

Domaine: Science et Technologie

Parcours : Matériaux et Energie

Spécialité: Matériaux

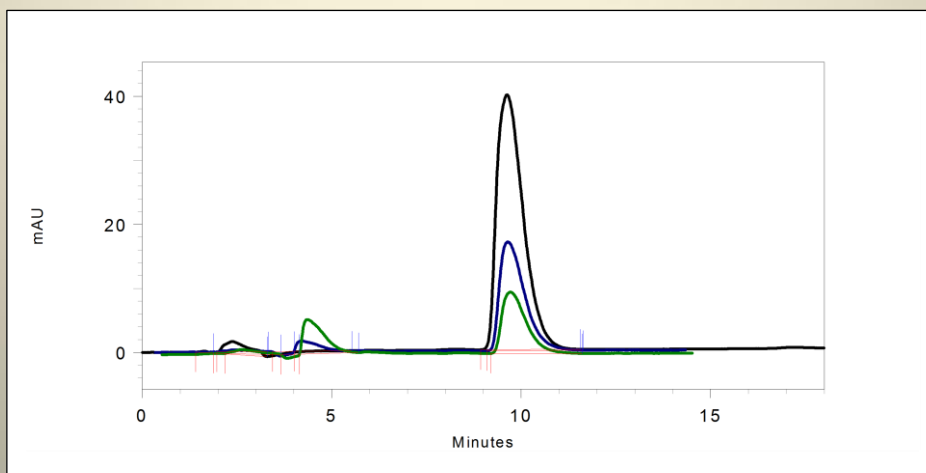
Niveau: M<sub>2</sub>(S<sub>3</sub>)

Unité d'Enseignement : **Fondamentale**

Elément constitutif : **Méthodes d'analyse et de caractérisation**

## Cours 2: Méthodes d'Analyses Chromatographiques

Dr. TRIGUI Abdelwaheb



## Table des Matières

Préface.....	1
<b>Chapitre I</b>	
<i>Généralité sur la chromatographie</i>	
1. Définition.....	2
2. Historique .....	2
3. Classification des techniques chromatographiques.....	3
3.1. Classification selon la nature physique des phases.....	3
3.2. Classification selon le mécanisme de rétention.....	3
3.3. Classification selon la technique mise en jeu .....	3
4. Choix de la technique .....	4
5. Terminologie et grandeurs de rétention.....	5
5.1. Chromatogramme.....	5
5.2. Elution .....	5
5.3. Le temps mort .....	5
5.4. Le temps de rétention .....	5
5.5. Le temps de rétention réduit.....	6
5.6. Le volume de rétention.....	6
5.7. Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile.....	7
5.8. Le facteur de capacité .....	7
5.9. Facteur de sélectivité.....	8
6. Efficacité d'une colonne.....	8
7. Résolution.....	10
8. Equation de Van Deemter .....	11
9. Optimisation d'une analyse chromatographique .....	12
<b>Chapitre II</b>	
<i>Chromatographie liquide classique</i>	
1. Chromatographie sur Colonne.....	15
1.1. Introduction.....	15
1.2. Description de la méthode.....	15
1.3. Phase stationnaire.....	15
1.4. Eluant.....	16

1.5. Vitesse d'élution.....	16
1.6. Dimension de la colonne.....	17
1.7. Remplissage de la colonne.....	17
1.8. Dépôt de l'échantillon.....	18
1.9. Alimentation en solvant.....	18
1.10. Analyse des fractions.....	18
<i>2. Chromatographie sur couche mince.....</i>	
2.1. Définition.....	21
2.2. Appareillage.....	21
2.3. Adsorbant .....	22
2.4. L'éluant.....	23
2.5. Dépôt de l'échantillon.....	23
2.6. Développement de la plaque.....	23
2.7. Révélation.....	24
2.8. Paramètre de séparation.....	24
2.9 Efficacité d'une plaque CCM.....	25
<i>3. Chromatographie sur papier.....</i>	
3.1. Introduction.....	
3.2. Principe.....	
3.3. Papier.....	

### **Chapitre III**

#### *Chromatographie liquide haute performance*

<i>1. Chromatographie liquide haute performance.....</i>	30
1.1. Introduction.....	30
1.2. Appareillage.....	30
1.3. Réservoir de solvants.....	31
1.4. Dispositif de dégazage .....	32
1.5. Pompe .....	32
1.6. Injecteur.....	33
1.7. Colonne.....	34
1.7.1. Les thermostats des colonnes.....	34

1.8. Détecteurs.....	35
1.8.1. Photomètre UV-Visible.....	35
1.8.2. Réfractomètre différentiel.....	36
1.8.3 Détecteur fluorimétrique.....	36
1.8.4 Détecteur électrochimique.....	36
1.8.5 Détecteur par spectroscopie de masse.....	37
1.9. Interactions moléculaire entre phase mobile et soluté.....	37
1.10. Force éluant et polarité.....	37
2. <i>Chromatographie d'adsorption</i> .....	
2.1. L'adsorption.....	38
2.2. La chromatographie d'adsorption.....	39
2.3. Les adsorbants.....	39
2.4. Phase mobile.....	41
3. <i>Chromatographie de partage</i> .....	43
3.1. Introduction.....	43
3.2. Support.....	44
3.3. Phase stationnaire.....	44
3.4. Phase mobile.....	46
4. <i>La chromatographie d'échange d'ions</i> .....	49
4.1. Définition.....	49
4.2. Principe de la méthode.....	49
4.3. La phase stationnaire.....	49
4.4. Les supports.....	51
4.5. La phase mobile.....	52
4.6. Détection.....	53
5. <i>La chromatographie d'exclusion</i> .....	
5.1. Définition.....	56
5.2. Principe de la chromatographie d'exclusion.....	56
5.3 Phase stationnaire.....	57
5.4. Caractère et nature des gels.....	57

5.5. Phase mobile.....	59
5.6. Détection.....	60
6. <i>La chromatographie d'affinité</i> .....	
6.1. Introduction.....	63
6.2. Etapes d'une chromatographie d'affinité.....	63
6.3. L'interaction protéine-ligand.....	65
6.4. Phase stationnaire.....	65
6.5. Avantages et inconvénient de la méthode.....	66

## **Chapitre IV**

### *Chromatographie en phase gazeuse*

I. Définition.....	67
II. Principe de la technique et appareillage.....	67
II.1. Gaz vecteur.....	69
II.2. Injecteur.....	69
II.3. Four.....	70
II.4. Colonne.....	71
II.5. Phase stationnaire.....	73
II.6. Les systèmes de détecteurs.....	75
II.6.1 Détecteur à conductivité thermique (DCT) ou catharomètre.....	76
II.6.2. Détecteur à ionisation de flamme (DIF).....	76
II.6.3. La spectrométrie de masse.....	76
II.6.4. Autres détecteurs.....	77
II.7. Optimisation de séparation.....	77
II.7.1. Température.....	77
II.7.2. Le débit du gaz vecteur.....	78
II.7.3 La longueur de la colonne.....	78
II.7.4. La nature de la phase stationnaire.....	78
II.7.5. Précaution générale.....	79
III. Analyse qualitative en CPG.....	79
III.1. L'utilisation des grandeurs de rétention.....	79
III.2. L'identification par les méthodes de comparaison.....	81

III.3. Détecteurs sélectifs.....	81
III.4. Modification par un processus réactionnel.....	81
III.5. Couplage à d'autres méthodes.....	81
IV. L'analyse quantitative.....	81
IV.1. Les méthodes d'analyse quantitative.....	82

# *CHAPITRE I*

## *GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE*

## Chapitre I

### *Généralités sur la Chromatographie*

#### **1. Définition**

La chromatographie est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange ; les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile ; ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur. L'origine du mot chromatographie vient peut-être de la séparation de composés colorés puisque chroma (Χρωμα) en grec, signifie couleur et graphein signifie écrire.

#### **2. Historique**

La chromatographie est une science très ancienne. Aristote décrit les propriétés que possèdent certaines terres pour purifier l'eau de mer. 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. En 1931, la publication de Kuhn et Lederer sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthopylle apparue. En effet, c'est Kuhn qui, en 1938 reçut le Prix Nobel sur la chromatographie en phase mince.

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

### **3. Classification des techniques chromatographiques**

Les méthodes chromatographiques se classent en trois façons:

#### **3.1. Classification selon la nature physique 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 liquide/solide (CLS)
- ✚ la chromatographie liquide/liquide (CLL)
- ✚ la chromatographie gaz/solide (CGS)
- ✚ la chromatographie gaz/liquide (CGL)

#### **3.2. Classification selon le mécanisme de rétention**

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, de partage, d'échange d'ions, d'exclusion et la chromatographie d'affinité.

#### **3.3. Classification selon la technique mise en jeu**

Selon la technologie mise en jeu on distingue:

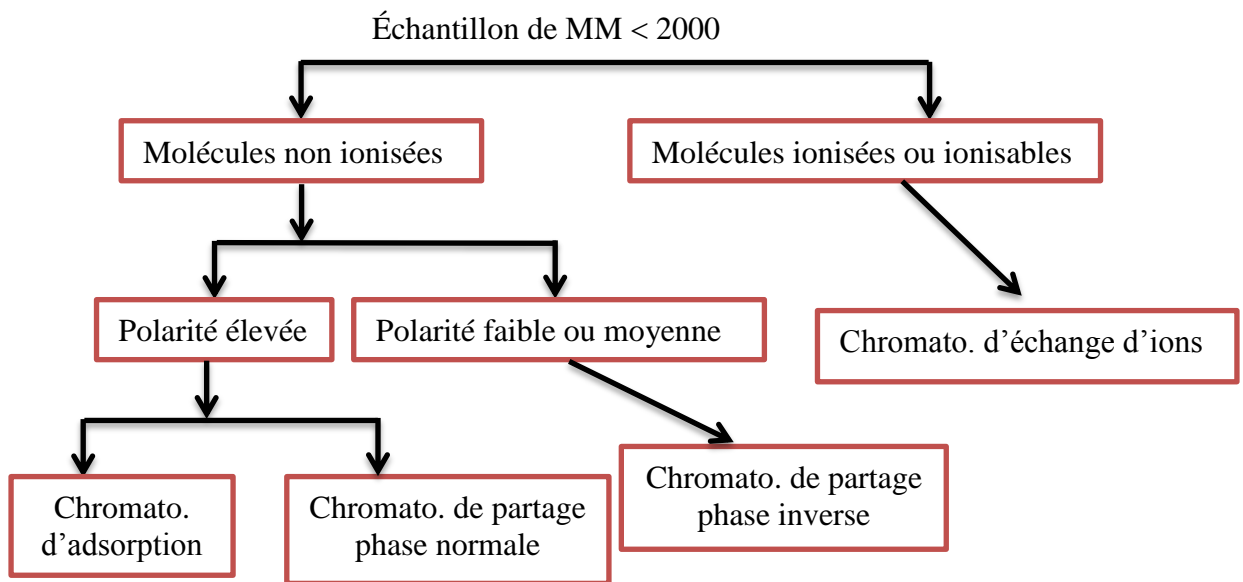
- ✚ la chromatographie sur colonne
- ✚ la chromatographie de surface (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

#### 4. Choix de la technique

Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes. Le choix de l'une ou l'autre dépend :

1. de la nature du soluté : gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...
2. du but de l'analyse : identification, contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages, quantification...

Chromatographie d'exclusion correspond à la séparation des molécules de masses moléculaires supérieures à 2000



L'existence de structures particulières dans la molécule exige l'utilisation de la chromatographie d'affinité.

La chromatographie en phase gazeuse convient aux molécules gazeuses ou volatilisables. Chromatographie en phase supercritique utilisée pour séparer les molécules thermolabiles et de masses moléculaires élevées.

Les méthodes électrophorétiques conviennent aux molécules soumises à un champ électrique

## **5. Terminologie et grandeurs de rétention**

### **5.1. Chromatogramme**

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

- ✚ Analyse qualitative : permet l'identification des composés par la position du pic
- ✚ Analyse quantitative : évaluer la concentration ou la masse d'un composé en utilisant l'aire des pics

### **5.2. Elution**

L'élution est l'entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile. En chromatographie liquide solide, la phase mobile peut être appelée éluant.

### **5.3. Le temps mort**

Le temps mort ( $t_m$ ) est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire de la colonne, pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne (ou temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne).

### **5.4. Le temps de rétention**

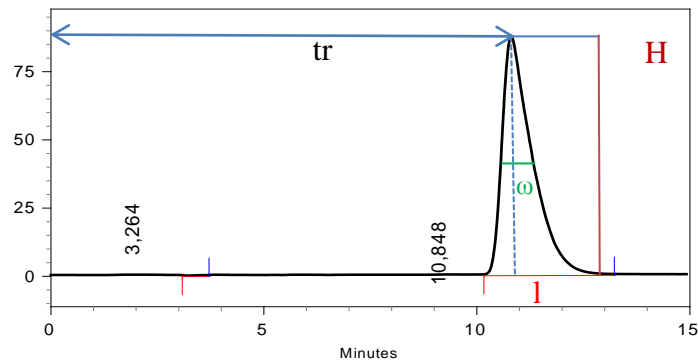
Le temps de rétention ( $t_r$ ) est le temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne. Le temps de rétention est caractéristique d'une espèce pour des conditions d'analyse données et peuvent servir à l'analyse qualitative. La surface et la hauteur d'un pic est fonction de la quantité du

constituant. Le temps de rétention est indépendant de la quantité d'échantillon injectée. Il est fonction de la nature et la vitesse de la phase mobile (Fig.1).

### 5.5. Le temps de rétention réduit

Le temps de rétention réduit ( $t_r'$ ) représente le temps passé par le soluté dans la phase stationnaire.

$$t_r' = t_r - t_m$$



**Fig.1:** Chromatogramme d'un constituant

### 5.6. Le volume de rétention

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

$$V_r = t_r \times D$$

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

$u$ : vitesse linéaire moyenne de la phase mobile

$s$ : section droite de la colonne

$\varepsilon$ : porosité de la phase stationnaire ( $\approx 0,75$  pour la silice poreuse)

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

$$V_m = t_m \times D$$

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

### **5.7. Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile**

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

$$v = L/t_r$$

$L$  : longueur de la colonne

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

$$u = L/t_m$$

### **5.8. Le facteur de capacité**

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

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

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

De faibles valeurs de  $k'$  indiquent des composés peu retenus. Des valeurs élevées de  $k'$  indiquent des composés fortement retenus, en pratique  $1 < k' < 10$ .

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

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

et

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

### 5.9. Facteur de sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité ou de séparation  $\alpha$ . Ce facteur est égal au rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser la séparation. Il s'exprime par :

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

Avec  $k'_2 > k'_1$

Il s'agit du rapport des temps de rétention réduits

$k'_2$ : facteur de capacité du composé 2

$k'_1$ : facteur de capacité du composé 1

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

### 6. Efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne chromatographique est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques  $N$  de la colonne et la hauteur équivalente à un plateau théorique  $H$ . Cette théorie est née de la recherche d'un modèle statique permettant de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique comme celui d'une colonne à distiller. Au lieu de considérer le déplacement réel, continu de la phase mobile, on admet que celle-ci progresse par sauts successifs et se met en équilibre avec la phase stationnaire

entre deux transferts, ce qui permet de découper fictivement la colonne en un certain nombre de zones dans lesquelles les équilibres sont réalisés et que l'on appelle plateaux théoriques.

Les pics d'élution peuvent être assimilés à des courbes de Gauss. Les caractéristiques géométriques de la courbe de Gauss (Fig.1) permettent de calculer, pour un soluté donné, N à partir du chromatogramme.

$$N = 16 (tr/l)^2$$

l: largeur du pic à la base

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

Avec  $l = 1,7 \omega$

$\omega$  : largeur du pic à mi-hauteur

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

$$N = L/H$$

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

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

L'efficacité des colonnes chromatographiques augmente si le nombre de plateaux théoriques augmente ou si la hauteur équivalente à un plateau théorique diminue à longueur constante.

Lorsqu'on double la longueur de la colonne ou la vitesse de la phase mobile, le temps de rétention est multiplié.

Il y'a des facteurs extra-colonne qui peuvent influencer sur l'efficacité de celle-ci est d'utiliser des tubes trop larges ou trop long (tube de liaison qui influe sur la largeur du pic mais pas sur le temps de rétention).

Afin de juger des performances d'une colonne chromatographique en tenant compte du diamètre des particules ( $d_p$ ) de la phase stationnaire, on définit la hauteur de plateaux réduites  $h$ .

$$h = H/d_p$$

Deux colonnes de mêmes efficacités possèdent le rapport  $L/d_p$  semblable

## 7. Résolution

La résolution de deux pics voisins est définie par le rapport de la distance entre le maximum des deux pics et la moyenne arithmétique.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics

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

$$R_s = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(l_2 + l_1)}$$

Plus la résolution est grande, meilleure est la séparation

Deux pics sont bien résolus, si  $R \geq 1,5$  (Fig.2).

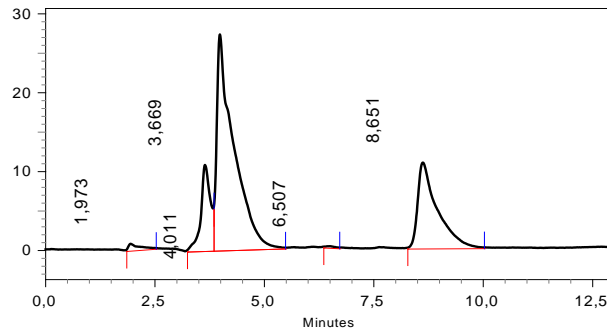
Pour des valeurs de  $R_s$  beaucoup plus grande que 1, la séparation des pics n'est pas meilleure, mais le temps de la séparation devient inutilement long.

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation et pour l'optimiser, il est important de relier les facteurs de sélectivité et capacité à la résolution.

En supposant  $l_1=l_2$ , en combinant les expressions on obtient la relation de Purnell :

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k'_2}{(k'_2 + 1)} \cdot \sqrt{N_2}$$

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



**Fig.2.** Chromatogramme montrant la séparation de trois constituants

### **8. Equation de Van Deemter**

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

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

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

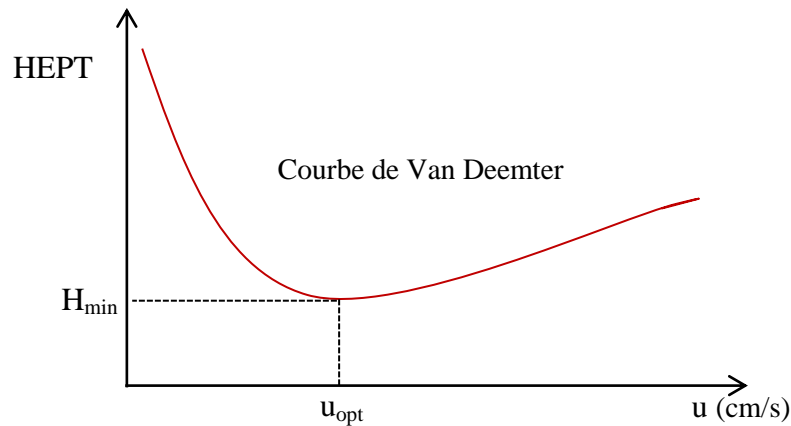
u: vitesse moyenne de la phase mobile (gaz vecteur).

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

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

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

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



**Fig.3:** Courbe de Van Deemter.

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

Aux faibles valeurs de  $u$ , le terme  $B/u$  prédomine (la courbe devient asymptote à une droite de pente négative) et explique la perte d'efficacité vers les très faibles vitesses. Aux grandes vitesses, le terme  $C.u$  prédomine (la courbe devient asymptote à une droite de pente positive) et explique la perte d'efficacité aux très grandes vitesses. Dans la région intermédiaire, le terme  $A$  est prépondérant et  $H$  passe par un minimum ( $H_{\min}$ ). Elle montre que la variation de  $H$  en fonction de  $u$  passe par une valeur minimale calculée en cherchant la valeur de  $u$  correspondant à l'annulation de la dérivée première de cette fonction :

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

### 9. Optimisation d'une analyse chromatographique

La résolution et le temps d'éluion sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante des composés intéressants en un minimum de temps. Dans la pratique, on s'efforcera d'abord de choisir les conditions chimiques de la séparation (nature et composition chimique de la phase stationnaire, nature et composition chimique de l'éluant, modification éventuelle des

produits à séparer) pour que le facteur de sélectivité ne soit pas trop proche de 1 et pour que les facteurs de capacité soient compris entre 1 et 10.

### **Applications de la chromatographie**

La chromatographie est un outil puissant et polyvalent pour séparer des espèces chimiques très voisines. Elle peut également être utilisée tant pour l'identification qualitative que pour l'analyse quantitative d'espèces individuelles.

### **Exercices**

#### **Exercice 1**

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

#### **Exercice 2**

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

#### **Exercice 3**

A une solution aqueuse d'iode de concentration 10g/L, on ajoute 10 mL de tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>). Déterminer la concentration en iode dans le tétrachlorométhane.

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

#### **Exercice 4**

Les coefficients de l'équation de Van Deemter sont déterminés à :

$$A = 10^{-3} \text{ cm}, B = 0,144 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}, C = 10^{-3} \text{ s}$$

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

**Exercice 5**

Un mélange de deux composés A et B est séparé sur une colonne de 2 m

Calculer la résolution de la colonne.

Données expérimentales :

$$tr_A = 300s \quad l_A = 18,5s$$

$$tr_B = 320s \quad l_B = 21,5s$$

$$tr_m = 60s$$

## *CHAPITRE II*

### *CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE CLASSIQUE*

- 1. Chromatographie sur colonne*
- 2. Chromatographie sur couche mince*
- 3. Chromatographie sur papier*

## Chapitre II

### *Chromatographie Liquide classique*

#### 1. La chromatographie sur colonne

##### 1.1. Introduction

La chromatographie sur colonne est une méthode préparative qui permet de séparer et d'isoler les constituants d'un mélange. Cette technique est fondée principalement sur des phénomènes d'adsorption et permet de séparer pratiquement tous les mélanges possibles. Il suffit de trouver les bonnes conditions.

##### 1.2. Description de la méthode

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

##### 1.3. Phase stationnaire

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

**L'alumine** ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) sous forme acide, basique ou neutre. Cet adsorbant ne peut être employé qu'avec des composés organiques stables (l'alumine acide entraîne la

déshydratation des alcools tertiaires, l'alumine basique entraîne l'hydrolyse des esters). L'alumine est un adsorbant polaire ; le constituant le plus polaire sera le plus fortement fixé et c'est le constituant le moins polaire qui sera élué le premier.

**Gel de silice ( $\text{SiO}_2$ )**, se présente sous forme d'une poudre blanche utilisée en particulier pour séparer des composés organiques qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être séparés sur l'alumine. La granulométrie d'un adsorbant employé en chromatographie sur colonne est plus importante que celle d'un adsorbant employé en CCM (80 à 200  $\mu\text{m}$  au lieu de 70  $\mu\text{m}$ ). Les adsorbants suivants sont classés selon l'ordre croissant de leurs forces d'interactions avec les composés polaires : papier, cellulose, amidon, sucres, carbonate de sodium, oxyde de magnésium, gel de silice, alumine, charbon activé.

#### **1.4. Eluant**

L'éluant généralement employé est un mélange de deux solvants. Le plus souvent, au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les constituants les moins polaires (les moins retenus par l'adsorbant) ; on augmente ensuite la polarité de l'éluant par addition graduelle du solvant le plus polaire ; on élue ainsi les constituants les plus polaires. Il faut faire des essais sur CCM avec différents éluant pour avoir une bonne séparation entre les produits. Un  $R_f$  proche de 0,3 pour le produit le moins polaire.

#### **1.5. Vitesse d'élution**

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

### **1.6. Dimension de la colonne**

La hauteur de la colonne est égale à sept à dix fois le diamètre intérieur de la colonne. Il faut laisser un espace libre d'environ 10 cm au-dessus de l'adsorbant pour faire couler le solvant. Les colonnes classiques ont à leur base une plaque de verre fritté qui permet l'écoulement libre de l'éluant tout en empêchant le passage de l'adsorbant (Fig.1.1). On peut utiliser une burette, au fond de laquelle on place du coton.



**Fig.1.1** Colonne classique

### **1.7 Remplissage de la colonne**

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

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

**Remplissage par voie sèche:** on remplit la colonne au deux tiers avec le moins polaire des deux solvants puis on ajoute l'adsorbant en poudre par petites portions successives.

### **1.8 Dépôt de l'échantillon**

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

### **1.9 Alimentation en solvant**

L'alimentation en solvant s'effectue à l'aide d'une ampoule de coulée. On doit s'assurer, durant l'élution, que la surface de l'adsorbant est toujours recouverte de solvant et n'est jamais au contact de l'air. Lorsque débute l'alimentation en solvant, on règle le débit de l'alimentation de façon qu'il soit le même que celui de l'écoulement au bas de la colonne (vitesse de 5 à 50 gouttes par minute). Le volume de chaque fraction recueillie varie de 1 à 50 mL selon les cas. On collecte les fractions et on les analyse (Fig.1.2).

### **1.10 Analyse des fractions**

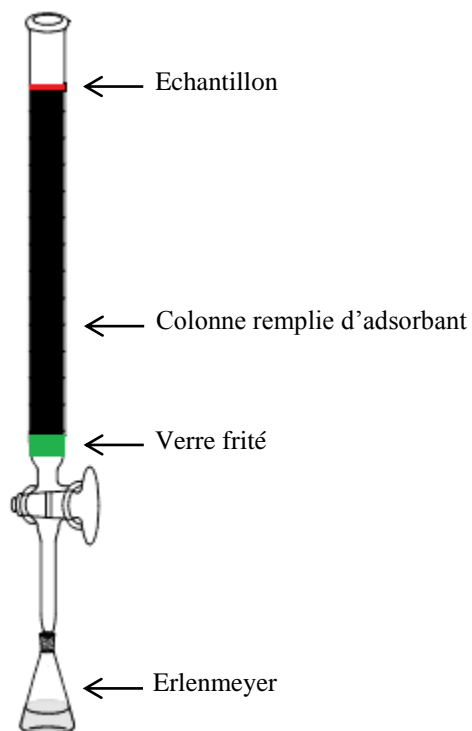
Lorsque les composés qui se séparent forment des zones colorées dans la colonne ou sont fortement fluorescents aux U.V, il est facile de les repérer soit directement sur la colonne soit dans les fractions recueillies. La récupération s'effectue alors simplement en réunissant les fractions appropriées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

La chromatographie sur colonne présente plusieurs inconvénients :

- ✚ Elle nécessite une grande quantité d'éluant
- ✚ La durée de l'élution est en général très grande (au minimum, plusieurs heures)
- ✚ La détection des composés exige une attention constante
- ✚ Il est indispensable de coupler cette chromatographie avec d'autres méthodes de façon à pouvoir détecter les constituants du mélange.

Les paramètres influençant la séparation sont :

- ✚ Le diamètre et la hauteur de la colonne
- ✚ La quantité de la phase stationnaire et sa granulométrie
- ✚ Le débit de l'éluant et sa polarité



**Fig.1.2** : Schéma d'une colonne chromatographique

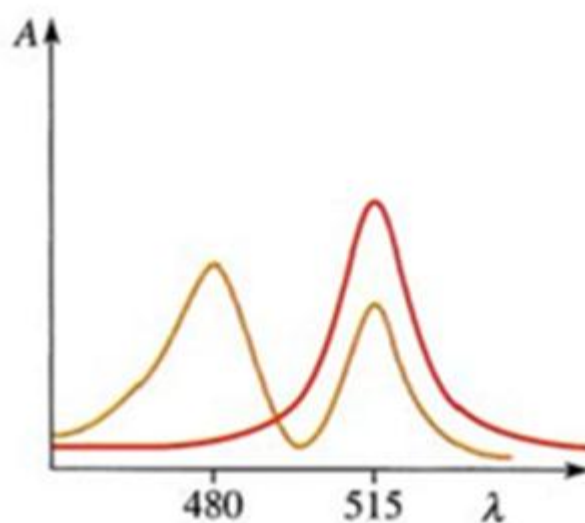
*Exercices*

*Exercice 1.1*

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

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

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



## **2. Chromatographie sur couche mince**

### **2.1. Définition**

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. La figure 2.1 représente les principaux éléments d'une séparation CCM.

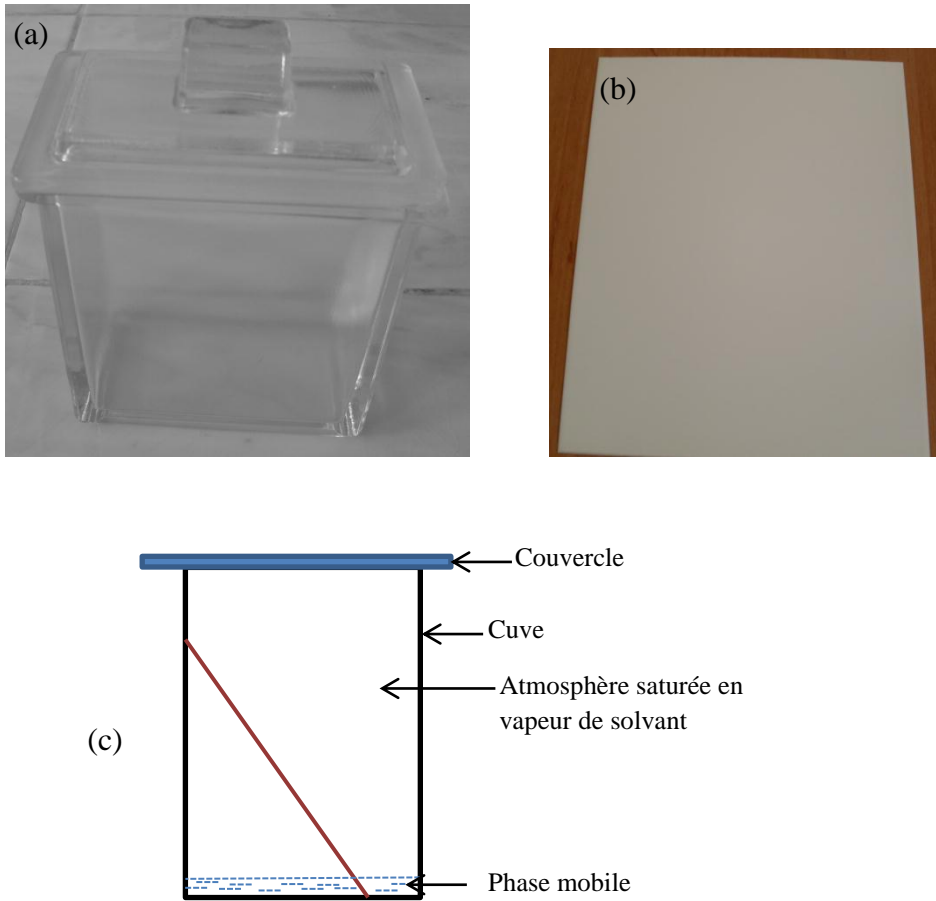
### **2.2. Appareillage**

*La cuve chromatographique* : un récipient habituellement en verre de forme variable ; fermé par un couvercle étanche.

*La phase stationnaire* : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixé sur une plaque de verre ou une feuille de matière plastique ou d'aluminium à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté, l'amidon ou polymère organique.

*L'échantillon* : environ 1 µl de solution diluée (2 à 5% de mélange à analyser) déposé en un point repère au-dessus de la surface de l'éluant.

*L'éluant* : un solvant pur ou un mélange, il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.



**Fig.2.1** (a) Cuve chromatographique (b) Plaque CCM  
(c) Schéma d'un montage CCM

### **2.3. Adsorbants**

Les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine et la cellulose. Ils sont utilisés dans une granulométrie plus grande en chromatographie sur colonne. La taille des grains, leur surface spécifique, le volume des pores, leur diamètre et la répartition granulométrique définissent les propriétés des matériaux utilisés. Pour la nano-CCM, la taille des particules est de l'ordre de 4  $\mu\text{m}$  et celle des pores de 6 nm.

## **2.4. L'éluant**

L'éluant peut être composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants ; il ne doit pas être ni trop polaire (entraînant les composants) ni trop apolaire (empêchant leur migration). Les solvants sont caractérisés par leur différence de polarité et leur non miscibilité.

A l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée de l'autre d'environ 1 cm. L'éluant qui aura entraîné le soluté à une distance proche de la moitié de la plaque sera considéré comme bon éluant.

Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'éluant et le soluté.

- ✚ **La solubilité** : on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.
- ✚ **La polarité** de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre

## **2.5. Dépôt de l'échantillon**

De faible quantité de l'échantillon dissous dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant. On trace sur la plaque à 1 cm du bord inférieur un très fin trait au crayon de papier qui servira à repérer les dépôts ; on veillera surtout à ne pas abîmer la surface de la plaque. L'échantillon est déposé ensuite à l'aide de micropipette ou de tube capillaire en un point sur le trait. Les produits non volatils sont aisément analysables ; les composants de l'échantillon sont volatils : aldéhydes, cétones aliphatiques ou aromatiques, acides monocarboxyliques, amines primaires ou secondaires ; nécessaire de les chromatographies sous forme de sels.

## **2.6. Développement de la plaque**

La plaque préparée est introduite en position verticale dans la cuve et l'éluant qui en recouvre le fond monte par capillarité, entraînant à des vitesses différentes les constituants à

séparer. Lorsque le niveau atteint par le solvant est d'environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve.

On peut utiliser une chromatographie bidimensionnelle dans le cas où le mélange contient des solutés de polarités voisines : sur le même support, on réalise une première chromatographie à l'aide d'un système de solvants, puis une deuxième à l'aide d'un second système de solvants, dans une direction perpendiculaire à la première.

## **2.7. Révélation**

Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes :

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

## **2.8. Paramètre de séparation**

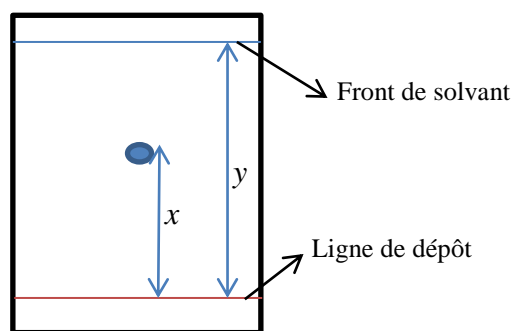
Chaque substance est caractérisée par sa mobilité appelée rapport frontal (Fig. 2.3).

Le rapport frontal ou rétention frontale ( $R_f$ ) de chaque composé est défini par le rapport :

$$R_f = x/y = \text{valeur entre 0 et 1}$$

$x$  : distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache)

$y$ : distance parcourue par le front de solvant



**Fig.2.3.** Plaque CCM : calcul du rapport frontal

Le  $R_f$  d'une substance est une constante et constitue une des caractéristiques physiques. On peut donc se servir de cette valeur pour identifier une substance inconnue. Lorsque la polarité de l'éluant augmente, le  $R_f$  augmente.

### 2.9. Efficacité d'une plaque CCM

L'efficacité  $N$  d'une plaque CCM et la hauteur  $H$  de plateau théorique pour un composé est donné par les relations :

$$N = 16 \frac{x^2}{w^2} \quad \text{et} \quad H = \frac{x}{N}$$

La résolution est exprimée par la relation:  $R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_2 + w_1}$

$w$  est le diamètre de spot

Le facteur de rétention  $k'$  d'un composé est relié aux distances de migration sur la plaque.

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

## **Applications**

La CCM présente plusieurs applications ; elle permet le contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique, le suivi de la réaction chimique ou d'un fractionnement chromatographique sur colonne et la recherche du meilleur solvant, avant d'entamer une séparation sur colonne classique. Elle permet également la purification de petites quantités de produit (jusqu'à 100 mg). La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant.

Le succès de ce mode de chromatographie est dû notamment à la facilité de sa mise en œuvre et à la possibilité de son emploi dans le domaine analytique que dans le domaine préparatif.

## **Exercices**

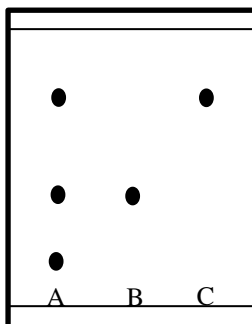
### **Exercice 2.1**

Un échantillon contenant deux composés A et B est séparé par CCM. Au bout de 15 min de développement, le front du solvant est à 8,3 cm du départ, le composé A à 7,5cm et le composé B à 2,3 cm. Calculer le Rf des deux composés.

### **Exercice 2.2**

On réalise la chromatographie de trois encres. Une encre noire, notée A, une encre verte, notée B et une encre bleue, notée C. Le chromatogramme obtenu est donné ci-dessous.

1. En analysant le chromatogramme que pouvez-vous dire sur les encres testées?
2. Déterminer le rapport frontal de la tache correspondant à l'encre C.



**Exercice 2.3**

Un échantillon contient deux composés *A* et *B* séparé par CCM sur de la silice. Après migration, la révélation conduit à deux taches. La migration du front de solvant dans cette expérience est de 6 cm. Calculer :

- Calculer  $R_f$ ,  $N$  et  $H$  pour chacun des composés.
- Calculer le facteur de résolution entre les deux composés *A* et *B*.

Sachant que :  $x_A = 31$  mm et  $w_A = 1,5$  mm

$x_B = 26$  mm et  $w_B = 2,2$  mm

**Exercice 2.4**

On a réalisé la chromatographie de deux échantillons et d'une référence. L'exploitation du chromatogramme a fourni les résultats suivants : - Front du solvant  $H = 8,0$  cm - échantillon *A* : deux taches situées à 3,0 cm et 4,0 cm de la ligne de base - échantillon *B* une tache située à 5,0 cm de la ligne de base - référence le menthol *M* :  $R_f = 0,5$

- La chromatographie a-t-elle mis en évidence des espèces chimiques pures
- Les échantillons *A* et *B* renferme-t-il du menthol ?

### **3. La chromatographie sur papier**

#### **3.1. Introduction**

La chromatographie sur papier (CP) est une chromatographie de partage liquide-liquide qui permet de séparer et d'identifier les espèces chimiques d'un mélange. Actuellement, malgré l'apparition de la CCM et la CLHP, la CP conserve toute sa valeur pour séparer des substances très polaires. Cette méthode est basée sur leur différence d'affinité pour deux phases : La phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même, absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle.

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

#### **3.2. Principe**

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

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

#### **3.3. Papier**

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

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

### **Applications**

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

## *CHAPITRE III*

### *CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE*

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

## **Chapitre III**

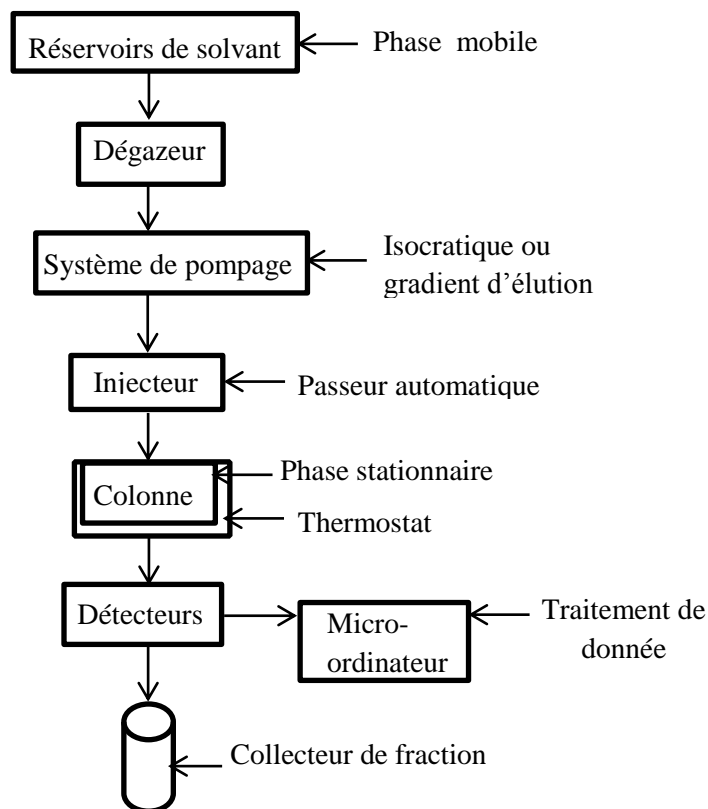
### **1. La chromatographie liquide haute performance**

#### **1.1. Introduction**

La chromatographie liquide haute performance appelé CLHP est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatil, thermosensible, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier. Elle met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. Son développement très rapide, à partir de 1970, réside dans le fait qu'elle n'a pas les inconvénients de la chromatographie liquide classique ; cette dernière a toujours été peu utilisée, en raison de la lenteur de la séparation ; de l'absence de détecteur qui aurait permis de suivre facilement le développement de chromatogramme et la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

#### **1.2. Appareillage**

Un appareil CLHP (Fig.1.1) comporte différents modules: un réservoir contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur à travers lesquels un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer et un système d'acquisition de données. Il nécessite également un dispositif de dégazage. Les différents modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm).



**Fig.1.1** Les composants d'un chromatographe liquide à haute performance

(Appareil Dionex)

### 1.3. Réservoir de solvants

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

- Maintenir la stabilité de la colonne
- Etre compatible avec le détecteur
- Solubiliser suffisamment l'échantillon et ne pas gêner sa récupération.

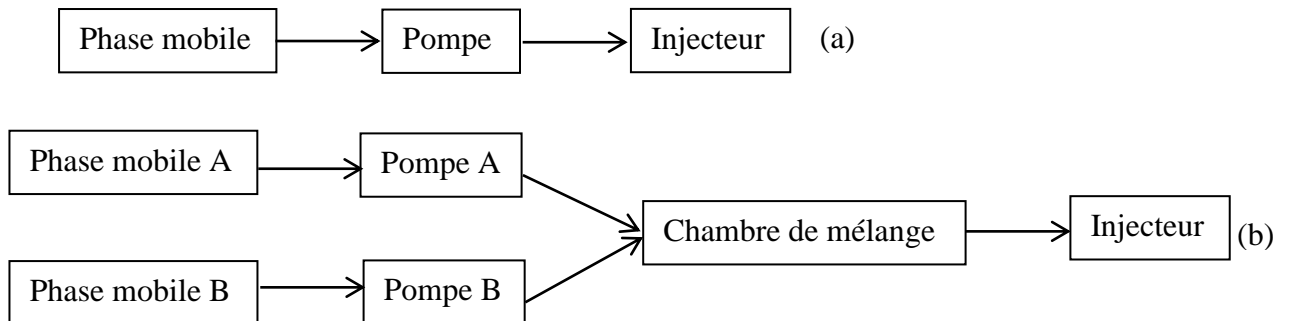
Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement pour CLHP. Ils doivent être dégazés et filtrés avant usage sur filtre spécial (0,45  $\mu\text{m}$ ). Le choix du solvant constitue habituellement la partie la plus difficile de ce type de chromatographie. Il est préférable de faire quelques essais en CCM.

**1.4. Dispositif de dégazage**

Durant le pompage, dans la chambre de mélange ou dans la colonne elle-même, si les solvants ne sont pas dégazés, l'air dissout dans le liquide soumis à de forte pression, forme des bulles à l'intérieur du système, c'est là un inconvénient majeur pour le fonctionnement de la plupart des détecteurs en particulier ceux qui utilisent des propriétés optiques. En règle générale, plus le liquide est polaire, plus la tendance de l'air à se dissoudre est forte. Il convient donc d'éliminer au maximum l'azote et l'oxygène qui peuvent être présents. Le dégazage de la phase mobile se fait par barbotage d'hélium, par ultrasons ou par un dégazeur.

**1.5. Pompe**

La pompe d'un chromatographe a pour rôle d'assurer l'écoulement de la phase mobile dans la colonne. Tout appareil CLHP comporte au moins une pompe en mode isocratique (éluant de composition fixe tout au long de l'analyse donc la phase mobile peut être préalablement préparée et disposée dans un seul réservoir) ou en gradient d'éluion (éluant de composition variable). L'éluion gradué lors de la séparation de mélanges complexes permet, en modifiant la composition de l'éluant, d'optimiser les facteurs de capacité et de réduire les temps d'analyse. Les pompes les plus utilisées sont les pompes de types piston avec lesquelles les débits sont constants, la pression peut atteindre environ 500 bars.



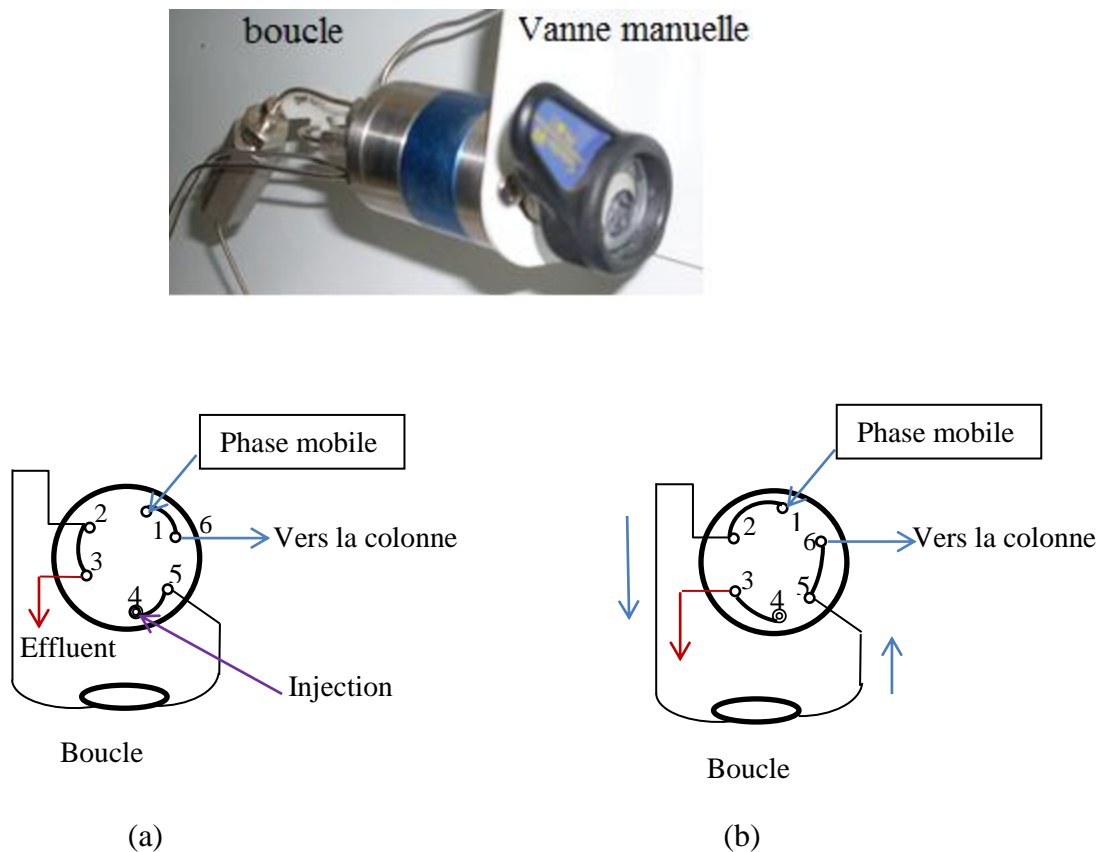
**Fig.1.2** Représentation schématique d'un système de pompage

(a) mode isocratique

(b) mode gradient d'éluion

### 1.6. Injecteur

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire à l'aide d'une vanne (boucle d'échantillonnage) : on introduit d'abord l'échantillon dans une boucle de volume connu (position chargement ou Load) après rotation de la vanne de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle (position Inject), la phase mobile entraîne l'échantillon en tête de la colonne le volume injecté est constant, cela permet donc de travailler en étalonnage externe pour une analyse quantitative. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle. Aujourd'hui on utilise des injecteurs automatiques.



**Fig. 1.3** Injecteur à boucle  
(a) Remplissage de la boucle      (b) Injection dans la boucle

## **1.7. Colonne**

Les colonnes CLHP sont généralement courtes et droites en acier inoxydable se caractérise par leur géométrie (diamètre intérieur de 4 mm et une longueur de 5 à 30 cm) et par la nature des phases qu'elles contiennent (Figure 1.4). Elles doivent capables de résister aux fortes pressions. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques mL/min. Ces colonnes ont l'avantage de la rapidité de l'analyse, consomment moins de solvant et conduisent à une meilleure résolution de l'analyse. Dans la plupart des analyses une pré-colonne ou colonne de garde qui ne diffère de la colonne analytique que par sa très faible longueur (1 à 2 cm pour une colonne de 25 cm) permet de protéger la colonne et d'en augmenter la durée de fonctionnement.



**Fig. 1.4** Colonne CLHP

### **1.7.1 Les thermostats des colonnes**

La plupart des appareils commerciaux récents sont équipés de dispositifs de régulations de la température ; qui la contrôle de la température ambiante jusqu'à 150°C (Fig.1.5). On obtient souvent de meilleurs chromatogrammes en maintenant la température constante à quelques dixièmes de degrés Celsius.



**Fig. 1.5** Colonne dans un thermostat

## **1.8. Détecteurs**

### **1.8.1. Photomètre UV-Visible**

Le détecteur UV-Visible mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que:

- ✚ Le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand
- ✚ La phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

Ce détecteur détecte seulement les changements dans le soluté donc on peut l'utiliser dans l'analyse par gradient d'élution. Le détecteur est facile à opérer et ne détériore pas l'échantillon. Il y'a plusieurs types de détecteurs :

- ✚ Détecteur à  $\lambda$  fixe : vapeur de Hg (254 nm)
- ✚ Détecteur à  $\lambda$  variable
- ✚ Détecteur à barrettes de diodes (DAD) : la cellule de mesure est éclairée par une source polychromatique ; gamme de 190 à 800 nm permettant l'enregistrement tridimensionnel absorbance-temps-longueurs d'onde. Ce type de détecteur permet de sélectionner la longueur d'onde optimale de détecteur pour chaque soluté.

### **1.8.2 Réfractomètre différentiel**

Il mesure la variation de l'indice de réfraction entre la phase mobile contenant le soluté et la phase mobile pure correspondant à la référence. La sensibilité optimale correspond à un maximum d'écart entre les indices de réfraction des composants de l'échantillon et de la phase mobile. Un composant dont l'indice est voisin de celui de la phase mobile est alors pratiquement indétectable. Son utilisation est moins répandue que celle du détecteur à UV à cause de sa plus faible sensibilité.

### **1.8.3 Détecteur fluorimétrique**

Il mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. L'émission de lumière est mesurée à angle droit du faisceau d'excitation. Ce procédé sert pour les composés fluorescents ou les dérivés fluorescents de certains composés. Ce mode de détection est plus sélectif et plus sensible de tous les détecteurs optiques à condition que les composés présentent une fluorescence, qu'elle soit naturelle ou obtenue par formation de dérivés.

### **1.8.4 Détecteur électrochimique**

Cette méthode de détection ne s'adresse qu'à la détection de molécule douée de propriétés oxydoréduction. Son principe repose sur la mesure du courant qui circule dans une cellule d'électrolyse lors de l'oxydation ou de la réduction du soluté contenu dans la phase mobile. Sur ce principe, on peut utiliser deux méthodes de mesures :

- a) Soit effectuer une électrolyse partielle à potentiel fixe sur une fraction constante de soluté et mesurer l'intensité du courant (détecteurs ampérométriques).
- b) Soit réaliser l'électrolyse totale du soluté lors de son passage dans la cellule et mesurer la quantité de courant (détecteurs coulométriques).

Les échantillons à détecter doivent pouvoir s'oxyder ou se réduire à un potentiel suffisamment faible pour ne pas provoquer l'électrolyse de la phase mobile, d'autre part la phase mobile ne doit contenir ni O<sub>2</sub> en solution, ni contaminant métallique, ni halogénures qui donneraient un courant résiduel et donc un bruit de fond et une dérive de la ligne de base.

### **1.8.5 Détecteur par spectroscopie de masse**

La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS) est une technique d'analyse qui permet d'identifier clairement un composé grâce à son rapport masse molaire/charge (m/z).

### **1.9. Interactions moléculaire entre phase mobile et soluté**

Les interactions soluté-phase mobile correspond essentiellement à l'établissement d'interactions diélectriques, de liaisons de type hydrogène ou de Van der Waals.

### **1.10. Force éluant et polarité**

La polarité d'un échantillon et d'un solvant est la tendance de ces deux composés à interagir fortement par polarité. Les composés polaires interagissent très fortement les uns avec les autres. Pour les composés polaires :

- ✚ Plus la phase mobile sera polaire, plus elle va entraîner les solutés
- ✚ Plus la phase mobile sera apolaire, moins elle va entraîner les solutés

Pour les composés moins polaires :

- ✚ Plus la phase mobile sera polaire, moins elle va entraîner les solutés

### **Applications**

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

**Exercices**

**Exercice 1.1**

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

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

Calculer le volume de rétention de ce composé. Que peut-on en conclure?

**Exercice 1.2**

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

Calculer

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

## **2. Chromatographie d'adsorption**

### **2.1. L'adsorption**

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

### **2.2. La chromatographie d'adsorption**

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

### **2.3. Les adsorbants**

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

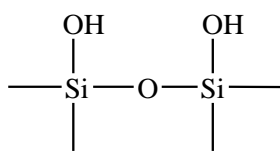
- ✚ Les supports pelliculaires : constitués de billes de verre avec un diamètre moyen de 40  $\mu\text{m}$  recouvertes d'une pellicule d'adsorbant de 2-3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.
- ✚ Les supports entièrement poreux, caractérisés par une grande capacité (100 fois plus grandes que celle des supports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

La surface spécifique des adsorbants correspond à leur surface d'adsorption par unité de masse. Elle est liée à leur granulométrie et à leur porosité. Une grande surface spécifique est souhaitable car elle permet d'obtenir de meilleures séparations. Les adsorbants les plus couramment utilisés sont :

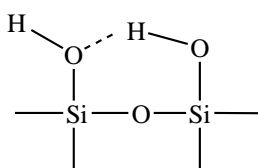
### ✚ Silice ( $\text{SiO}_2$ )

La silice provient de la déshydratation de l'acide silicique, elle se présente sous forme d'une poudre blanche de très fine granulométrie. Le mécanisme de rétention sur cet adsorbant résulte de la présence à la surface, de groupes silanols (-OH) et de groupes siloxanes (-O) qui expliquent sa polarité, son caractère acide et la possibilité de former des liaisons hydrogènes.

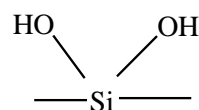
Les groupes silanol sont de trois types :



silanols libres



silanols lié à liaison  
hydrogène

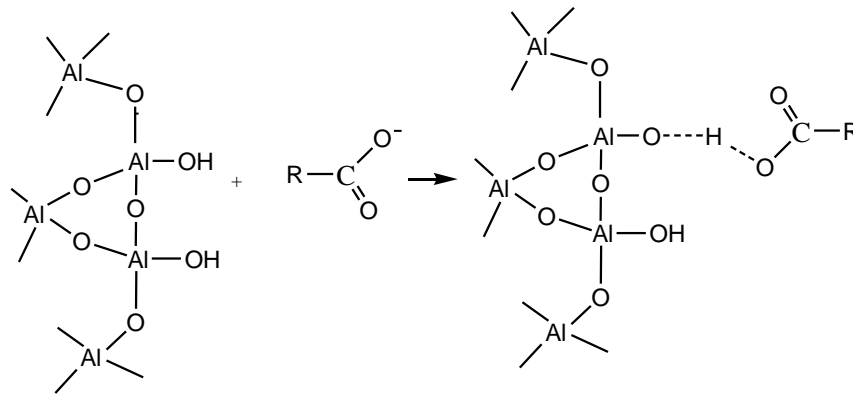


silanols géminaux

### ✚ Alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )

cet adsorbant est très utilisé car il présente de très bonnes propriétés d'adsorption, il s'obtient par déshydratation de l'hydroxyde  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , cet adsorbant est dit basique.

L'alumine convient bien pour la séparation de solutés acides (acides carboxyliques).



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

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

La silice convient pour les solutés qui sont des bases (les amines aliphatiques et aromatiques). Inversement, l'alumine convient bien pour la séparation des solutés acides comme : les phénols et les acides carboxyliques. Pour ces deux supports les molécules polaires sont toujours les plus adsorbés.

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

#### **2.4. Phase mobile**

Il faut que le soluté soit soluble dans l'éluant pour que la migration se fasse et il est possible de faire des mélanges de solvants pour changer sa polarité. Sous réserve de leur miscibilité et de leur compatibilité avec le système de détection pour obtenir de bonne séparation.

La plupart des séparations chromatographiques s'effectuent en adaptant la polarité de la phase stationnaire à celle du soluté; on utilise par contre une phase mobile dont la polarité est extrêmement différente.

Moins un composé est polaire, moins il s'accroche à l'adsorbant, plus il migre avec l'éluant et plus un composé est polaire, plus il s'accroche à l'adsorbant, moins il migre avec l'éluant. Plus de 90% des séparations en chromatographie d'adsorption utilisent un mélange hexane ou isoctane avec l'éther isopropylique soit le chlorure de méthylène, acétonitrile et méthanol.

### **Applications**

La chromatographie d'adsorption s'applique pour la séparation des composés apolaires de masses moléculaires inférieure à 3000. Elle est très utile pour les isomères, tels que les dérivés du benzène substitués en méta et en para et complémentaire à la chromatographie de partage en phase normale

### 3. Chromatographie de partage

#### 3.1. Introduction

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

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

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad \text{et} \quad k' = \frac{V_S}{V_M}$$

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

k' : facteur de capacité

$V_S$ : volume de la phase stationnaire contenue dans la colonne

$V_M$  : volume de la phase mobile contenue dans la colonne

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

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

Il y'a deux modes de chromatographie de partage :

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

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

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

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

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

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

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

### **3.2. Support**

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

Parmi les supports les plus utilisés, on peut citer :

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

### **3.3. Phase stationnaire**

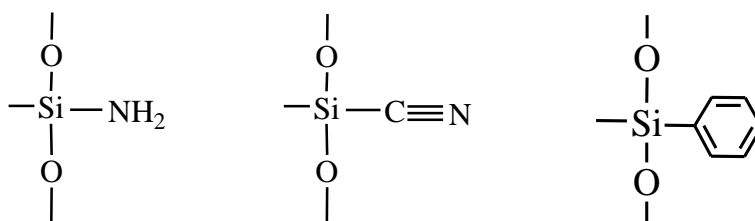
On peut subdiviser la chromatographie de partage en chromatographie liquide-liquide et liquide-phase greffée ; la différence réside dans la manière dont on fixe la phase stationnaire sur les particules du support. Dans la chromatographie de partage liquide-liquide, le liquide est fixé par adsorption physique sur la surface du support, alors qu'il est attaché par liaison chimique dans la chromatographie à phase greffée. On a développé

l'usage de phase stationnaire chimiquement liées (greffées) en raison de leur plus grande stabilité.

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

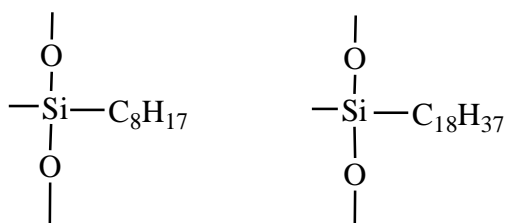
**✚ Phases greffées polaires (phase normale)**

La présence de fonctions particulières sur le greffage (-CN, -NH<sub>2</sub>,...) peut apporter une sélectivité intéressante. De plus, il est possible de travailler avec un gradient de force éluant, donc d'analyser en une seule fois des mélanges contenant des composés de polarités très différentes. En chromatographie à phase normale, le constituant le moins polaire est élué le premier ; l'augmentation de polarité de la phase mobile réduit son temps d'éluion.



**✚ Phases greffées apolaires (phase inverse)**

Ce sont les supports les plus couramment utilisés, principalement avec un greffage alkyl (octadécylsilane ou -ODS ou -C18). Dans ces systèmes, le solvant le plus polaire (l'eau) est le moins éluant et la force éluante de la phase mobile est augmentée par ajout d'un solvant organique (méthanol, acétonitrile), le constituant le plus polaire est élué le premier et l'augmentation de polarité de la phase mobile allonge son temps d'éluion.



Octyle

Octadecyle

### **3.4. Phase mobile**

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

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

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

Le pouvoir éluant croissant des solvants est le suivant:

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

### **Applications**

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

### **Exercices**

#### **Exercice 3.1**

1. Lorsqu'en chromatographie liquide, l'eau entre dans la composition de l'éluant, travaille-t-on en phase inverse ou en phase normale ? Justifier votre réponse.
2. Pour une séparation en chromatographie en phase inverse, donnez l'ordre d'élution des substances chimiques suivantes : pentane, pent-1-ène, penta-1-ol et penta-1,2-diol.

**Exercice 3.2**

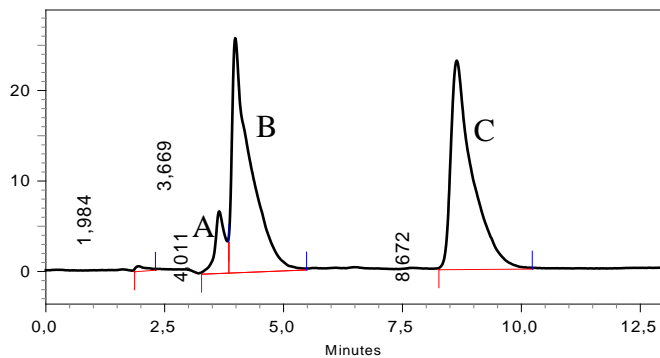
On se propose de doser l'aspartame, la caféine, la saccharine et l'acide benzoïque dans diverses boissons par CLHP.

✚ Proposer un type de phase stationnaire pour ce dosage

**Exercice 3.3**

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

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



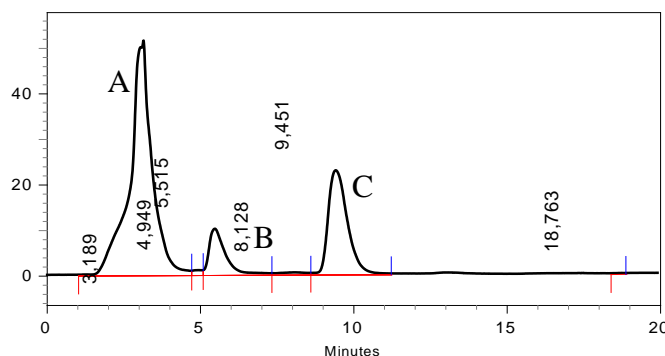
Produit	Largeur à mi-hauteur $\omega_{1/2}$ (min)
A	0,04
B	0,52
C	0,61

- 1) Quel est le type de polarité de phase la utilisée ? Justifiez votre réponse.
- 2) A partir du chromatogramme déterminer :
  - a) L'efficacité pour les composés A, B et C
  - b) L'efficacité moyenne de la colonne
  - c) Le volume mort  $V_m$  de la colonne

- d) Les facteurs de rétention  $k'_A$ ,  $k'_B$  et  $k'_C$  des composés A, B et C.
- e) La sélectivité  $\alpha$  de la séparation.
- f) La résolution  $R$  de la séparation.
- g) La résolution de Purnel (RP) de la séparation.
- h) Si la colonne mesure 30 cm, calculez le temps de rétention du dernier composé, toutes choses égales par ailleurs.

**Exercice 3.4**

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



## **4. La chromatographie d'échange d'ions**

### **4.1. Définition**

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

### **4.2. Principe de la méthode**

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

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

### **4.3. La phase stationnaire**

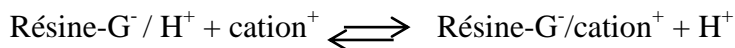
La phase stationnaire dans la chromatographie ionique est une résine (polymère insoluble préparé sous formes de billes) échangeuse d'ions contenant des groupements chargés positivement ou négativement permettant la rétention des espèces dont on désire obtenir la séparation. Le soluté ionique ou ionisable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

L'échangeur d'ions comporte deux parties : Les groupements fonctionnels qui lui confèrent ses propriétés et la matrice (support fixe) sur laquelle ces derniers sont greffés.

Les groupements fonctionnels sont fixés par des liaisons covalentes sur la matrice; ils sont de deux types :

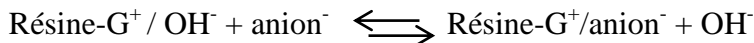
1. les échangeurs de cations portent des groupements chargés négativement (-)

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



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

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

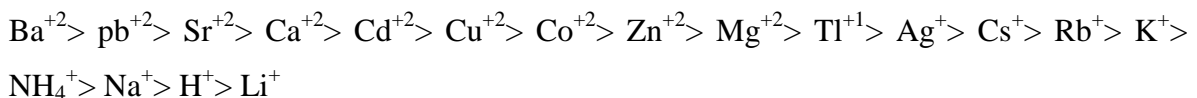


Chaque type d'échangeur se divise en deux groupes :

1. échangeur fort : reste pleinement chargé entre pH 3 et 10
2. échangeur faible : reste chargé dans une gamme de pH restreint

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

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



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

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

Citrate >  $\text{SO}_4^{-2}$  > oxalate >  $\text{I}^-$  >  $\text{NO}_3^-$  >  $\text{Br}^-$  >  $\text{SCN}^-$  >  $\text{Cl}^-$  > formiate > acetate >  $\text{OH}^-$  >  $\text{F}^-$

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

**Exemple :**

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

**4.4. Les supports**

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

Les caractéristiques des supports sont :

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

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

**Capacité de rétention** : c'est la quantité maximale d'ions que peut fixer l'échangeur d'ions, exprimée en mEq/g (milliéquivalent par gramme) de résine sèche ou en mEq/mL de poids

de résine humide. Elle dépend de la densité du support en groupements fonctionnels et il faut en tenir compte pour ne pas trop charger une colonne. L'affinité d'un échangeur pour un ion donné dépend de plusieurs facteurs:

1. de la charge des groupements fonctionnels, qui elle-même dépend :

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

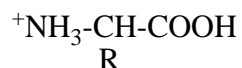
2. de l'accessibilité des groupements fonctionnels (porosité et granulométrie)

#### **4.5. La phase mobile**

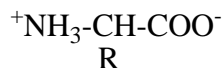
La phase mobile est une solution aqueuse de force ionique donnée (généralement un tampon de pH). On peut éluer avec une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou avec un gradient de pH et (ou) de force ionique, pour décrocher successivement les différents ions fixés sur l'échangeur. Toutefois, il peut être nécessaire d'utiliser des mélanges de solvants polaires (méthanol-eau) afin d'optimiser une élution ou faciliter la solubilité de certains solutés. Le pH est paramètre principal de rétention. Pour un acide faible, une augmentation de pH se traduit par :



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



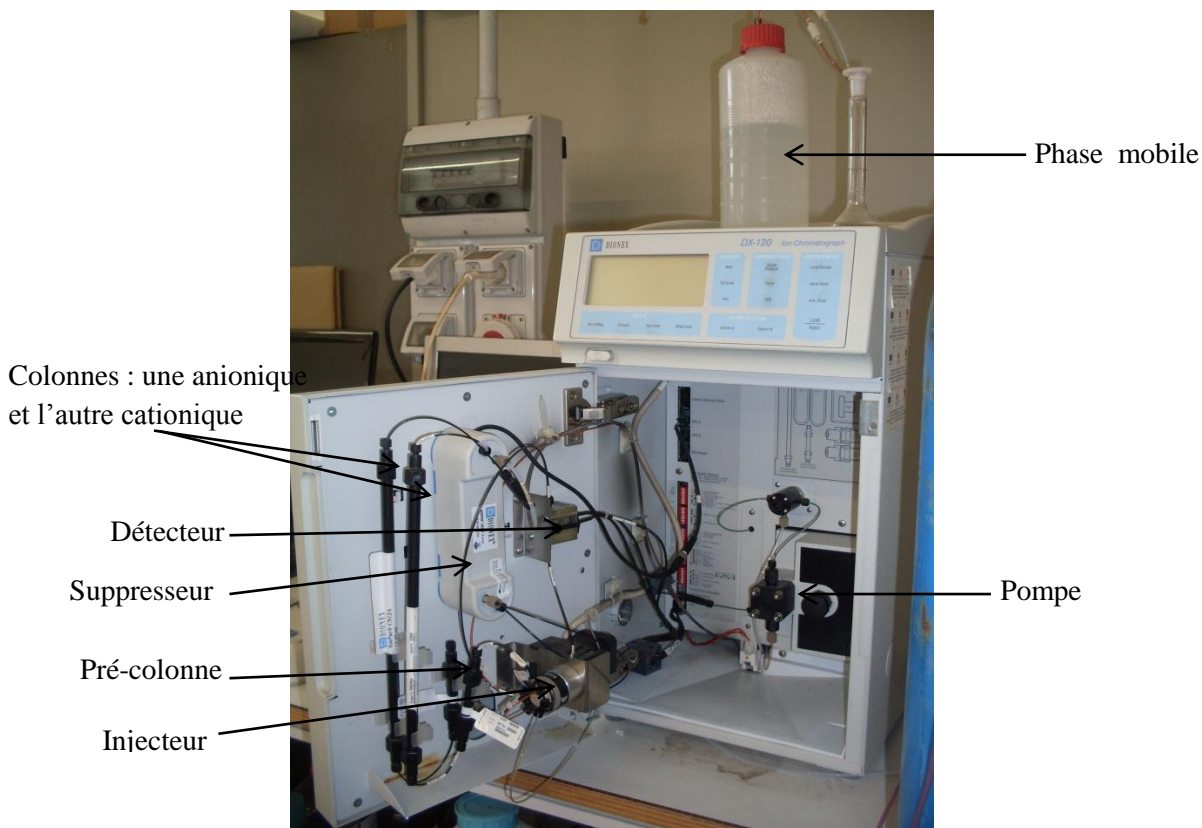
Si on injecte sur la colonne des solutions tampon de pH croissant, les acides aminés seront élués en fonction de leur pHi. En effet, quand le pH de la phase mobile est égal au pHi l'acide aminé se trouve sous forme de switterion non chargé, donc non retenu.



#### **4.6. Détection**

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

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



**Fig.4.1** Les composants d'un chromatographe ionique (appareil Dionex)

### **Applications**

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

**Exercices**

**Exercice 4.1**

Un mélange de trois acides-aminés : l'arginine, la cystéine et l'acide aspartique, est soumis à une chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ( $-\text{SO}_3^-$ ). Les pH isoélectriques de l'arginine, la cystéine et l'acide aspartique sont respectivement : 3,00 ; 5,0 ; 10,8 à 25°C. On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7 et à 11.

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

**Exercice 4.2**

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

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

## **5. La chromatographie d'exclusion**

### **5.1. Définition**

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

### **5.2. Principe de la chromatographie d'exclusion**

Dans cette technique de chromatographie on utilise des granules de gels poreux, dont les pores ont une taille voisine de celle des molécules des composés. La séparation résulte de la différence de taille est fondée sur la possibilité de soluté à pénétrer ou de ne pas pénétrer à l'intérieur des pores de la phase stationnaire (limite d'exclusion). Les molécules de l'échantillon ; certains sont assez petites pour pénétrer dans la matrice poreuse, tandis que les plus grandes restent dans le volume interstitiel de la phase stationnaire. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

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

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

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

### **5.3. Phase stationnaire**

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

Dans cette technique le matériel servant de base est un gel. La filtration de gel est une chromatographie d'exclusion sur un support hydrophile qui est utilisé pour séparer des espèces polaires. Tandis que la perméation de gel est une chromatographie d'exclusion sur un support qui est utilisée pour séparer des espèces non polaires.

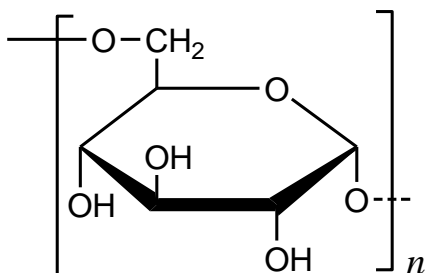
### **5.4. Caractère et nature des gels**

#### *Gels mous*

Ce sont des structures faiblement réticulées et capables d'absorber dans leurs pores de grandes quantités de solvant. Ils gonflent de plusieurs fois leurs volumes secs et leurs porosités augmentent en proportion du volume du solvant absorbé.

#### *Gels de Dextrane* (Sephadex)

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



Structure chimique de dextrane

### ***Gels de polystyrène*** (styrigel)

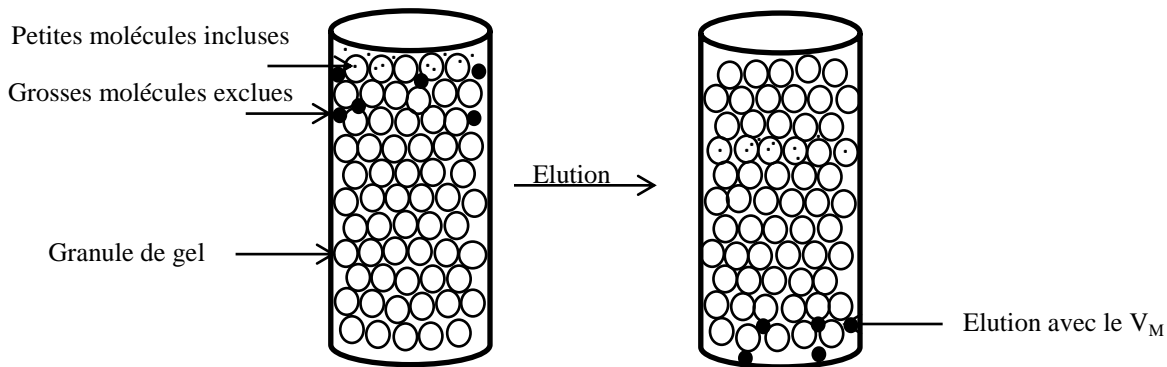
Ils sont obtenus par polymérisation des dérivés du vinyl benzène ou styrène (PS-DVB) en présence d'un agent réticulant le divinyl benzène. Ils ne doivent pas être utilisés avec des solvants polaires. Ces molécules sont hydrophobes ; ils permettent la séparation des substances peu polaires telles les lipides.

### ***Gels semi-rigides***

Ils sont produits par polymérisation, ce sont des dérivés du vinylbenzène (DVB) en présence d'agent réticulant. On les utilise principalement avec des solvants organiques.

### ***Aérogels***

Ce terme désigne ce terme des substances qui ne gonflent pas ; ce sont des gels de silice donc des verres (poudre de verre très fine de granulométrie contrôlée et de porosité bien déterminée). Ils ont évidemment des sites d'adsorption (groupements hydroxyyles) qui peuvent retarder excessivement les espèces polaires. On modifie alors chimiquement la silice. Diamètre des pores : 10 à 150 nm.



**Fig.5.1** : Migration au travers de phase stationnaire

### **5.5. Phase mobile**

La phase mobile doit surtout être capable de mouiller la phase stationnaire et d'éviter l'adsorption. Lorsque le gel est mou, le solvant doit aussi le gonfler puisque la taille des pores de ce gel dépend de la quantité de solvant imbibée. Les solvants les plus couramment utilisés sont : Eau, chloroforme, trifluoroéthanol. Cette méthode chromatographique est pratiquement indépendante de la nature du solvant donc on n'utilise pas de gradient d'éluion puisqu'il n'y a pas d'interaction soluté/phase mobile.

Le volume d'éluion dans la colonne décomposé en deux parties :

Le volume interstitiel ou volume mort  $V_I$  (extérieur aux pores laissé libre entre les grains du gel) et le volume  $V_P$  le volume totale des pores.

$V_I$ : volume nécessaire pour transporter une grosse molécule

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

Les volumes d'élution  $V_e = V_I + KV_P$  pour éluer les molécules de tailles intermédiaires

$K$  représente le degré de pénétration d'une espèce présente dans un volume  $V_P$ .

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

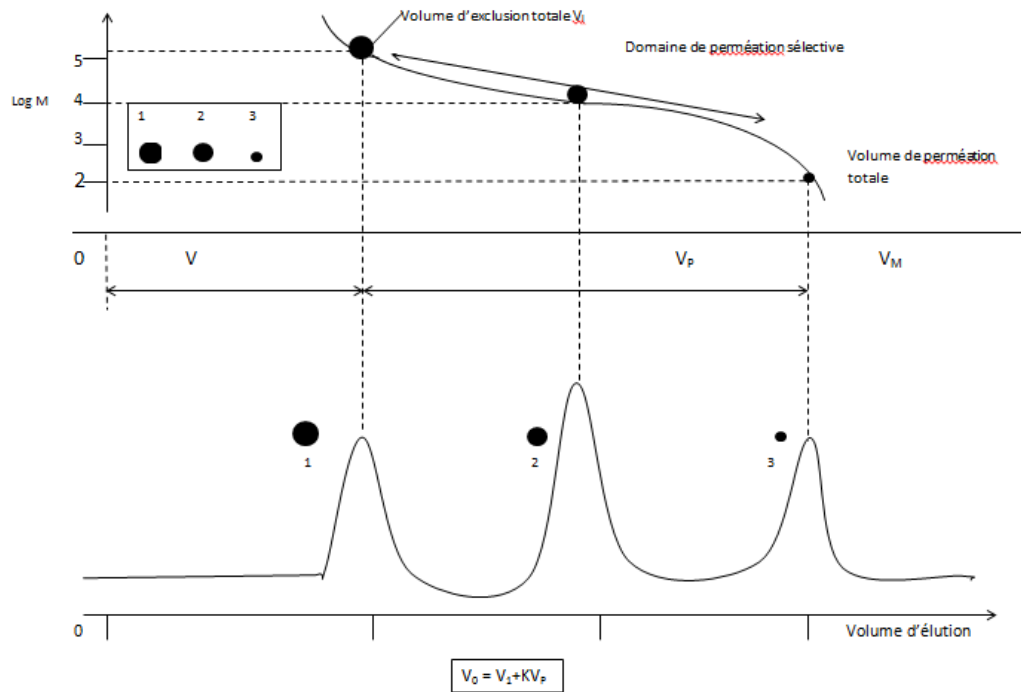
## 5.6. Détection

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

### Applications de la chromatographie d'exclusion

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

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



**Fig.5.2 :** Chromatogramme figurant une séparation de trois espèces (1, 2, 3) et

la courbe  $\log (M) = f (V_e)$

**Exercices**

**Exercice 5.1**

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

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

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

**Exercice 5.2**

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

MM (Da)	Volume de rétention ( $\text{cm}^3$ )
$2,4 \cdot 10^5$	2,6
$1,50 \cdot 10^5$	3,7
73000	3
18000	3,4
12500	3,6
3000	4
600	4,1

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

**Exercice 5.3**

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

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

## **6. La chromatographie d'affinité**

### **6.1. Introduction**

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

Trois types d'affinité sont utilisés :

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

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

### **6.2. Etapes d'une chromatographie d'affinité**

Quand une solution contenant un mélange de protéines traverse la colonne, la protéine d'intérêt se liera au ligand immobilisé, alors que les autres protéines ne s'y lieront pas et sortiront de la colonne on peut récupérer la protéine désirée sous une forme très pure en modifiant les conditions d'élution pour faire en sorte que la protéine se détache du ligand.

#### *1) Etape de fixation*

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

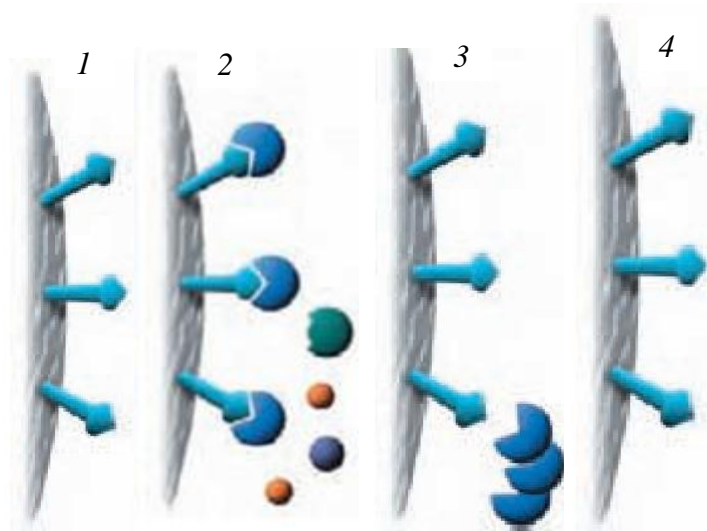
2) *Etape de purification*

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

3) *Etape d’élution*

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

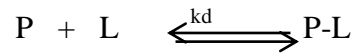
- ✚ Tampons de pH différent de celui ayant permis la charge donc changement de l’état d’ionisation de la molécule donc on a désorption
- ✚ Tampon de pH ionique différent de celle ayant permis la charge donc changement de conformation de la molécule.
- ✚ Compétition avec un ligand libre (libération de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



**Fig.6.1** : Principe de séparation de la chromatographie d’affinité

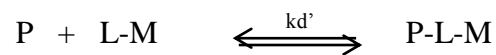
### 6.3. L’interaction protéine-ligand

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



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

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



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

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

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

1. du  $K_d'$  (l’interaction est trop faible si la valeur est supérieur à  $10^{-4}$ M)
2. de la concentration de protéine dans l’extrait
3. du degré de liaison du ligand à la matrice donc de la concentration de L-M

### 6.4. Phase stationnaire

Le principe consiste à utiliser une phase stationnaire constituée d’un support (silice, polymère) sur lequel a été greffée une molécule organique particulière qui présente une affinité sélective pour certains constituants d’un mélange dont on cherche à les isoler. Ceux-ci vont être sélectivement adsorbés ou tout au moins retenus sur la colonne, tandis que les autres composants sont très rapidement élués. Un changement de la phase mobile (pH, force ionique ou ajout d’un compétiteur) permet ensuite d’élué les substances intéressantes. Le gel d’affinité est constitué d’un effecteur fixé par covalence à un support (carboxyméthylcellulose, Sephadex, gel de polyacrylamide) par l’intermédiaire d’un bras de fixation (espaceur), le plus souvent constitué d’une chaîne carbonée de longueur variable.

### **6.5. Avantage et inconvénient de la méthode**

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

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

### **Applications**

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

## *CHAPITRE IV*

### *CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE*

*Chromatographie en phase gazeuse*  
*L'analyse qualitative et quantitative en CPG*

## Chapitre IV

### Chromatographie en phase gazeuse

#### I. Définition

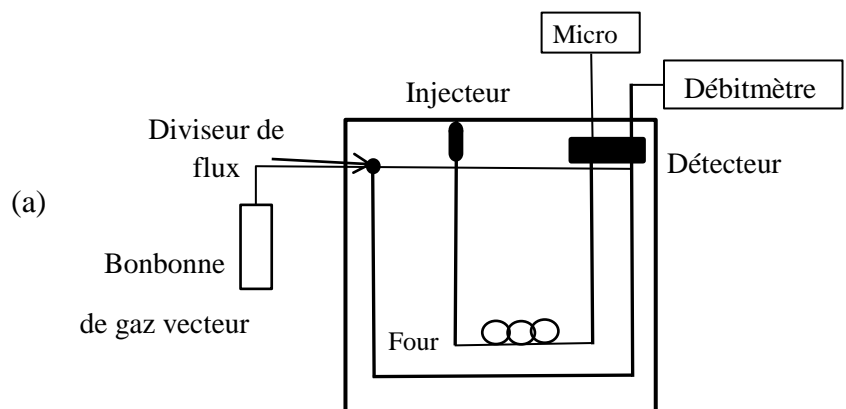
La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation applicable aux composés gazeux ou susceptible d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition (dont la masse moléculaire  $MM < 300$ ) ; les constituants peuvent différer par leur nature et leur volatilité. La séparation exige des quantités de l'ordre de mg seulement ; parfois même de  $\mu\text{g}$ .

On distingue selon la phase stationnaire:

- ✚ Chromatographie de partage : La chromatographie gaz-liquide : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.
- ✚ Chromatographie d'adsorption : La chromatographie gaz-solide : la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.

#### II. Principe de la technique et appareillage

En CPG la phase mobile est un gaz, ce fluide traverse une colonne renfermant des granules poreux qui constitue la phase stationnaire. Lorsque un échantillon à analyser est injecté et vaporisé ; ces constituants sont entraînés à des vitesses inégales par la phase mobile, à la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur. L'appareillage employé pour effectuer la séparation est un chromatographe dont la figure 1 présente schématiquement les principaux éléments.



**Fig.1** (a) et (b) schéma et photo d'un appareil de chromatographie gaz

## **II.1. Gaz vecteur**

L'élution est assurée par un flux de gaz inerte appelé gaz vecteur ou porteur (phase mobile). Le gaz vecteur doit être pur, inerte (il ne doit pas réagir avec les constituants du mélange à séparer) et le moins miscible possible avec la phase stationnaire. L'hélium est le gaz porteur le plus courant, bien que l'on utilise aussi l'argon, l'azote et l'hydrogène. Le choix du gaz vecteur est conditionné par l'efficacité de la séparation et la sensibilité du détecteur.

- ✚ Catharomètre :  $N_2$ ,  $H_2$ , He
- ✚ Capture d'électron :  $N_2$  ou  $H_2$
- ✚ ionisation de flamme :  $N_2$

Il n'y a pas d'interaction entre le soluté et la phase mobile en CPG.

## **II.2. Injecteur**

Le système d'injection permet l'introduction de l'échantillon dans le chromatographe, par l'intermédiaire d'une micro-seringue dont la capacité varie habituellement de 1 à 10  $\mu\text{L}$ . Le système d'injection joue plusieurs rôles, que l'échantillon se trouve sous forme solide, liquide ou gazeux:

- ✚ Rôle d'interface qui permet d'introduire l'échantillon dans le chromatographe
- ✚ Rôle de système de vaporisation (dans le cas d'un échantillon liquide ou solide)
- ✚ Rôle d'organe de transfert dans la colonne chromatographique.

Il y a plusieurs modes d'injections

### **1. *Injection par vaporisation directe***

L'introduction du mélange se fait par l'intermédiaire d'une micro seringue dont le volume varie généralement de 1 à 10  $\mu\text{L}$  et dont l'aiguille a un diamètre de l'ordre de 0,15 mm à travers un diaphragme, ou septum, en élastomère dans une chambre à vaporisation instantanée située au sommet de la colonne. La chambre d'injection est habituellement

maintenue à environ 50°C au-dessus du point d'ébullition du constituant le moins volatil de l'échantillon. Ce système est conçu pour les colonnes remplies.

## **2. Injection « split/splitless »**

Les systèmes d'injection pour colonnes capillaires sont:

- ✚ les diviseurs d'entrée ou splitter (split)
- ✚ le splitless

Il s'agit d'injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, avec ou sans division (encore appelés split ou splitless).

En mode split, le gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation ; une vanne de fuite sépare le courant gazeux en deux parties dont la plus petite est la seule à pénétrer dans la colonne. Seulement 1% de l'échantillon injecté passe réellement sur la colonne. L'autre partie (99%) s'échappe par un système de fuite. Ce mode est utilisé dans le cas des colonnes capillaires à faible débit.

L'inconvénient de ce mode d'injection est l'évaporation sélective des composés les plus volatils avec modification de la composition réelle de l'échantillon injecté.

Le mode splitless la solution injectée est volatilisé puis entraîné dans les premières spires de la colonne capillaire où elle se condense. L'injecteur est ensuite balayé par le gaz vecteur qui élimine l'excès de solvant. Ce procédé est réservé aux échantillons très dilués.

### **II.3. Four**

Le four est une enceinte thermostatée dans laquelle se trouve la colonne possédant un système de ventilation. Au lieu de maintenir la température constante on peut l'astreindre à suivre une loi de variation donnée, généralement linéaire, pour obtenir une chromatographie à température programmée.

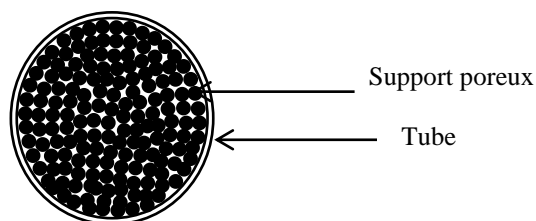
## II.4. Colonne

On distingue trois types de colonnes.

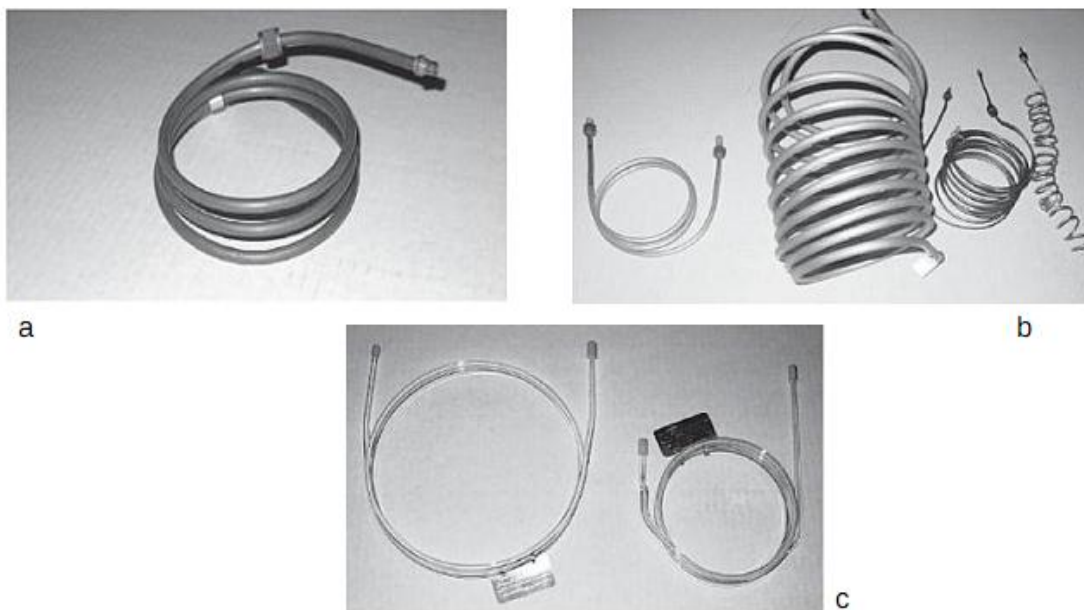
### a) Colonne remplie (à garnissage)

Existant depuis les débuts de la CPG, elles sont faites avec des tubes spiralés le plus souvent en acier ou plus rarement en verre, de diamètre intérieur de 2 à 6 mm, ont une longueur comprise entre 1 et 3 m et sont enroulées sous forme hélicoïdale. Elles sont remplies d'un support poreux, inerte et stable à température élevée, imprégné de 5 à 20% de phase stationnaire (Fig.3 et 4).

Le support le plus utilisé est la terre de diatomées (silicates fossiles).



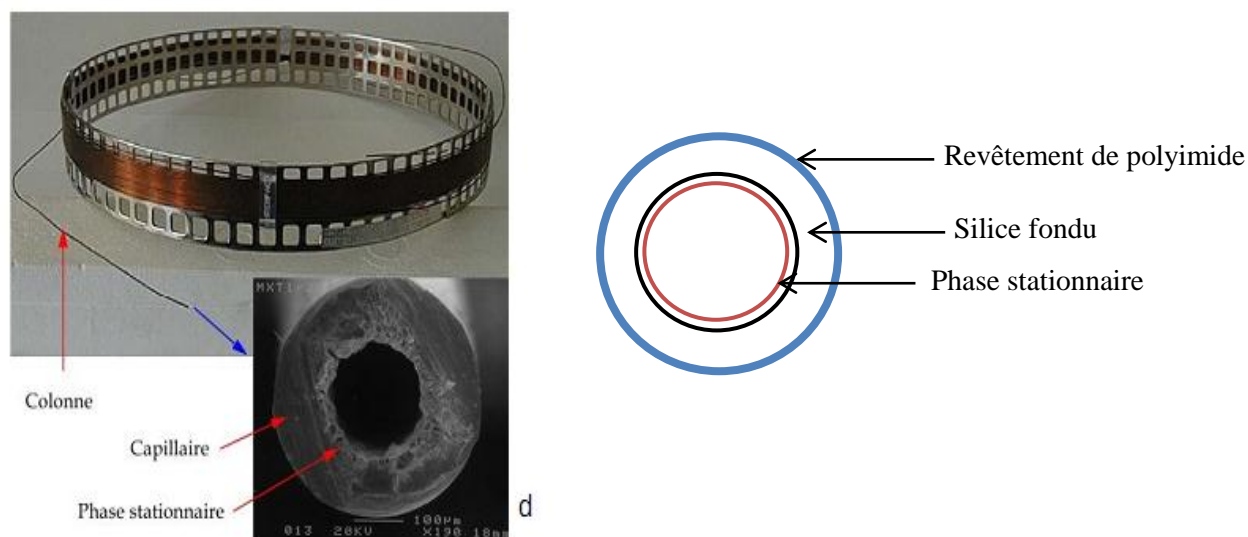
**Fig.3** Colonnes remplies



**Fig.4** Photo colonnes remplies a) Cuivre 2m x 6,4 mm; b) Aluminium 6m x 1cm c) Verre 2m x 0,25 d.e

**b) Colonne capillaire**

Les colonnes capillaires ont un diamètre interne variant entre 0,05 et 0,35 mm et une longueur comprise entre 10 et 50 m enroulés on spirale. Elles sont revêtues d'une couche de polymère ou d'un film d'aluminium et sont enroulées sur un support métallique cylindrique léger, en forme de cage. Il n'y a alors pas de remplissage: la phase stationnaire ou l'adsorbant est déposée ou greffée sur la paroi interne de la colonne (sur la figure 5 on observe la phase stationnaire déposée sur le métal). La faible quantité de phase stationnaire permet des analyses rapides mais impose l'injection d'une quantité très faible d'échantillon  $<1\mu\text{g}$ .



**Fig.5** photo, schéma d'une colonne capillaire et microphotographie électronique à balayage de son extrémité

**c) Colonne semi-capillaire**

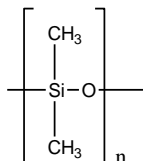
Elles sont constituées d'un tube de silice de 0,53 mm de diamètre interne et ont une longueur variant de 5 à 50 m. Elles remplacent, à l'heure actuelle, les colonnes à remplissage sur les chromatographes anciens, tout en conservant les mêmes injecteurs et détecteurs. Elle supporte l'injection d'une quantité plus grande d'échantillon qu'une colonne capillaire mais la résolution est moins bonne (plus le diamètre d'une colonne est faible, meilleure est la résolution). La colonne, enroulée sous forme hélicoïdale, est reliée à l'injecteur à l'une de ses

extrémités et au détecteur à l'autre.

## II.5. Phase stationnaire

Les phases stationnaires les plus courantes, classées par ordre de polarité croissante et leurs noms commerciaux sont :

### ✚ Phases apolaires 100% méthyle silicone



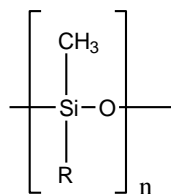
SE-30 (30 à 350°C) n=15000-35000

OV-1 (100 à 350°C) n=40000-50000

OV-101 (0 à 350°C) n= 400

Le SE-30, l'OV-1 et OV-101, diméthyle siloxanes, se différencient par leur nombre de groupement diméthyle silyle. L'OV-101 en possédant moins, a une température d'utilisation la plus basse.

### ✚ Méthyl-phényl ou compositions diverses



Avec R = phényl, vinyl, cyanopropyl, cyanoéthyl


SE-52, OV-73 respectivement 5% et 5% phényl

SE-54, OV-73 5% phényl, 1% vinyl

OV-1701 7% phényl, 7% cyanopropyl

Le pourcentage donne dans chaque cas la fraction de groupements méthyle remplacés par le groupement indiqué sur le squelette polysiloxanes. Pour le SE-52 le 5% polydiméthylphényl


siloxane a un cycle phényle lié à 5% des atomes de silicium du polymère.

 Phases peu polaires

L'OV-7 et l'OV-17 méthyle phényle silicone, sont de polarité moyenne

OV-7 20% phényl, 80% vinyl

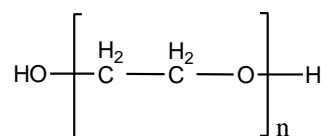
OV-17 50% phényl, 50% vinyl

 Phases polaires

Ce sont des dérivés de glycols, utilisés pour séparer les molécules de forte polarité

OV-275 (50 à 225°C), 100% cyanopropyl silicone

Les polyéthylènes glycols (Carbowax 20M)



Polyéthylène glycol

**Exemple**

Un mélange d'heptane, propanol-1 et pentanol sont élués dans cet ordre lorsqu'on utilise une phase stationnaire polaire telle que le Carbowax. Cet ordre est inversé quand on utilise une phase stationnaire non polaire telle que le polydiméthyl siloxane.

1. Phase stationnaire polaire

Substance	Propanol-1	Pentanol	Heptane
Point d'ébullition	97	137	98
Ordre de sortie	2	3	1

2. Phase stationnaire apolaire

Substance	Propanol-1	Pentanol	Heptane
Point d'ébullition	98	126	97
Ordre de sortie	2	1	3

**II.6. Les systèmes de détecteurs**

- **Quelques définitions**

Limite de détection (LD) : est la quantité de soluté requise pour avoir un rapport signal bruit au moins égal à 3.

Limite de quantification (LQ) : est la quantité de soluté requise pour avoir un rapport signal bruit au moins égal à 10.

Domaine de linéarité (LL) : domaine dans lequel la réponse du détecteur est directement proportionnelle à la concentration.

Sensibilité : capacité d'un détecteur à répondre à de faibles variations de concentration ou de masse.

- **Caractéristiques d'un détecteur idéal**

Bonne sensibilité la sensibilité des détecteurs actuels sont comprises entre ( $10^{-8}$  et  $10^{-15}$  g soluté/s).

Bonne stabilité et reproductibilité.

Réponse linéaire sur plusieurs décades de concentrations.

Domaine de température de fonctionnement compris entre la température ambiante et au moins 400°C.

Une préservation de l'intégrité de l'échantillon

### **II.6.1 Détecteur à conductivité thermique (DCT) ou catharomètre**

Le DCT est le détecteur le plus répandu aux débuts de la chromatographie en phase gazeuse, c'est un appareil à réponse universelle, mais relativement peu sensible. Il est fondé sur une comparaison continue entre le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur pur et le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur chargé des molécules de soluté. Ces flux de chaleurs sont produits par des thermistances, parcourues par un courant continu de tension fixe, dans une enceinte thermostatée avec précision. Les thermistances sont montées en pont de Wheastone et celui-ci permet de suivre l'évolution du courant en fonction de la variation des résistances consécutive aux variations de température autour des filaments. Un galvanomètre ou un potentiomètre enregistreur suivent le courant dans le pont. Le catharomètre présente l'avantage de ne pas détruire les substances analysée. Mais son principal inconvénient provient de sa faible sensibilité (de l'ordre du microgramme).

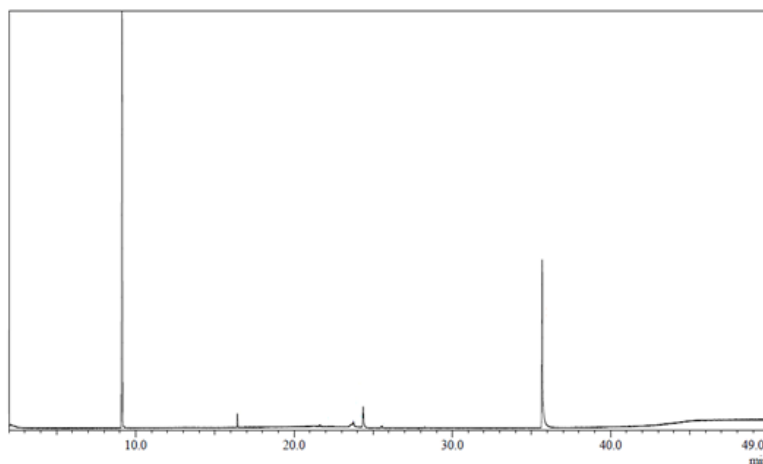
### **II.6.2. Détecteur à ionisation de flamme (DIF)**

C'est le détecteur le plus utilisé en CPG, il est spécifique aux composés carbonés sauf HCHO et HCOOH. La phase mobile pénètre dans un petit brûleur dont la flamme est alimentée par un mélange d'H<sub>2</sub> et d'air. La combustion des composés organiques élués produit des ions et des électrons qui sont collectés au moyen de deux électrodes. Le courant très faible qui en résulte est transformé en une tension qui est enregistrée, le passage du courant indique la présence d'un soluté. L'aire du pic obtenu est proportionnelle à la masse et non à la concentration. L'avantage de ce détecteur est que les variations de débit de la phase mobile ont peu d'influence sur la réponse et il présente l'inconvénient de détruire l'échantillon au cours de l'étape de combustion.

### **II.6.3. La spectrométrie de masse**

Le spectromètre de masse est un des détecteurs les plus puissants pour la chromatographie gazeuse. On appelle GC-MS (Gaz Chromatography-Mass Spectroscopy) la combinaison de la chromatographie gazeuse et de la spectrométrie de masse. Un spectromètre de masse mesure le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) des ions qui ont été produits à partir de l'échantillon par une source d'ionisation qui est assez énergétique pour briser des liaisons

chimiques dans les molécules de l'échantillon et forme beaucoup de fragments ; qui sont très utiles pour identifier l'espèce moléculaire qui entre dans le spectromètre de masse à partie du spectre de fragmentation ou par comparaison avec bibliothèque de spectre (Fig.2).



**Fig.2** Chromatogramme GC-MS d'un mélange contenant plusieurs produits

#### **II.6.4. Autres détecteurs**

Il existe d'autres types de détecteurs, comme le détecteur thermoionique spécifique des composés azotés et phosphorés, celui à capture d'électrons (DCE) particulièrement sensible aux composés halogénés et celui à photométrie de flamme spécifique des composés contenant du soufre et du phosphore (excitation des éléments par de la lumière à  $\lambda$  caractéristiques ; détecteur qui émet respectivement à 526 nm pour P et 394 nm pour S).

#### **II.7. Optimisation de séparation**

Plusieurs facteurs influence la séparation d'un mélange analysé par CPG:

##### **II.7.1. La température**

Généralement, les composés les plus volatils sont les plus rapidement entraînés ; du fait leur tension de vapeur plus élevée. Cependant, si la température de la colonne est trop élevée,

l'équilibre des composants ne peut s'établir dans chaque phase et les pics apparaissent presque tous en même temps. D'autre part, si la température est trop basse ; la vitesse est lente et la diffusion importante et le temps de rétention devient trop long. Lorsque l'écart entre les points d'ébullition des constituants du mélange à séparer est grand, il est souvent préférable d'augmenter la température du four.

### **II.7.2. Le débit du gaz vecteur**

Le débit du gaz vecteur doit laisser le temps pour que les constituants du mélange puissent s'équilibrer entre les deux phases mobile et stationnaire. Si le débit est trop rapide, la séparation des pics est médiocre et s'il est trop lent, les pics perdent leur finesse par suite d'une diffusion excessive des molécules dans le gaz vecteur. La courbe de Van Deemter établie expérimentalement pour chaque colonne et chaque composé permet de définir la valeur optimale de la vitesse de la phase mobile :  $u_{opt} = \sqrt{B/C}$

Quand le débit est bien réglé, on a intérêt à augmenter la température du four pour améliorer la finesse des pics.

### **II.7.3 La longueur de la colonne**

De façon générale, on accroît l'efficacité de la séparation en augmentant la longueur de la colonne mais ceci se fait au détriment de la finesse des pics (toute augmentation se traduit par un nombre de plateaux N supérieur). De plus, la longueur des colonnes est limitée par le fait qu'une colonne trop longue exige une trop forte pression du gaz vecteur.

### **II.7.4. La nature de la phase stationnaire**

Le liquide qui constitue la phase stationnaire est, selon les cas, un hydrocarbure ramifié tel que le squalane de polarité nulle, un polyalkylsiloxane peu polaire, un polyéther polaire ou un polyester très polaire. La dissymétrie des pics ou les temps de rétention trop élevés sont le reflet de phénomènes d'adsorption ou d'affinité trop importante des composés vis-à-vis la phase stationnaire.

### **II.7.5. Précaution générale**

- ✚ l'échantillon à analyser doit toujours avoir subi un traitement initial (minimum) de purification : élimination de l'eau et des particules en suspension.
- ✚ la nature de la phase stationnaire qui se trouve dans le four doit être contrôlée. Ne jamais utiliser la colonne en dehors des limites de températures indiquées par le fabricant
- ✚ la seringue doit être rincée plusieurs fois avec l'échantillon avant l'injection
- ✚ l'aiguille au moment de son introduction à travers le septum de l'injecteur de ne pas être courber
- ✚ le septum doit être changé régulièrement (toutes les 50 injections environ)
- ✚ le mélange doit être injecté dès que l'aiguille se trouve enfoncée.

### **III. Analyse qualitative en CPG**

Après la détection, deux problèmes se posent aux chromatographistes l'identification et la quantification des composés.

#### **III.1 L'utilisation des grandeurs de rétention**

La CPG permet d'analyser qualitativement des constituants d'un mélange en utilisant des étalons ou témoins. Une substance pure au contact des phases, ne doit donner qu'un seul pic sur le chromatogramme. Pour une même phase stationnaire et dans les mêmes conditions opératoires, on ramène les grandeurs de rétention d'un composé quelconque à celles d'un composé connu, l'étalon. Lorsque les grandeurs de rétention sont identiques, cela nous permet de présumer de leur similitude ou d'affirmer leur non-identité en cas contraire (la preuve que le composé en question est absent ou présent). La gamme d'étalons est loin de couvrir tous les champs possibles des tensions de vapeurs.

### **A) Indices de Kovats**

L'identification d'une substance peut être facilitée par la connaissance de son indice de Kovats qui pour une phase stationnaire déterminée repose sur la comparaison de son temps de rétention et ceux de deux alcanes linéaires et ceci quelles que soient les conditions opératoires.

Le pic du soluté  $i$  est encadré entre les pics de deux hydrocarbures normaux à  $n$  et  $n+1$  atomes de carbone

On injecte sur la colonne à une température et à une pression d'entrée données, les alcanes linéaires de formule  $C_nH_{2n+2}$  avec  $n \geq 5$ . On repère les temps de rétention réduits de ces alcanes  $t'_r(n)$  et  $t'_r(n+1)$  et celui du produit considéré  $t'_r(i)$

Si un soluté est élué entre les deux alcanes ( $n$ ) et ( $n+1$ ), son indice de rétention  $I_i$  est donné par la formule suivante: A chaque produit ( $i$ ) est associé un indice de rétention  $I(i)$ , cet indice est basé sur un système d'étalonnage par des hydrocarbures linéaires.

#### ***En isotherme***

$$I_i = 100. \left( \frac{\log t'_r(i) - \log t'_r(n)}{\log t'_r(n+1) - \log t'_r(n)} \right) + 100. n$$

#### ***En programmation de température***

$$I_i = 100. \left( \frac{t_r(i) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right) + 100. n$$

### **Les Avantages**

- ✚ Relativement indépendants de la température.
- ✚ Ceci permet de comparer et d'utiliser des résultats venant de laboratoires différents.
- ✚ Ils existent des tables répertoriant les indices de rétention de nombreux produits chimiques.

### **III.2 L'identification par les méthodes de comparaison**

Cela revient à comparer le chromatogramme de l'échantillon à celui d'un mélange typique dans les mêmes conditions chromatographiques

### **III.3 Détecteurs sélectifs**

A la sortie de la colonne, on monte en parallèle deux systèmes de détection, l'un universel et l'autre spécifique, puis on compare les deux chromatogrammes obtenus. Ces appareils couplés sont des outils puissants pour l'identification des constituants.

### **III.4 Modifications par un processus réactionnel**

Transformer certains solutés par des réactifs chimiques dans la pré-colonne pour les rendre facilement identifiables ou plus volatiles (dérivatisations, modification de structure). Utiliser des adsorbants pour retenir certains constituants du mélange comme les acides gras, les acides aminés et les alcools. Par exemple transformer les acides en esters, les alcools en éthers ou éthers silylés pour éviter la formation de liaison hydrogène et faciliter la volatilisation du composé et éviter sa dégradation.

### **III.5 Couplage à d'autres méthodes**

L'identification des constituants de mélanges complexes se fait en couplant directement la sortie des colonnes à des spectromètres infrarouge (GC-FTIR) et à des spectromètres de masse (GC-MS).

## **IV. L'analyse quantitative**

La CPG est un outil incomparable pour la séparation et l'identification des constituants d'un mélange, elle permet aussi de calculer les proportions ou les quantités de chacun de ces constituants dans l'échantillon. Elle donne des résultats quantitatifs d'une très grande précision et on peut déterminer des concentrations à l'état de traces. L'analyse quantitative en CPG est basée sur la réponse du détecteur au composé à analyser. D'une manière générale la réponse du détecteur est fonction de la quantité de matière qui le traverse.

Cette réponse se traduit par un pic et est proportionnelle à la surface de ce pic.

Réponse = K x Surface du pic = f (masse du composé)

Dans le domaine de linéarité de la réponse du détecteur, pour un composé A on peut écrire:

$$M_A = [\text{concentration}]_A = K_A S_A$$

$M_A$ : masse du composé à doser

$K_A$  : facteur de réponse du détecteur au composé A

$S_A$  : surface du pic A

La concentration (ou la masse  $M_A$ ) du composé A est proportionnelle à la surface du pic. Pour des solutions très diluées ou trop concentrées, l'analyse quantitative devient assez délicate. Pour déterminer les aires des pics, on utilise les fonctions spécialement prévues des logiciels de chromatographie (GCMS solution V2.4, ...), qui assurent non seulement le pilotage du chromatographe, mais qui peuvent, en plus de l'acquisition des chromatogrammes, analyser et traiter les données et fournir un rapport d'analyse.

#### **IV.1 Les méthodes d'analyse quantitative**

La CPG quantitative se base sur la comparaison de la hauteur ou de l'aire du pic de l'analyte avec celle d'un ou de plusieurs étalons. Si les conditions sont soigneusement contrôlées, ces deux paramètres varient linéairement avec la concentration. On utilise la triangulation manuelle (multiplier la hauteur du pic par sa largeur à mi-hauteur) et l'intégration automatique, pour mesurer les aires des pics et déterminer pour chaque soluté, le coefficient de proportionnalité  $K_A$ . Il existe essentiellement quatre méthodes de quantification :

**a) La normalisation**

Soit l'analyse d'un mélange contenant n composés.

$$m_i = K_i S_i$$

En considérant que tous les  $K_i$  sont égaux (série homologue d'alcane, d'alcools, produit de même squelette)

La surface totale des pics est:  $S_T = \sum S_i$

On obtient alors les pourcentages en masse de chaque soluté de la manière suivante :

$$\% (m_i) = 100 \frac{S_i}{\sum S_i}$$

Cette méthode permet de donner le pourcentage d'un composé dans un mélange. Elle ne donne pas la concentration ou la masse du composé analysé.

**b) La méthode des ajouts**

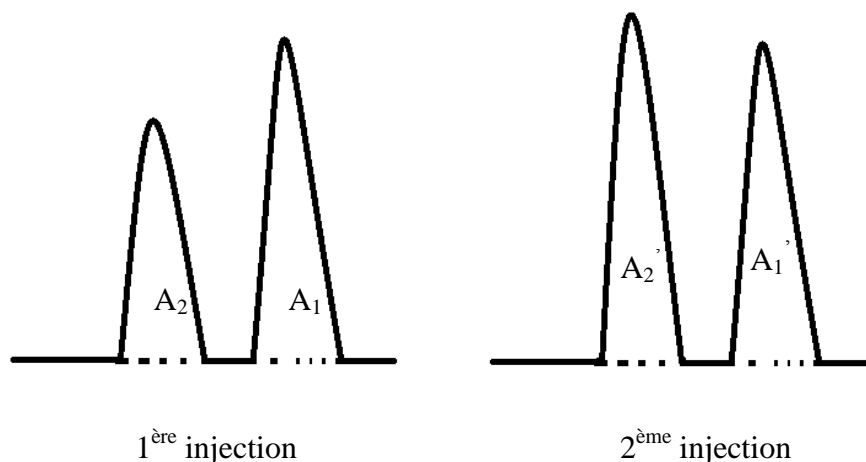
Cette méthode est utilisée dans le cas où la masse d'un constituant est en faible concentration dans le mélange. Pour cela on concentre le composé en question pour avoir une meilleure détection. On prend d'abord le chromatogramme du mélange de solutés à étudier.

Admettons que l'on cherche à déterminer le pourcentage en masse du composé n°2. On va obtenir l'aire du pic correspondant  $A_2$ , et l'on détermine également celle d'un pic voisin, par exemple  $A_1$ .

On pèse ensuite exactement une masse  $M$  de ce mélange voisine de 1g par exemple et qui contient les masses  $m_i$  des constituants. Puis on y rajoute une masse  $m_0$  du composé n°2, connue exactement, voisine de 300 mg environ. Le chromatogramme du nouveau mélange donne deux aires  $A_1'$  et  $A_2'$ .

On obtient pour le pourcentage en masse du composé n° 2.

$$\% \text{ en masse} = \frac{m_0 \times 100}{M \left( \frac{A_1 \times A_2'}{A_1' \times A_2} - 1 \right)}$$



### c) Etalonnage externe

La méthode la plus directe d'analyse quantitative par CPG consiste à préparer une série de solutions étalons dont la composition est proche de la solution inconnue.

Soit à doser un composé A dans un mélange.

Après injection on peut écrire:  $m_A = K_A S_A$

Préparer une gamme étalon : plusieurs solutions de concentration en A connue.

Injecter les solutions de la gamme étalon. Déterminer la surface de chaque pic des différentes solutions. Tracer la courbe  $m_A = f(S_A)$  la fonction obtenue doit être une droite qui passe par l'origine. Cette méthode permet de déterminer la masse ou la concentration du composé dosé. Son inconvénient majeur est le volume d'injection qui doit être constant dans la détermination de la courbe d'étalonnage et lors de l'injection de la solution à doser.

### d) Etalonnage interne

La mise en œuvre de cette méthode nécessite un étalon interne que l'on doit ajouter à la solution à analyser. Le volume injecté n'a aucune influence sur la détermination des concentrations ou des masses. La seule difficulté de cette méthode réside dans le choix de l'étalon interne. Cet étalon interne est un composé initialement absent de l'échantillon à analyser qui a une structure et des propriétés physico-chimiques proches du composé dont

on veut déterminer la concentration. Cette méthode est recommandée par l'analyse des liquides

Préparer une solution, appelée solution étalon contenant: une masse connue du composé à analyser et une masse connue d'étalon interne soit:

$$m_A^E \text{ de surface } S_A^E$$

$$m_{EI}^E \text{ de surface } S_{EI}^E$$

Ajouter à la solution à doser une masse connue d'étalon interne. Cette solution est appelée X.

$$m_A^X \text{ de surface } S_A^X$$

$$m_{EI}^X \text{ de surface } S_{EI}^X$$

Pour la solution X (analysée)

$$m_A^X = K_A S_A^X \text{ et } m_{EI}^X = K_{EI} S_{EI}^X \Rightarrow \frac{m_A^X}{m_{EI}^X} = \frac{K_A}{K_{EI}} \cdot \frac{S_A^X}{S_{EI}^X}$$

Pour la solution étalon

$$m_A^E = K_A S_A^E \text{ et } m_{EI}^E = K_{EI} S_{EI}^E \Rightarrow \frac{m_A^E}{m_{EI}^E} = \frac{K_A}{K_{EI}} \cdot \frac{S_A^E}{S_{EI}^E}$$

$$\frac{K_A}{K_{EI}} = K_{A/EI} \text{ est appelé facteur de réponse relatif}$$

En faisant le rapport membre à membre il vient:

$$\frac{\frac{m_A^X}{m_{EI}^X}}{\frac{m_A^E}{m_{EI}^E}} = \frac{\frac{K_A}{K_{EI}} \frac{S_A^X}{S_{EI}^X}}{\frac{K_A}{K_{EI}} \frac{S_A^E}{S_{EI}^E}} \Rightarrow \frac{m_A^X}{m_{EI}^X} = \frac{m_A^E}{m_{EI}^E} \frac{S_A^X}{S_{EI}^X} \frac{S_{EI}^E}{S_A^E}$$

$$\text{et enfin : } m_A^X = \frac{m_A^E}{m_{EI}^E} \frac{S_A^X}{S_{EI}^X} \frac{S_{EI}^E}{S_A^E} m_{EI}^X$$

## Applications

La chromatographie en phase gazeuse sert surtout pour l'analyse de liquide thermiquement stables et assez volatils (point d'ébullition < 250°C) et pour séparer les petites molécules avec des quantités de l'ordre de quelque picogrammes.

## Exercices

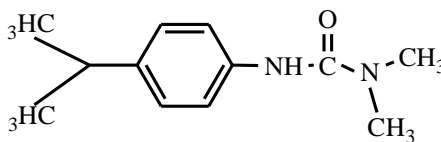
### Exercice 1

On se propose de doser le monuron (herbicide) dans un échantillon d'eau de rivière. La solution est analysée par HPLC. Donner le type de colonne, d'éluant et de détecteur que vous mettriez en œuvre pour réaliser vos essais. On utilise pour le dosage la méthode d'étalonnage externe les résultats sont dans le tableau ci-dessous:

Concentration (mg/L)	4,98	6,48	9,65	13,72
Aire	222	335	461	568

Après injection de la solution à doser de l'eau, le chromatogramme obtenu présente un pic correspondant au monuron avec une aire de 379 (unités arbitraires).

Donner la concentration du monuron dans la solution à doser ?



Monuron

### Exercice 2

On injecte un mélange constitué d'hexane, d'octane et de la substance à étudier sur une colonne CP-SE30. Les temps de rétention réduits observés sont pour l'hexane 3,5 min,

pour l'octane 6,8 min et pour la substance à étudier 4,7 minutes sur une colonne maintenue en régime isotherme.

Déterminer l'indice de Kovats de cette substance.

**Exercice 3**

Un mélange de trois composés volatils A, B et C est analysé par CPG sur une colonne de 50 m de longueur. Les données concernant les temps de rétention, l'aire des pics ainsi que les coefficients de réponse relatifs sont indiqués dans le tableau ci-dessous. Dans les mêmes conditions, un composé non retenu par la phase stationnaire est élué avec un temps de 2,3 min. Calculer le pourcentage de chaque composé dans le mélange.

Produit	tr(min)	Aire	Coefficient de réponse relatif
A	12,2	812155	1,00
B	14,7	3837537	0,95
C	18,2	1487764	0,89