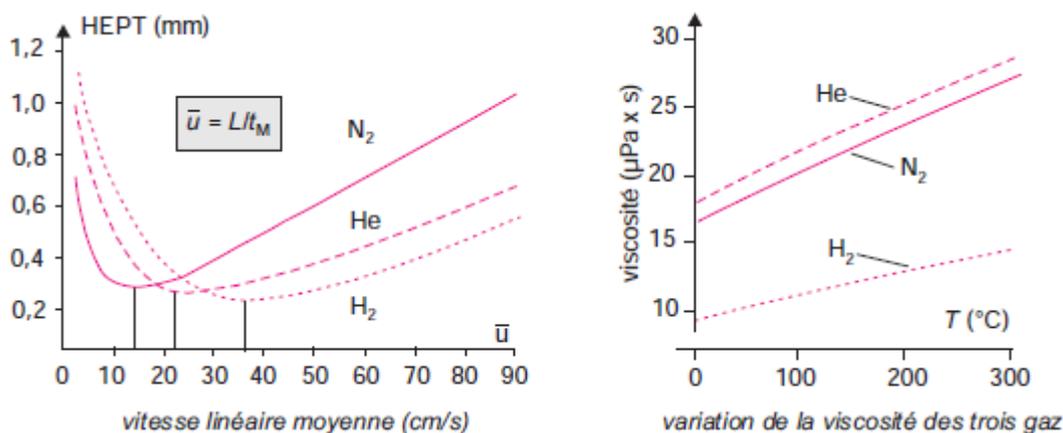


Figure 8. Efficacité en fonction de la nature et de la vitesse linéaire du gaz vecteur.

Ces courbes typiques de van Deemter montrent que l'hydrogène est, parmi les 3 gaz étudiés, celui qui permet les séparations les plus rapides, à performances égales, tout en donnant plus de souplesse en ce qui concerne le débit, ce qui est très utile en mode programmation de température. Noter l'augmentation de la viscosité de ces gaz avec la température T . On constate aussi que l'hélium est plus visqueux que le diazote, à température égale.

Références bibliographiques

Burgot, G., Burgot, J.-L., 2011. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. Lavoisier.

Heftmann, E., 1983. Chromatography: fundamentals and applications of chromatographic and electrophoretic methods. P. A, Fundamentals and techniques.

Mendham, J., Denney, R., Barnes, J., Thomas, M., 2005. Analyse chimique quantitative de Vogel. 1ère Edition edn. De Boeck.

Perrin-Drouin, Y., 1958. Chromatographie en phase gazeuse: méthode de partage gaz-liquide.

Poole, C.F., 2003. The essence of chromatography. Elsevier.

Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., 2004. Analyse chimique-6ème édition-Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. De Boeck Supérieur.

Sites internet

ftp://ftp.mn-net.com/francais/Flyer_Catalogs/Chromatographie/Catalogue-FR/KATFR200001-5CPG-www.pdf

<http://chemphys.u-strasbg.fr/mpb/teach/chromato3/chromato3.pdf>.

http://licence3-chimie.u-bourgogne.fr/cours_supports/CM_Denat_2010_Chromatographie.pdf

<http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/CPG.html>

Partie VII :
Electrophorèse
capillaire

Partie VII : Electrophorèse capillaire

1. Introduction

L'électrophorèse capillaire représente une famille de techniques qui utilisent des capillaires étroits (diamètre interne de 10 à 200 μm) pour réaliser avec une très grande efficacité la séparation électrophorétique de molécules de tailles très variables. Le domaine d'application de cette technologie est très vaste et elle permet d'analyser des macromolécules complexes telles que les protéines et les acides nucléiques ou des solutés de petite taille comme les médicaments organiques, les anions et cations inorganiques. Des voltages très importants (plusieurs dizaines de kV) sont utilisés pour séparer les molécules sur la base de leur différence de rapport charge/taille.

2. Instrumentation

L'instrumentation est relativement simple et comporte les éléments principaux suivants : un générateur de haut voltage, deux réservoirs de tampon et un capillaire que traverse un système optique de détection relié à un module d'acquisition des données (**figure 1**). L'ensemble de l'instrument est contrôlé par un ordinateur.

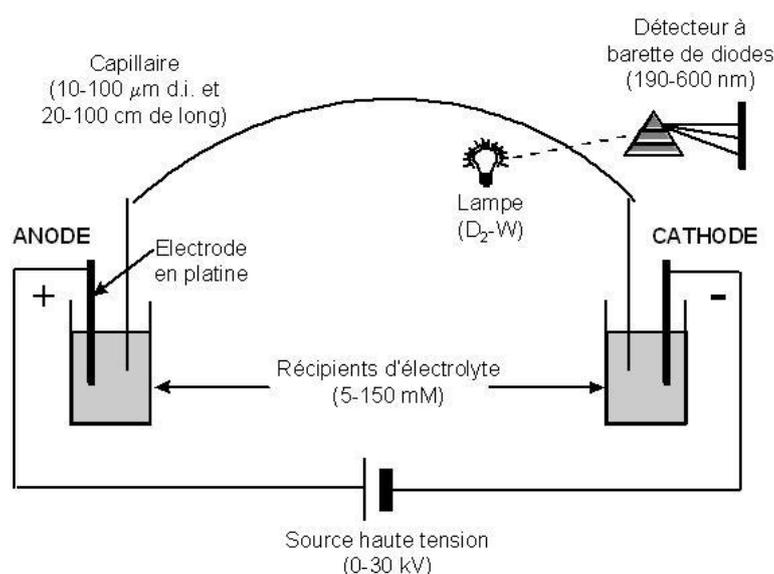


Figure 1. Schéma montrant l'appareillage d'une électrophorèse capillaire

✓ **Tube capillaire en silice fondue :**

- 50 à 100 μm de diamètre interne recouvert de polyimide à l'extérieur : souplesse et rigidité
- Les extrémités du capillaire plongent dans un réservoir de tampon
- Le capillaire se remplit de solution tampon

✓ **Détection :**

- Détection en ligne : fenêtre de détection au niveau d'une portion capillaire dépourvue de polyimide
- Les systèmes de détection employés sur le capillaire sont issus des technologies développées en chromatographie liquide à haute performance. Les détecteurs les plus utilisés en électrophorèse capillaire sont ceux utilisant les propriétés spécifiques des molécules comme l'absorption dans l'ultraviolet, la fluorescence, la spectrométrie de masse, l'électrochimie, la radiométrie et la spectroscopie Raman. Le système de détection le plus simple et le plus utilisé en électrophorèse capillaire est l'absorption en ultraviolet. La limite de détection de l'absorption en ultraviolet, située entre 10^{-13} et 10^{-15} M, est généralement plus élevée que celle des autres détecteurs de propriétés spécifiques.

✓ **Electrodes :**

- Il existe une électrode de platine dans chaque flacon, qui sont reliées à un générateur de tension (0 à 30 KV).

3. Principe

L'électrophorèse permet la séparation de molécules ou particules chargées. La séparation des molécules s'effectue en appliquant un champ électrique à travers un fluide conducteur contenant les substances à séparer. La vitesse de migration, appelée mobilité électrophorétique, dépend de la nature, de la charge ainsi que du ratio charge/masse des molécules. L'application de l'électrophorèse capillaire à l'étude des complexes est possible lorsque les charges nettes portées par la protéine, le polysaccharide et le complexe ont des valeurs suffisamment différentes.

3.1. Théorie de l'électrophorèse

Force agissant sur un ion sphérique de rayon r et de charge Q :

- **Force électrique** : $F = QE$, imprime à l'ion une vitesse croissante.

- **Force de frottement** : $F' = 6\pi r\eta v$ (loi de Stokes) qui s'applique en sens inverse de F

A l'équilibre $F = F'$ et la vitesse devient constante (v) ; soit $QE = 6\pi r\eta v$

$$v = \frac{QE}{6\pi r\eta} \quad (\text{eq. 1})$$

La vitesse dépend donc du :

- Champ électrique
- Charge
- Taille
- Viscosité

Les espèces présentes dans l'échantillon sont soumises à deux effets principaux qui se manifestent pour les ions comme pour les molécules ou les micelles. Il s'agit d'une part de leur *mobilité électrophorétique* propre et d'autre part du *flux* ou *écoulement électroosmotique*,

a) Mobilité électrophorétique (μ_e) : égale à la distance parcourue par la particule dans l'unité de temps sous l'influence d'un champ électrique.

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi r\eta} \quad (\text{eq. 3})$$

$$r = \frac{K_B T}{6\pi\eta D_m} \quad (\text{eq. 4})$$

r : rayon de Stock

K_B : constante de Boltzman

D_m : coefficient de diffusion de l'analyte

La charge Q de la molécule est fonction du pH isoélectrique de la particule et du pH du solvant, on appelle pH isoélectrique d'une particule, le pH pour lequel cette particule ne migre pas dans un champ électrique. La différence $\text{pH} - \text{pHi}$ détermine le signe de la charge Q d'une particule :

si $\text{pH} > \text{pHi}$ charge nette négative (anion) migration vers l'anode

si $\text{pH} < \text{pHi}$ charge nette positive (cation) migration vers la cathode

si $\text{pH} = \text{pH}_i$ charge nette nulle pas de migration

On affecte à la mobilité μ_e ($\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) le signe (+) ou (-) selon la nature de la charge portée; elle est nulle pour une espèce sans charge nette.

b) Mobilité électro-osmotique — électro-osmose (μ_{eos}) :

La mobilité électro-osmotique μ_{eos} est due à l'ionisation de la paroi interne du capillaire à partir du pH 2,5, les groupements silanols de la silice du capillaire vont s'ioniser et se charger (-), d'autant plus que le pH sera élevé. Pour respecter l'électroneutralité, les cations de l'électrolyte vont s'amasser vers la paroi et les anions seront repoussés.

On va assister à la formation d'une double couche (figure 2):

- ✓ 1 Statique (+) solidement fixée à la paroi : c'est la couche de Stern.
- ✓ 1 Diffuse : c'est la couche de Gouy-Chapman

Entre ces deux couches on a un potentiel ξ (zêta) qui caractérise la densité de charge de la surface du capillaire. Quand on applique une tension, les cations de la couche diffuse vont être entraînés vers la cathode et entraîner avec eux tout l'échantillon. Ces ions étant solvatés par des molécules d'eau, il apparaît un flux d'électrolyte qui se dirige dans le même sens. Plus au coeur de la solution, le champ électrique provoque la migration des cations vers la cathode. Les anions sont aussi entraînés : ils progressent « contre-électro-osmotiquement »

Ce flux de cations s'appelle le flux électroosmotique μ_{eos} . Il est caractéristique de l'électrolyte (nature, pH, force ionique) mais indépendant de la tension appliquée. Plus le pH sera élevé, plus la paroi sera ionisée et plus ξ sera élevé ainsi que la mobilité.

- A pH alcalin ont aura une mobilité maximum.
- Au contraire, à un pH de 2,5-3, la mobilité sera faible.

NB : En fait, plus la force ionique est élevée, et plus la couche diffuse a une épaisseur réduite et plus le mouvement sera faible.

On définit μ_{eos} par la relation :

$$\mu_{\text{eos}} = v_{\text{eos}}/E = v_{\text{eos}}L/V \text{ (eq. 5)}$$

Pour calculer μ_{eos} on doit déterminer v_{eos} . Celle-ci correspond à la vitesse d'écoulement dans l'électrolyte des espèces sans charge globale. On y accède à partir du temps de migration t_{mn} que met un *marqueur neutre* à usage de traceur pour parcourir la distance effective l du capillaire, $v_{eos} = l/t_{mn}$ (eq. 6). On choisit comme marqueur une molécule organique, non polaire au pH de l'électrolyte utilisé, et facilement détectable par absorption dans le proche UV (ex. acétone, oxyde de mésityle ou alcool benzylique).

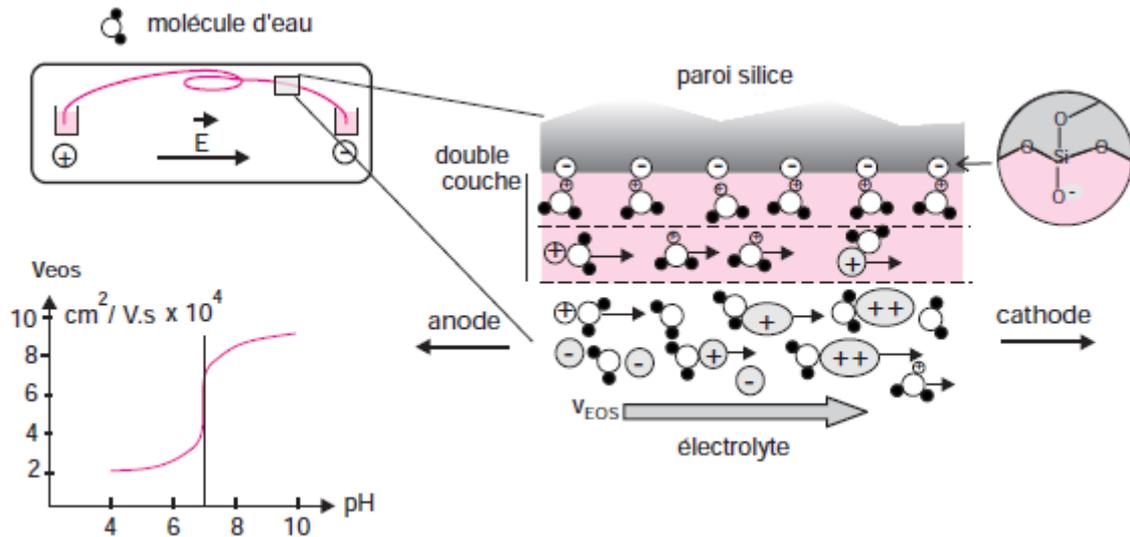


Figure 2. Effet de la double couche sur l'apparition d'un flux électro-osmotique dans un capillaire rempli par un électrolyte.

c) Mobilité apparente (μ_{app})

La mobilité apparente correspond à la vitesse réelle de migration des molécules au sein du capillaire et correspond à la somme de la mobilité électrophorétique et de la mobilité électroosmotique. En électrophorèse capillaire, le temps de migration d'un analyte dépend donc de sa mobilité électrophorétique et de la mobilité du flux.

$$v_{app} = v_e + v_{eos} \quad (\text{eq. 7})$$

v_{app} est aisément calculable à partir de l'électrophorégramme à partir de l , longueur utile du capillaire entre les points d'injection et de détection et de t_m , son temps de migration.

v_{app} est donnée par la relation : $v_{app} = l/t_m$ (eq. 8)

La mobilité électrophorétique apparente μ_{app} , est définie par l'eq. 9, est telle que :

$$\mu_{app} = v_{app}E = v_{app}LV \quad \text{par conséquent on a : } \mu_{app} = \frac{lL}{t_m V} \quad (\text{eq. 9})$$

En combinant le flux électro-osmotique de l'électrolyte et la mobilité apparente il est donc possible de calculer la mobilité électrophorétique vraie des espèces porteuses de charges. À partir de l'éq. 7, on écrira :

$$\mu_e = \mu_{app} - \mu_{eos} \quad (eq. 10)$$

soit :

$$\mu_e = L \cdot l/V \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{mn}} \right) \quad (eq. 11)$$

3.2. Ordre de migration

- ✓ On a d'abord les petites espèces avec une μ_e importante et accélérée par le flux.
- ✓ Puis les espèces plus grosses avec une $\mu_e > 0$
- ✓ Puis les molécules neutres avec un $\mu_e = 0$ qui migrent à la vitesse du flux.
- ✓ Les anions enfin qui seront entraînés vers la cathode par le flux (et donc à contre-sens, les gros d'abord puis les petits (figure 3).

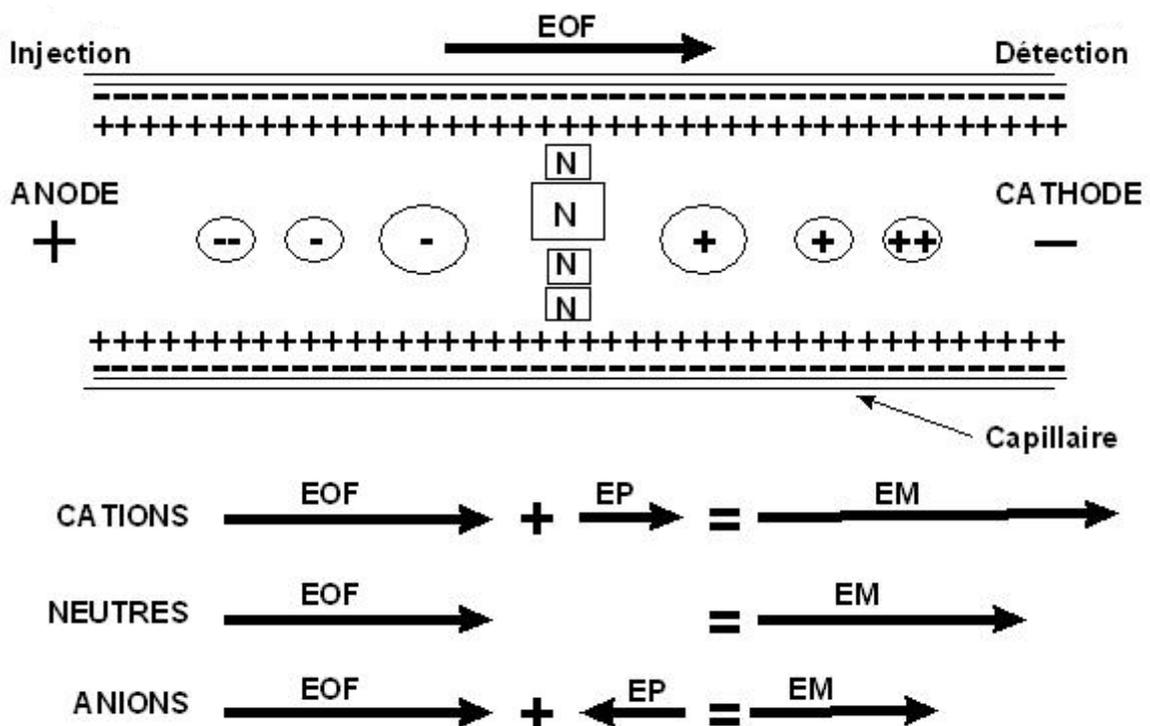


Figure 3. Ordre d'éluion des molécules selon leur charge et taille

4. Efficacité et résolution

Le nombre de plateaux théoriques ou efficacité en électrophorèse capillaire est donné

par :
$$N = \frac{\mu_e v l}{2D_m L} \text{ (eq. 12)}$$

l : la longueur parcourue par le soluté

L : la longueur du capillaire.

$$H = \frac{l}{N} \text{ (eq. 13)}$$

Selon cette équation, l'efficacité de la séparation est seulement limitée par la diffusion et est proportionnelle à l'intensité du champ électrique.

L'efficacité des séparations en électrophorèse capillaire est généralement plus grande que celle d'autres méthodes de séparation tel que l'HPLC. Contrairement à l'HPLC, l'électrophorèse capillaire n'implique pas de transfert de masse entre les phases.

Références bibliographiques

Ait-Adoubel, A., 2004. Nouvelles approches en électrophorèse capillaire pour l'énantioséparation d'acides aminés aromatiques ou aliphatiques non dérivés.

Blessum, C., Jeppsson, J., Aguzzi, F., Bernon, H., Bienvenu, J., 1999. L'électrophorèse capillaire: principe et applications au laboratoire de biologie clinique, Annales de Biologie Clinique, pp. 643-657.

Girard, M., 2003. Etude qualitative et quantitative des interactions entre la β -lactoglobuline et la pectine en système dilué. Université de Laval.

Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., 2004. Analyse chimique-6ème édition-Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. De Boeck Supérieur.

Sites internet

<http://www.pharmaetudes.com/ressources/cours%20internat/section1/6-electrophorese-capillaire.pdf>