

I. Généralités

I.1 Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation non destructrice d'un mélange liquide ou gazeux en ses différents constituants.

C'est également une méthode analytique qui a pour but d'identifier et de quantifier les composés d'un mélange homogène liquide ou gazeux.

La chromatographie a une place très importante dans la pratique du laboratoire et est utilisée couramment pour :

- Contrôler la pureté des réactifs et des produits d'une réaction.
- Suivre une réaction par analyse du milieu réactionnel.
- Isoler et purifier des produits d'une réaction.

I.2 Historique

En **1906** un botaniste d'origine russe **TSWETT**, présenta à Varsovie son premier article sur une nouvelle sorte de phénomène d'adsorption et son application à l'analyse biochimique. Il y décrivait la formation de zones colorées lors de l'élution par l'éther de pétrole de **pigments végétaux** dans une colonne remplie de **carbonate de calcium**.

L'origine du mot chromatographie vient peut-être de cette séparation de composés colorés puisque **CHROMA** (Krwma) en grec, signifie couleur.

Puis les travaux de **TSWETT** tombèrent dans l'oubli pendant une vingtaine d'années et il faudra attendre **1931** la publication de **KUHN** et **LEDERER** sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle pour assister au développement de la chromatographie en tant qu'outil analytique.

A partir de cette date, la chromatographie prit son véritable essor

Vers **1940**, **Martin et Syngé** développent la pratique et la théorie de la chromatographie, ils obtiennent le prix Nobel en 1952

En **1952**, mise au point de la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

En **1968**, mise au point de la Chromatographie Liquide Haute Performance CLHP ou HPLC en anglais.

En **1979**, première séparation chirale par HPLC.

I.3 Principe

Le principe repose sur les équilibres de concentration des composés présents entre deux phases non miscibles en contact.

- **Phase stationnaire** : peut-être solide ou liquide, qui est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support.
- **Phase mobile** : peut-être un liquide ou un gaz ou encore un fluide supercritique, qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant avec elle le soluté. Le processus d'entraînement de ce soluté est appelé élution.

Chaque constituant adopte une vitesse de migration qui lui est propre en fonction de sa solubilité dans la phase mobile et de son affinité pour la phase fixe qui tend à le retenir.

Finalement on obtient la séparation des constituants du mélange initial.

I.4 Classification des méthodes chromatographiques

Sous le nom de chromatographie on regroupe un très grand nombre de techniques différentes qui peuvent se classer en trois catégories selon :

- La nature physique des phases (mobile et stationnaire).
- Le principe du phénomène mis en jeu (type d'équilibre).
- Le procédé opératoire (immobilisation de la phase stationnaire).

I.4.1 Classification selon la nature physique des phases

Dans ce classement

➤ **Chromatographie en phase liquide (CPL)**

Si la phase mobile est un liquide, la phase stationnaire peut être soit un solide finement pulvérisé soit un liquide immobilisé sur une phase fixe, la combinaison de ces différents possibilités permet de distinguer deux types de chromatographie :

- **Chromatographie liquide-liquide (CLL).**
- **Chromatographie liquide-solide (CLS).**

➤ **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

Si la phase mobile est un gaz (vecteur), la phase stationnaire peut être soit un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz à bas points d'ébullition, soit un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage, la combinaison de ces différentes possibilités permet de distinguer deux types de chromatographie :

- **Chromatographie gaz-liquide (CGL).**

- **Chromatographie gaz-solide (CGS).**

➤ **La chromatographie supercritique (SFC)**

La SFC représente un cas intermédiaire entre CPL et CPG, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

I.4.2 Classification selon les phénomènes chromatographiques

Les phénomènes qui donnent lieu à la séparation dépendent de la nature des phases stationnaires, et on considère :

➤ **La chromatographie d'adsorption**

La phase stationnaire est un solide finement divisé sur lequel les molécules adhèrent par un double effet de physisorption et chimisorption. Le paramètre physico-chimique concerné est le coefficient d'adsorption.

➤ **La chromatographie de partage**

La phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide inerte : soit imprégnée dans un solide poreux (risques de lessivage), soit greffée sur le solide (phase greffée). La séparation repose sur le coefficient de partage du soluté dans les deux phases liquides.

➤ **La chromatographie par échange d'ions ou chromatographie ionique**

La phase stationnaire est formée de macromolécules (résines) portant des groupes fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de contre ions avec des ions de même signe de l'échantillon. La séparation repose sur les coefficients de distribution ioniques.

➤ **La chromatographie d'exclusion, ou perméation de gel, ou tamisage moléculaire**

La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel et sont donc retardés.

➤ **La chromatographie d'affinité**

la phase stationnaire est ici un substrat inerte sur lequel est greffé un "effecteur" qui présente une affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

I.4.3 Classification d'après le procédé utilisé

Selon l'immobilisation de la phase stationnaire on distingue :

➤ **La chromatographie sur colonne (CC)**

La phase stationnaire est contenue dans une colonne cylindrique en verre ou en métal.

➤ **La chromatographie sur papier (CP)**

Une surface de cellulose considérée comme support maintient par imbibition une phase stationnaire liquide.

➤ **La chromatographie sur couche mince (CCM)**

La phase stationnaire est dans ce cas retenue sur une surface plane (verre, matière plastique ou feuille d'aluminium) qui est recouverte d'une mince couche de 0.2 à 0.3 mm d'épaisseur de gel de silice, cellulose, d'alumine ou même de grains de résines échangeuses d'ions.

I.5 Choix de la technique

Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes.

Le choix de l'une ou l'autre dépend :

➤ **De la nature du soluté**

Gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...

➤ **Du but de l'analyse**

Identification de composants d'un mélange, nécessité ou non de "coupler" la chromatographie avec une méthode spectroscopique ou avec la spectrométrie de masse (CPG/SM ou GC/MS), contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages (quantification)...

I.6 Théorie De Base - Grandeurs Fondamentales

I.6.1 Le chromatogramme

Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne. La ligne de base correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué (**Figure 1**).

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

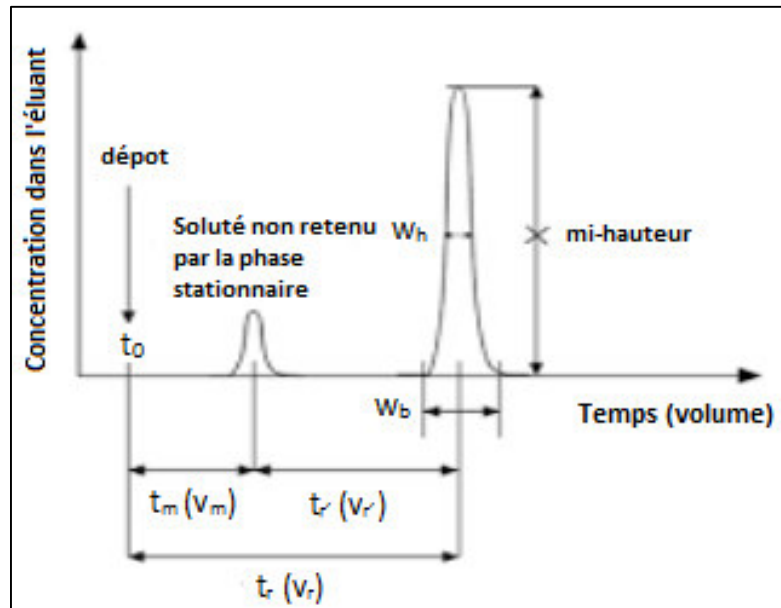


Figure 1 : diagramme montrant les caractéristiques d'un chromatogramme

Un pic chromatographique est caractérisé par :

➤ **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).

Le temps t_0 est le temps du début de l'injection.

➤ **Le temps de rétention**

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.

Un constituant est caractérisé par son temps de rétention t_r , temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui déterminé au maximum du pic lui correspondant sur le chromatogramme.

Le temps de rétention est indépendant de :

- la quantité injectée,
- la nature et de l'abondance des autres constituants dans le mélange.

Par contre il dépend de :

- la masse de phase stationnaire dans la colonne,
- débit de la phase mobile,
- volume mort du chromatographe (injecteur, détecteur, canalisations...),
- la nature de la phase stationnaire.

➤ **Le temps de rétention corrigé ou réduit t_r'**

Temps mis par les molécules du soluté pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne représentant le temps passé dans la phase stationnaire.

Il est obtenu par différence entre le temps de rétention réel et le temps mort. Il est lié uniquement au phénomène de rétention proprement dit. $t_r' = t_r - t_m$

➤ **Le volume de rétention**

Le volume de rétention de chaque soluté représente le volume de la phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Ce volume correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si D est le débit alors : $V_r = t_r \times D$

On peut également calculer le volume mort correspondant au volume de la phase mobile dans la colonne (volume interstitiel) : $V_m = t_m \times D$

➤ **Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile**

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

$$v = \frac{L}{t_r} \quad L : \text{longueur de la colonne}$$

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

$$u = \frac{L}{t_m}$$

I.6.2 Le coefficient de distribution

En chromatographie en phase liquide, les séparations sont basées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles l'une **stationnaire** (particules solides imprégnées ou non d'un liquide), l'autre **mobile** (liquide).

Pour un système chromatographique donné, le **coefficient de distribution K** (ou coefficient de partage) est défini par :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s : concentration du soluté dans la phase stationnaire

C_m : concentration du soluté dans la phase mobile.

I.6.3 Le facteur de capacité k' (ou facteur de rétention)

Quand on introduit un composé dans la colonne, sa masse totale m_T se répartit en deux quantités m_M dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire. Ces quantités restent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Elles dépendent de m_T et de K . Leur rapport est fixe et est appelé facteur de rétention :

$$k' = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad K: \text{coefficient de distribution}$$

Avec V_S : volume de la phase stationnaire qui est calculé par différence entre le volume total de la colonne et le volume de la phase mobile (V_M).

k' n'est pas une constante mais varie avec les conditions opératoires (température, composition de la phase mobile...). C'est le paramètre le plus important en chromatographie pour définir le comportement d'une colonne. On évite d'avoir des valeurs de k' trop élevées pour ne pas allonger le temps d'analyse.

k' peut se déterminer directement à partir du chromatogramme :

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad \text{ou} \quad k' = \frac{t'_r}{t_m}$$

Cette relation est également souvent rencontrée sous la forme :

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

I.6.4 L'efficacité d'une colonne

a) Nombre de plateaux théoriques et de plateaux efficaces

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne.

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 de longueur L en N petits disques fictifs de même hauteur H , numérotés de 1 à n . Pour chacun d'eux, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration dans la phase stationnaire de ce soluté. À chaque nouvel équilibre le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire dans la colonne, appelé plateau théorique (**Figure 2**).

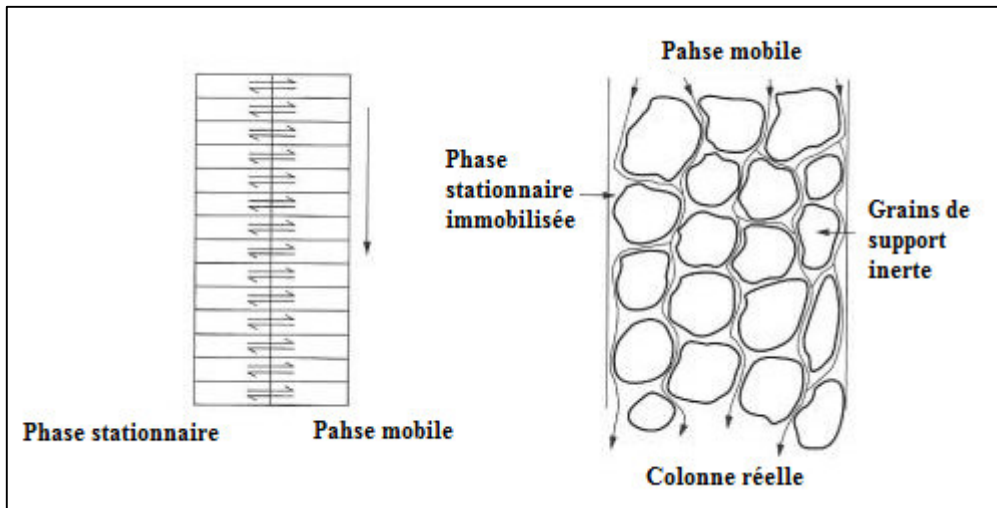


Figure 2 : théorie des plateaux

La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou H) vaut donc :

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

L'efficacité de la colonne augmente lorsque le nombre de plateaux théoriques augmente ou si H diminue à longueur L constante. Elle peut varier considérablement selon le type de colonne et la nature des deux phases.

b) Pics d'éluion Gaussiens

L'efficacité de la colonne est calculée à partir du pic chromatographique que l'on assimilera à une courbe de Gauss. La dispersion d'un pic est caractérisée par son écart type σ et sa variance σ^2 .

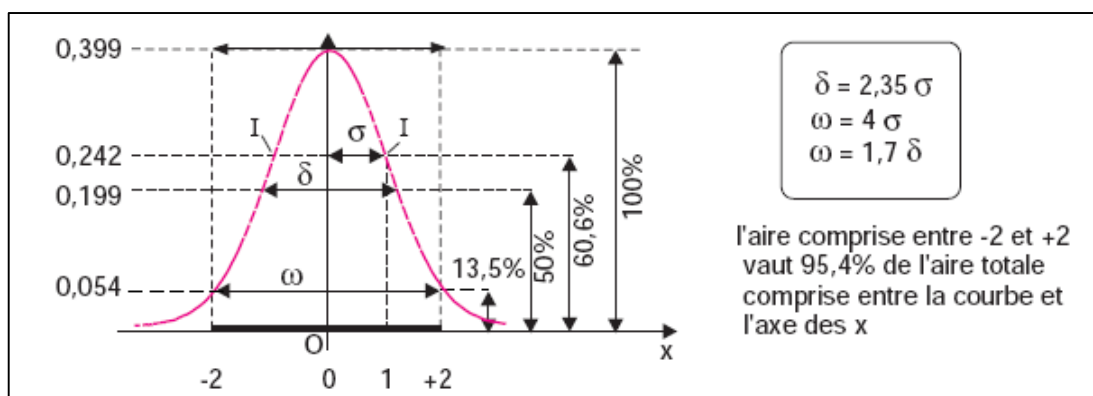


Figure 3 : Caractéristique d'une courbe de Gauss (pic idéal)

δ : la largeur à mi hauteur (mesurée à 50% de la hauteur totale)

σ : l'écart type du pic (qui est égal à la demi largeur du pic à 60,6% de sa hauteur totale) variance
 $v = \sigma^2$

ω : la largeur de la base du pic mesurée à 13,5% de la hauteur totale

L'efficacité d'une colonne est liée à la largeur des pics et on définit cette efficacité comme étant la variance par unité de longueur de colonne soit :

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

Comme H est exprimé en unité de longueur, σ et L sont exprimés en unité de longueur.

On peut déterminer la H ou N graphiquement. On mesure graphiquement t_r et ω (en unité de temps). Ce qui permet de déterminer N puis H.

$$N = 16 \frac{t_r^2}{\omega^2}$$

On peut aussi exprimer cette relation en fonction de la largeur à mi-hauteur δ . Elle devient

$$N = 5.54 \frac{t_r^2}{\delta^2}$$

On utilise généralement cette dernière équation car les pics sont souvent déformés à la base.

c) Efficacité réelle d'une colonne

N et H sont deux paramètres utilisés dans la littérature et par les fabricants d'appareils pour évaluer les performances d'une colonne. Ils sont donnés pour un soluté défini dans les conditions définies.

Lorsque l'on veut comparer les performances de deux colonnes de conception différentes, il est préférable de remplacer t_r par le temps réduit t'_r qui ne tient pas compte du temps mort t_m passé pour tout composé dans la phase mobile. Les expressions deviennent :

$$N_{eff} = 16 \frac{t'_r{}^2}{\omega^2} \quad \text{ou} \quad N_{eff} = 5.54 \frac{t'_r{}^2}{\delta^2}$$

Ces grandeurs corrigées ne sont utiles à considérer que si le temps mort est grand par rapport au temps de rétention du composé. Ceci est notamment le cas en CPG lorsque l'on veut comparer les performances d'une colonne capillaire et d'une colonne remplie.

I.6.5 La qualité de la séparation

a) Sélectivité d'une colonne

Le facteur de sélectivité α décrit la position de deux pics adjacents 1 et 2 situés sur un chromatogramme. Il correspond au rapport des facteurs de rétention de la colonne pour les deux composés. Il définit si la séparation est chimiquement possible :

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{k_2}{k_1} \quad \alpha \text{ est toujours supérieur à } 1$$

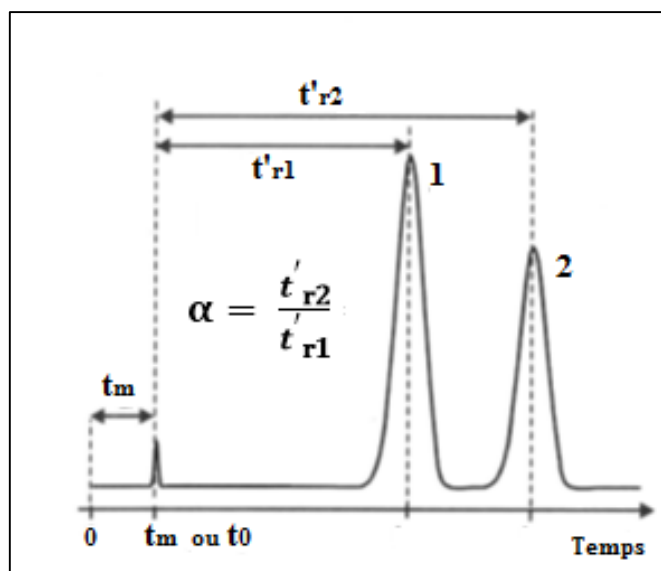


Figure 4 : facteur de sélectivité

b) Résolution

La résolution R d'une colonne donne la mesure quantitative de son aptitude à séparer deux solutés. Elle est définie par :

$$R = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{\omega_1 + \omega_2}$$

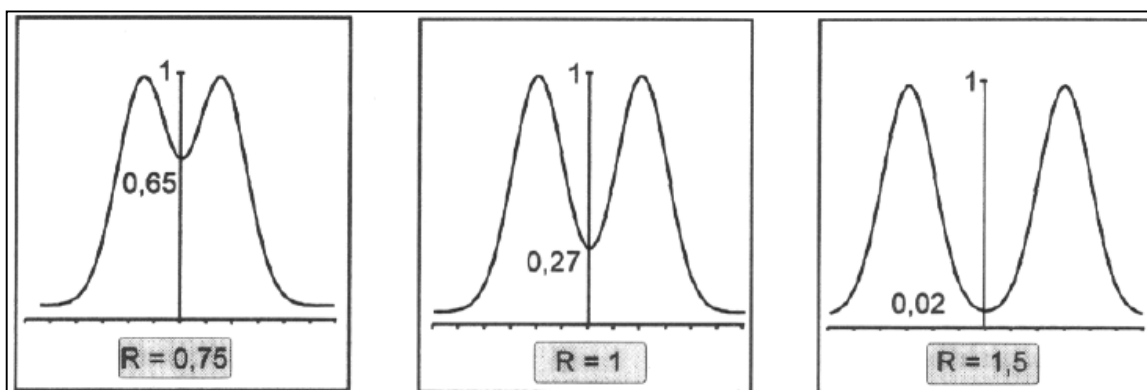


Figure 5 : facteur de résolution

Une résolution de 1,5 permet la séparation pratiquement complète de 1 et 2, ce qui n'est pas le cas pour une résolution de 0,75.

Pour une résolution de 1 le pic de 1 contient environ 4% de 2 et le pic de 2 environ 4% de 1.

Pour une résolution de 1,5 le chevauchement est d'environ 0.3%.

On établit facilement l'équation qui lie la résolution d'une colonne et le nombre de ces plateaux théoriques ainsi que les facteurs de capacité et de sélectivité de deux solutés sur la colonne :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right)$$

où k'_2 est le facteur de capacité de l'espèce la plus lente et α le facteur de sélectivité.

I.7 Optimisation d'une analyse chromatographique

La résolution et le temps d'élution sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante du ou des composés intéressants en un minimum de temps. Les paramètres qui conditionnent R et t_r sont le nombre de plateaux théoriques N , le facteur de capacité α et le facteur de sélectivité k'_2 :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right)$$

I.7.1 Modification de la hauteur équivalente à un plateau théorique

La résolution d'une colonne est par définition proportionnelle à la racine carrée du nombre de plateaux théoriques qu'elle contient. L'augmentation du nombre de plateaux entraîne un allongement de la durée de la séparation, sauf si cette augmentation est obtenue en réduisant H . Les méthodes permettant de minimiser H sont la diminution de

- ✓ diamètre des particules du support
- ✓ la température (CPG)
- ✓ l'épaisseur du film liquide (HPLC)

On peut optimiser également la vitesse d'écoulement de la phase mobile.

I.7.2 Modification du facteur de capacité

La séparation peut souvent être améliorée de manière significative en modifiant le facteur de capacité k'_2 . L'augmentation de k'_2 améliore le facteur de résolution au détriment de la durée de l'élution. Les valeurs optimales de k' sont généralement comprises entre 2 et 5.

Le moyen le plus usuel pour améliorer la résolution est d'optimiser k' :

- ✓ pour les phases mobiles gazeuses, k' peut être contrôlé en modifiant la température.

- ✓ pour les phases liquides des changements de composition du solvant permettent souvent d'agir sur k' de manière à obtenir de meilleures séparations.

I.7.3 Modification du facteur de sélectivité

L'optimisation de k' et de N ne suffisent pas pour donner une bonne séparation de deux solutés en un temps raisonnable si α est proche de 1. Dans ce cas on doit chercher à augmenter α tout en maintenant k' entre 1 et 10. Plusieurs options sont possibles, on peut :

- ✓ modifier la phase mobile
- ✓ modifier la température de la colonne
- ✓ modifier la composition de la phase stationnaire
- ✓ utiliser des effets chimiques spéciaux.

Une augmentation de température entraîne également une augmentation de k' mais elle a peu d'effet sur la valeur de α en chromatographie liquide-liquide ou liquide-solide. Par contre la température a une influence sur l'échange d'ions et sera un paramètre à optimiser.

I.8 Analyse qualitative et quantitative

I.8.1 Analyse qualitative

Elle sert essentiellement à l'identification des composants d'un mélange.

Elle consiste à identifier les solutés par leur temps de rétention qui pour des conditions données (solvant, débit, colonne etc) est caractéristique du composé. Il peut bien sur arriver que deux composés différents mais très proches aient le même temps de rétention. On doit donc s'assurer préalablement qu'un pic donné correspond bien à un seul soluté. C'est l'objet de toute la phase de mise au point des conditions opératoires utilisées. On admet ici pour la suite que chaque pic correspond à un seul composé.

I.8.2 Analyse quantitative

Une fois identifiés le ou les solutés intéressants, celui-ci permet l'analyse quantitative grâce à la relation: $m_i = K_i A_i$

m_i : la masse du soluté i injecté

A_i : l'aire du pic représentant ce soluté.

K_i : le coefficient de proportionnalité.

a) Mesure de l'aire de pic A_i

On utilise essentiellement la triangulation manuelle et l'intégration automatique.

- ✓ **la triangulation** : on assimile le pic à un triangle soit en traçant les tangentes aux points d'inflexion de la courbe et en calculant l'aire: $A_i = \frac{1}{2}H' \times \omega$, soit en mesurant la largeur à m_i - hauteur et en calculant l'aire par: $A_i = H \times \delta$ ou encore en mesurant les largeurs au quart (β) et aux trois quarts (γ) de la hauteur, $A_i = \frac{1}{2}H \times (\beta + \gamma)$

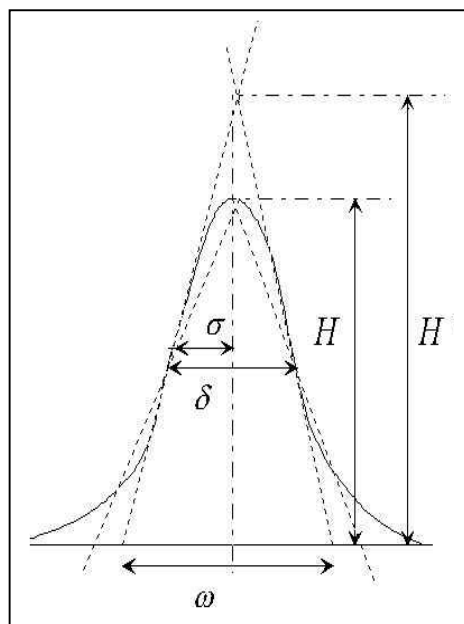


Figure 6 : la triangulation

b) Détermination du coefficient de proportionnalité

Il est impossible avec les chromatographes courants de calculer le coefficient de proportionnalité par mesure directe de l'aire du pic enregistré quand on introduit une masse exacte, connue, d'un soluté d'un injecteur. Les seringues d'injection ne permettent pas de repérer le volume d'échantillon avec une précision suffisante. On aura donc recours à des méthodes d'étalonnage, qui, comme en analyse qualitative, feront de la chromatographie quantitative un procédé relatif vis-à-vis de substances connues. Voici les principales méthodes utilisées.

- ✓ **Normalisation interne** : en considérant que tous les K_i sont égaux (séries homologues telles que alcanes, alcools, etc..). On obtient alors les pourcentages en masse de chaque soluté de la manière suivante:

$$m_i \% = \frac{A_i}{\sum_i A_i} \times 100$$

- ✓ **Etalonnage interne** : dans cette méthode, on compare individuellement chacun des pics à évaluer au pic d'une substance étalon E, convenablement choisie, introduite en proportion connue dans le mélange à analyser. il convient évidemment que le pic étalon ne soit confondu avec aucun des pics du chromatogramme.

$$m_e = K_e \times A_e \quad \text{soit} \quad \frac{m_i}{m_e} = \frac{K_i}{K_e} \times \frac{A_i}{A_e}$$

On définit alors
$$K_{i/e} = \frac{K_i}{K_e}$$

On calculera donc la réponse de chaque soluté concerné par rapport à l'étalon. La méthode est générale. Elle est précise et reproductible

- ✓ **Etalonnage externe** : Cette technique n'est valable qu'avec une excellente qualité d'injection

On injecte une masse m_e de composé étalon en solution (V_e injecté).

$$m_e = K \times A_e \quad \text{soit} \quad K = \frac{m_e}{A_e}$$

On injecte un même volume de solution contenant le composé (m_i) et on mesure m_i .

$$m_i = K \times A_i \quad \text{soit} \quad m_i = \frac{m_e}{A_e} \times A_i$$

II. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

II.1 Définition

La chromatographie en phase gazeuse est une technique de chromatographie très répandue, extrêmement sensible, dont les premières applications, qui remontent au début des années 40, ont concerné le contrôle des fractions légères des raffineries de pétrole. C'est une **méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition**. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges éventuellement très complexes dont les constituants peuvent différer de façon considérable par leur nature et leur volatilité.

On distingue selon la phase stationnaire :

- **Chromatographie de partage (chromatographie gaz-liquide)** : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.
- **Chromatographie d'adsorption (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.2 Principe

L'échantillon (un liquide volatil) est d'abord introduit en tête de colonne par l'intermédiaire d'une micro seringue qui va traverser une pastille souple, appelée septum, pour se retrouver dans une petite chambre en amont de la colonne appelée injecteur. L'injecteur est traversé par le gaz porteur et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Les quantités injectées peuvent varier de 0,2 à 5,0 μl .

Ensuite, une fois rendus volatils, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le gaz porteur (ou gaz vecteur) à travers la colonne et se séparer les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. La phase stationnaire peut être un liquide non (ou peu) volatil (chromatographie gaz-liquide) ou un solide adsorbant (chromatographie gaz-solide). Dans les deux cas, la phase stationnaire va provoquer un phénomène de rétention chromatographique il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de migration respectives sont inégales. A la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur. Lorsqu'un constituant du mélange arrive au niveau du détecteur, un pic apparaît sur l'enregistreur. Le temps de sortie de chaque constituant t_r , nommé temps de rétention, caractérise de façon qualitative le constituant. L'aire

du pic permet de déterminer la concentration massique de chaque soluté dans le mélange injecté. L'analyse d'un mélange peut donc être quantitative.

L'appareillage employé pour effectuer la séparation est un chromatographe dont la figure 7 présente schématiquement les principaux éléments.

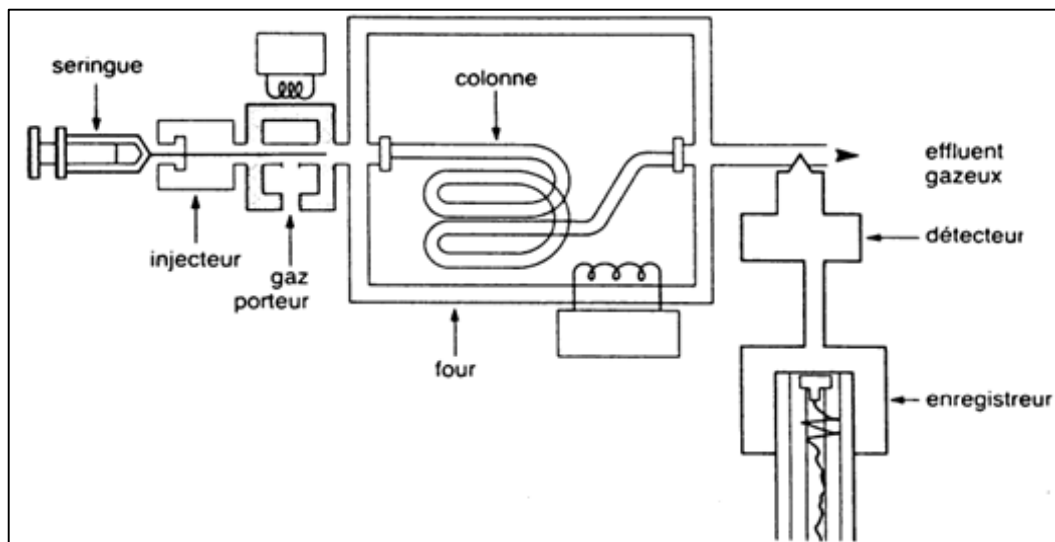


Figure 7 : schéma de principe d'un chromatographe à gaz

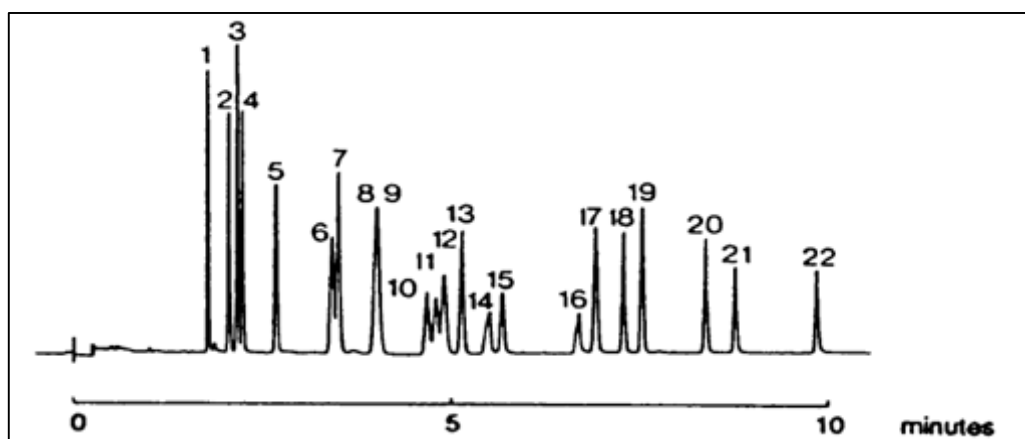


Figure 8 : chromatogramme d'un mélange contenant au moins 22 constituants

II.3 Description de l'appareillage

II.3.1 Gaz vecteur

Le gaz porteur (ou gaz vecteur), est la phase mobile, dynamique de la chromatographie en phase gazeuse. C'est dans son flux que l'on injecte le mélange à analyser, et c'est lui qui le véhicule jusqu'au détecteur à travers toute la colonne.

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. Le choix du gaz vecteur est en grande partie lié à la nature du détecteur utilisé : hydrogène ou azote avec un détecteur à

conductibilité thermique (catharomètre), azote ou hélium avec un détecteur à ionisation de flamme, azote ou mélange argon-méthane avec un détecteur à capture d'électrons.

II.3.2 Injecteur

Le système d'injection va permettre d'introduire et de rendre volatil l'échantillon à analyser. L'injection peut se faire d'une manière manuelle ou automatique à l'aide d'un échantillonneur. Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant le type de colonne auxquelles ils sont reliés.

a) Injection par vaporisation directe

Le système le plus courant est l'injecteur à septum représenté ci-dessous. Il s'agit d'un tube métallique, doublé d'un chemisage de verre (insert), balayé par le gaz vecteur et chauffé à une température supérieure de 20 à 30 °C au point d'ébullition du constituant le moins volatil du mélange analysé de façon à permettre une vaporisation immédiate de tous les constituants du mélange.

L'une des extrémités de l'injecteur est obturée par une pastille d'élastomère siliconé nommée septum pour permettre le passage de l'aiguille de la micro-seringue qui contient l'échantillon à injecter et l'autre est reliée à la colonne. La totalité de l'échantillon injecté est transféré dans la colonne.

L'introduction du mélange se fait par l'intermédiaire d'une micro-seringue dont le volume varie généralement de 1 à 10 μL et dont l'aiguille a un diamètre de l'ordre de 0,15 mm.

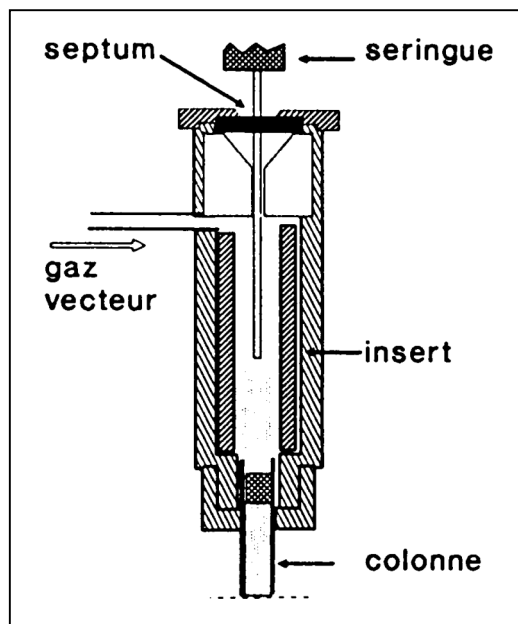


Figure 9 : Injecteur à Septum

b) Injection « split/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. Ce mode est utilisé dans le cas des colonnes capillaires à faible débit.

En mode splitless l'échantillon est vaporisé et mélangé dans le gaz porteur, mais le mélange n'est pas divisé en deux parties. Il reste quelques secondes dans le liner avant d'être transféré sur la colonne (environ 95 % du produit). Le 5 % restant est évacué par l'ouverture de la vanne de fuite. Cette méthode est utilisée quand l'échantillon à analyser est très dilué et éventuellement très sale (contenant des résidus non-volatils).

II.3.3 Four

Le four est une enceinte thermostatée dans lequel se trouve la colonne. Il permet une programmation de température ajustable de 20 °C (–100 °C pour certains systèmes) à 450 °C et qui est également équipé d'un système de refroidissement rapide. La programmation de la température du four est un facteur essentiel à l'obtention d'une bonne séparation avec une durée d'analyse acceptable.

II.3.4 Colonne

Elle peut faire plus de 50 mètres, sur laquelle les différentes molécules de l'échantillon injecté vont se séparer suivant leurs affinités avec la phase stationnaire.

La colonne est placée dans un four pour maintenir une température suffisante afin de garder les solutés en phase gazeuse pendant l'analyse.

On distingue les colonnes remplies classiques et les colonnes capillaires.

a) Colonnes remplies : il s'agit de colonnes de métal ou de verre (inerte vis à vis des composants à analyser) de quelques mm de diamètre, de 1 à quelques mètres de longueur (en enroulement spiral).

Chaque colonne est remplie du support granuleux désiré :

- silice si CPG d'adsorption, par exemple ;
- polyéthylène glycol imprégnant de la silice en CPG liquide, par exemple.

b) Colonnes capillaires : les colonnes se présentent sous forme d'un capillaire dont la surface interne porte un fin film de phase stationnaire. Le diamètre interne est de 0,1 à 0,6 mm ; l'épaisseur de film de phase stationnaire est de 0,2 à 0,5 µm ; la longueur dépasse 10 m, atteint généralement 50 m.

La colonne est présentée en un enroulement spiral. La phase stationnaire ou l'adsorbant est déposé sur la paroi interne de la colonne. La faible quantité de phase stationnaire permet des analyses rapides mais impose l'injection d'une quantité très faible d'échantillon.

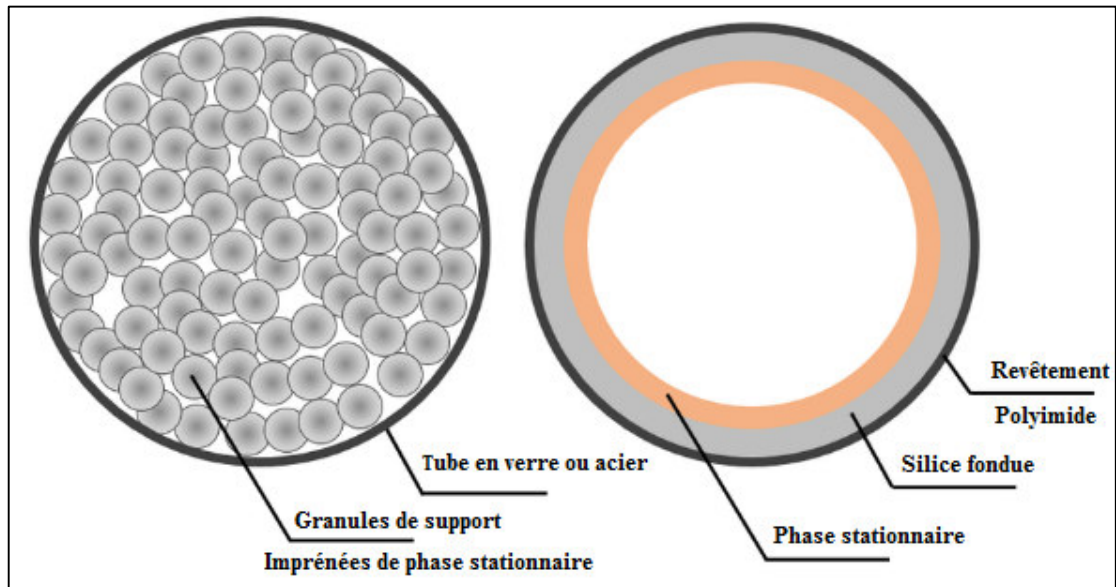


Figure 10 : Vue en coupe d'une colonne remplie (gauche) et d'une colonne capillaire (droite).

II.3.5 Détecteur

Le système de détection va permettre de mesurer le signal émis par les différentes molécules et de pouvoir les identifier. Pour l'enregistrement du signal émis par le détecteur, des logiciels sur PC remplacent avantageusement les enregistreurs analogiques sur papier.

Il existe plusieurs types de détecteurs dont deux utilisés le plus couramment.

- a) **Détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) :** ce fut le détecteur le plus répandu aux débuts de la chromatographie en phase gazeuse. Son principe repose sur le fait que la résistance d'un métal parcouru par un courant d'intensité constante varie lorsqu'il est soumis à un gradient de température

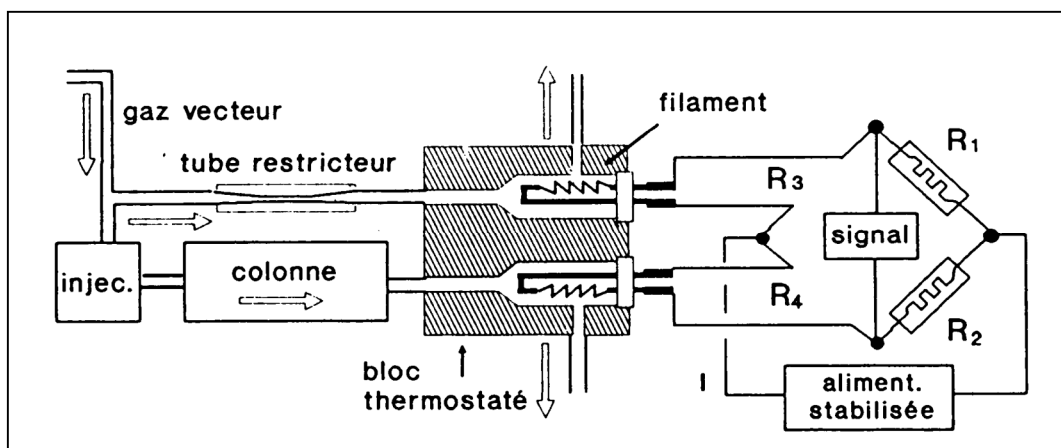


Figure 11 : détecteur à conductibilité thermique

- b) **Détecteur à ionisation de flamme (FID)** : c'est le détecteur le plus utilisé en CPG. Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans un petit brûleur dont la flamme est alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. La combustion des composés organiques élués produit des ions qui sont collectés au moyen de deux électrodes. Le courant très faible qui en résulte est transformé en une tension qui est enregistrée.

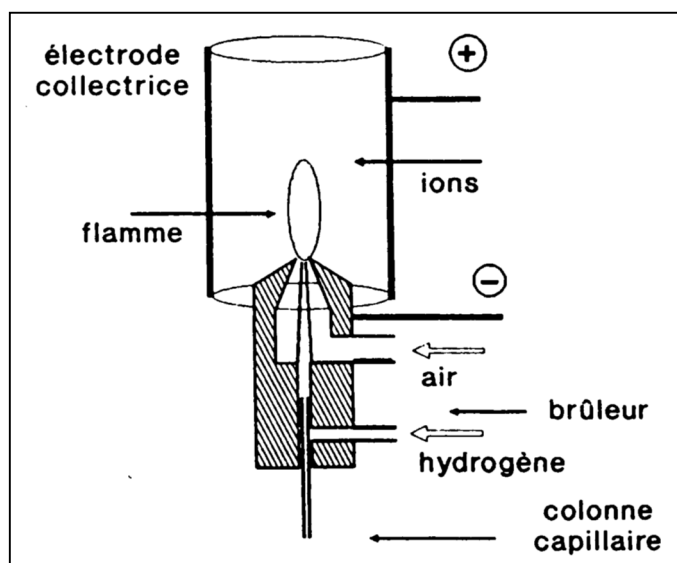


Figure 12 : Détecteur à ionisation de flamme

c) 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 partir du spectre de fragmentation ou par comparaison avec bibliothèque de spectre.

d) Autres détecteurs

Il existe d'autres types de détecteurs, comme le détecteur thermoionique (NPD) spécifique des composés azotés et phosphorés, celui à capture d'électrons (CED) particulièrement sensible aux composés halogénés et celui à photométrie de flamme spécifique des composés contenant du soufre et du phosphore. Habituellement, on fixe la température du détecteur sensiblement à la même valeur que celle de l'injecteur.

II.4 Facteurs dont dépend la séparation

II.4.1 Température

Généralement, si les constituants du mélange à séparer ont des polarités voisines, les composés les plus volatils sont les plus rapidement entraînés. Si la température de la colonne est trop basse, la vitesse d'échange entre la phase stationnaire et le gaz vecteur est lente, la diffusion devient importante, le temps de rétention de certains composés trop long et les pics correspondants sont dissymétriques ou déformés. Si la température de la colonne est trop élevée, l'équilibre de chaque constituant entre les deux phases mobile et stationnaire n'a pas le temps de s'établir et tous les constituants apparaissent à la sortie de la colonne en même temps. 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. Un programmeur électronique, mis en route à l'injection, fait varier la température du four selon un profil choisi.

II.4.2 Débit du gaz vecteur

Il doit être tel que les différents 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. S'il est trop lent, les pics perdent leur finesse par suite d'une diffusion trop importante des constituants dans le gaz vecteur. Quand le débit est bien réglé, on a intérêt à augmenter la température du four pour améliorer la finesse des pics (voir exemple ci-dessus).

II.4.3 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. 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.4.4 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.

Ce liquide doit être chimiquement inerte vis à vis des composants du mélange à séparer. De plus, on ne doit l'utiliser que dans les limites de températures pour lequel il est prévu : si la température devient trop basse, la phase stationnaire devient visqueuse, ce qui diminue considérablement la vitesse d'échange entre le gaz vecteur et la phase stationnaire ; si la température devient trop élevée, il y a perte de la phase stationnaire par vaporisation. Le principe général qui doit servir de guide au choix de la phase stationnaire est le suivant : les structures de polarités voisines ont des affinités entre elles. Ainsi, pour séparer des substances polaires, on utilise une phase fixe polaire car ces substances sont fortement retenues par la phase fixe ; dans ce cas, l'ordre de sortie des composés d'une série homologue est l'ordre croissant de leur point d'ébullition. Si des composés peu polaires se trouvent dans le mélange analysé, ils sont peu retenus par la phase stationnaire polaire et sont élués avant les composés polaires ayant même point d'ébullition. Si la phase stationnaire est apolaire, c'est l'inverse qui se produit : les composés non polaires sont bien retenus et sont élués selon l'ordre de leur point d'ébullition croissant dans une série homologue et un composé polaire est élué avant un composé non polaire ayant même point d'ébullition.

II.5 Application de la CPG

L'utilisation de cette technique s'est largement répandue dans un grand nombre d'industries donnant lieu à des applications analytiques très diverses :

✓ Contrôle analytique pharmaceutique en industrie

- Contrôle des matières premières / impuretés, solvants résiduels,
- Contrôle en cours de fabrication de l'intégrité de la molécule,
- Contrôle du produit fini / teneur,
- Etude de stabilité dans le temps / produits de dégradation

✓ Dosage en milieux biologiques (extraction et purification)

- Etudes de biodisponibilité,
- Etudes métaboliques (identification /SM),
- Suivi thérapeutique au cours d'un traitement,
- Dosage biochimiques.
- ✓ **Dosage en toxicologie**
 - Recherche de toxique en intoxication aiguë (méthanol, EG...),
 - Dosage des drogues : amphétamines, opiacés, cannabinoïdes,
 - Contrôle anti-dopage,
 - Dépistage de toxicomanie
- ✓ **Agroalimentaire**
 - Recherche et dosage des pesticides,
 - Recherche et dosage et des nitrosamines (nitrites)
- ✓ **Industrie chimique, cosmétologie**
 - Analyse des essences, parfums, arômes, hydrocarbures.

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.

III. Chromatographies liquides sur colonne

III.1 Chromatographie classique sur colonne

III.1.1 Généralités

La chromatographie sur colonne est une méthode préparative, elle permet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes (50 mg à environ 20 g en laboratoire, et jusqu'à 1 kg en industrie.)

III.1.2 Description et principe

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

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant.

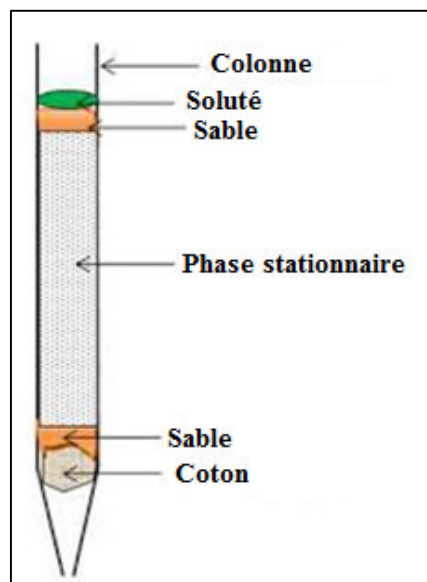


Figure 13 : Schéma d'une colonne chromatographique

III.1.3 Facteurs dont dépend la séparation

Quatre facteurs interviennent : l'adsorbant, l'éluant, la dimension de la colonne et la vitesse d'élution

1) Adsorbant

Le plus utilisé est l'**alumine** (Al_2O_3), cependant, on la limitera aux composés organiques stables car, sous sa forme basique, elle peut provoquer la déshydratation des esters par exemple.

Le gel de silice (SiO_2) se présente sous forme d'une poudre blanche utilisée en particulier pour la séparation des composés qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être traités par l'alumine.

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

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

Les adsorbants figurant dans la liste ci-dessous sont classés selon l'ordre croissant de leurs forces d'interactions avec des composés polaires :

- Cellulose, papier
- Kieselguhr, terre de diatomée.
- Amidon.
- Sucre.
- Talc.
- Carbonate de sodium.
- Oxyde de magnésium.
- Gel de silice.
- Alumine.
- Charbon activé.

En général, plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires.

2) Eluant

L'éluant est en général un mélange de deux solvants. Au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les substances les moins retenues par l'adsorbant (les moins polaires) tout en recherchant un $R_f \sim 0.3$ pour le produit le moins polaire. Ensuite on fait varier la composition de l'éluant en additionnant graduellement le solvant le plus polaire. Ainsi les composés les plus polaires, retenus sur l'adsorbant, ne migreront que graduellement vers le bas de la colonne.

La polarité de l'éluant peut rester la même tout au long de la chromatographie (élution isocratique)

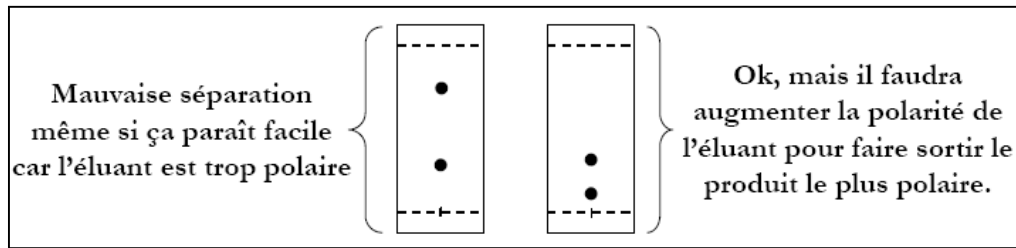


Figure 14 : le bon choix de l'éluant

3) Dimension de la colonne

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

4) Vitesse d'éluion

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

III.1.4 Remplissage de la colonne

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

✓ Remplissage par voie humide

On prépare dans un bécher un mélange homogénéisé de l'adsorbant et du moins polaire des solvants utilisé pour le développement en ajoutant par petites quantités l'adsorbant dans le solvant pour obtenir une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement.

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

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

✓ **Remplissage par voie sèche**

La colonne est remplie au deux tiers par le moins polaire des deux solvants et l'adsorbant en poudre est ajouté en portions successives dans la colonne à l'aide d'un entonnoir, pendant l'addition, on frappe continuellement sur les parois pour obtenir un tassement maximal. Quand la première portion forme une couche d'environ 2 cm, on ouvre le robinet pour faire couler lentement le solvant. On termine comme précédemment.

✓ **Dépôt des produits à analyser**

Il s'effectue robinet fermé, à la pipette pasteur de façon homogène sur les bords de la colonne, le plus bas possible. Il doit former une zone cylindrique étroite dans le haut de la colonne.

Choix du solvant ? Si possible, éluant de départ le plus petit volume possible

Le dépôt doit ensuite être absorbé intégralement avant l'ajout du solvant d'éluion.

Deux possibilités s'offrent à vous si le produit brut est solide :

- Le solubiliser dans l'éluant et l'ajouter tel que décrit précédemment.
- Faire une imprégnation sur silice : mélanger le produit en solution avec ~ 5 fois sa masse de silice. Évaporer à sec et additionner ce solide sur le haut de la colonne avant de mettre le sable. On utilise souvent cette technique si le produit brut n'est pas soluble dans l'éluant choisi.

III.1.5 Elution

L'éluion doit être continue, on peut alimenter la colonne en continue à l'aide d'une ampoule de coulée ou bien ajouter manuellement l'éluant. Veiller à ce que la surface de l'adsorbant ne soit jamais au contact de l'air car une colonne laissée à sec se détériore : la séparation sera vouée à l'échec à cause des fissures.

Si on utilise un gradient d'éluant, il faut laisser écouler le premier solvant avant de rajouter le deuxième.

Pour la plupart des opérations, une vitesse de 5 à 50 gouttes à la minute convient (la limite inférieure correspond aux séparations difficiles). Le volume de chaque fraction recueillie varie de 1 à 50 mL selon les cas. On collecte les fractions et on les analyse par CCM.

Déposer une micro-goutte de chaque fraction sur une CCM.

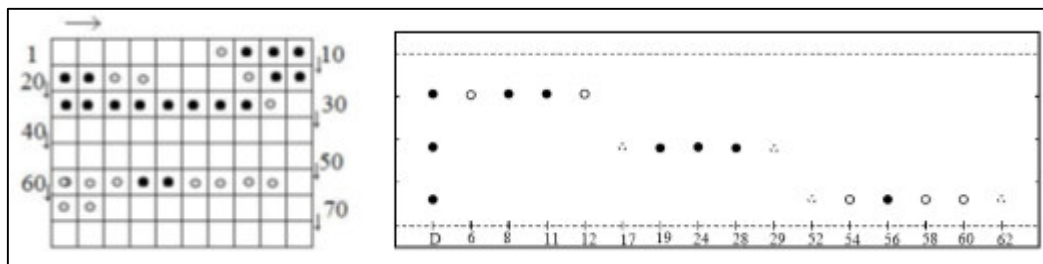


Figure 15 : analyse des fractions d'une colonne par CCM

Lorsque l'analyse des fractions est terminée, on réunit celles qui correspondent à des produits identiques, en prenant soin d'éliminer celles qui correspondent à des recouvrements de zones (**figure 14**). Les substances obtenues de cette façon sont généralement d'une très grande pureté. Il existe maintenant des systèmes automatisés où la colonne est pré paquetée, le gradient est programmé, et l'appareil collecte des fractions. L'interface nous donne directement les fractions qui contiennent un chromophore. Il reste juste à faire les CCM et évaporer.

III.1.6 Applications

La chromatographie sur colonne classique est beaucoup utilisée pour purifier des produits de synthèse organique et aussi pour séparer les composants d'extraits de plantes (phytochimie).

Elle 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.

La chromatographie sur colonne moderne a résolu les problèmes rencontrés, elle met par ailleurs en jeu un matériel plus sophistiqué.

III.2 Chromatographie liquide haute performance (CHLP)

III.2.1 Généralités

La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) — HPLC en anglais (high performance liquid chromatography) — initialement chromatographie liquide à haute pression, est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier.

Elle correspond à une évolution de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

Elle utilise des colonnes remplies d'une phase stationnaire constituée de particules sphériques de très petites dimensions de diamètre couramment compris entre 2 et 5 μm en utilisant des pompes très performantes pour maintenir un débit d'éluant suffisant et constant à travers la colonne, ce qui conduit à de grandes efficacité et résolution.

III.2.2 Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant), suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans la colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic chromatographique.

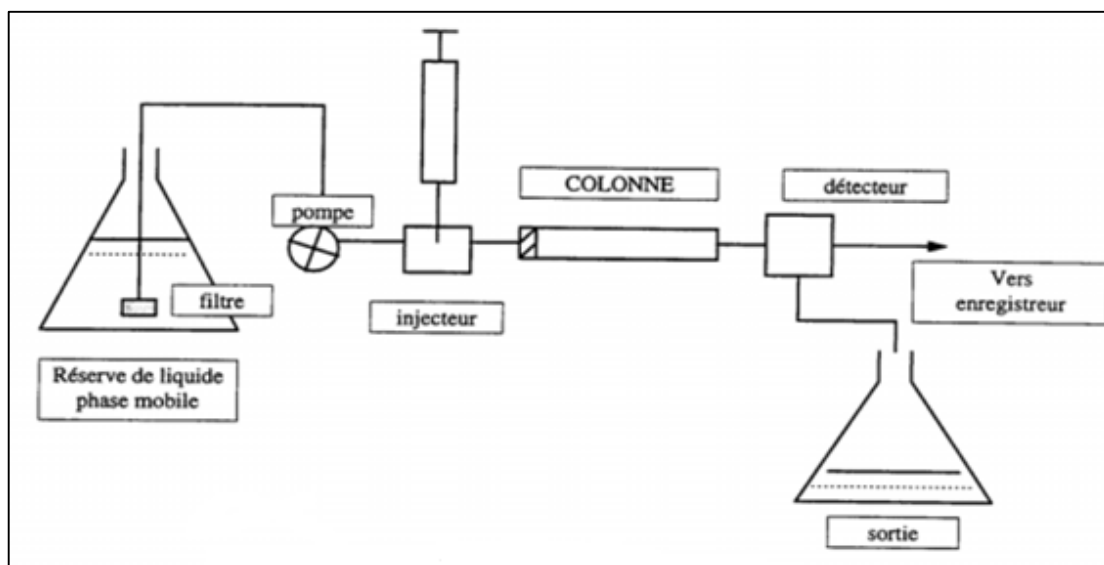


Figure 16 : principe de fonctionnement de l'HPLC

III.2.3 Description de l'appareillage

U appareil de HPLC comporte quatre parties : système de pompage, injecteur, colonne et détecteur à travers lesquels un liquide entraine les substances d'un mélange à séparer.

1) Un réservoir de solvant (éluant)

Les appareils sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs contenant chacun une quantité suffisante la phase mobile. Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles

pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

2) Dégazeur

Comme son nom l'indique, ce composant permet de retirer le gaz (oxygène) présent dans le(s) solvant(s) afin d'éviter d'endommager les échantillons ou la phase stationnaire. Deux types de dégazeurs sont utilisés en HPLC :

- **Dégazeur à gaz inerte** : On fait barboter un gaz inerte dans la PM (Phase Mobile) pour retirer le gaz dissous dans le liquide. L'hélium est le gaz inerte le plus utilisé pour cette application.
- **Dégazeur par vide** : Cette méthode consiste à descendre en pression dans une enceinte où se trouve le solvant à l'aide d'une pompe à vide primaire, et ainsi séparer le gaz dissous dans le fluide. Elle est bien plus efficace, ne requiert plus de gaz inerte, et remplace de plus en plus l'ancienne technique dans le domaine de l'analyse HPLC. La pression dans l'enceinte est de l'ordre du millibar.

3) La pompe

C'est la partie qui sert à stocker l'éluant et à l'injecter sous pression dans la colonne.

Les pompes demeurent la partie la plus délicate de l'appareillage car elles doivent répondre à des critères rigoureux :

- Obtention de pressions pouvant aller jusqu'à 420 bars,
- Débit compris entre 0,1 et 10 mL.min⁻¹ et le plus régulier possible,
- Résistance à la corrosion quel que soit le solvant utilisé ...

Les pompes les plus utilisées comportent deux pistons, ce qui permet de régulariser le débit. Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler :

- **En mode isocratique**, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- **En mode gradient**, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

4) L'injecteur

L'injecteur le plus courant est une vanne d'injection à boucle représenté ci-dessous (figure 17).

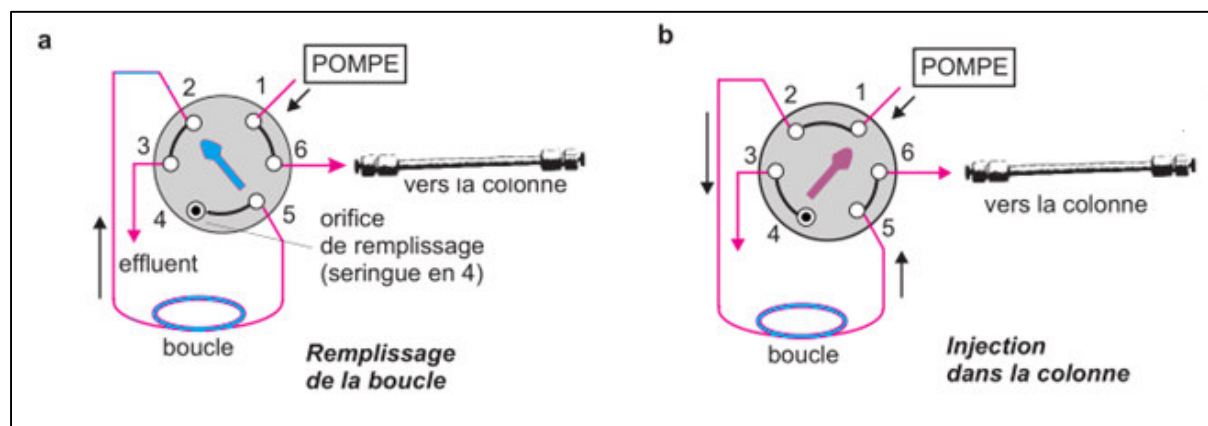


Figure 17 : injecteur à boucle.

Dans la position remplissage : la vanne fait communiquer la pompe et la colonne. L'échantillon, en solution, est introduit à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle.

Dans la position injection : après rotation de la vanne, la phase mobile entraine l'échantillon en tête de colonne. L'injection doit se faire en un temps très bref afin de perturber le moins longtemps possible le régime établi dans la colonne et le détecteur. Il faut introduire en tête de colonne, sans stopper la circulation de la phase mobile, un volume précis d'échantillon (compris entre 5 et 500 μL), là où la pression dépasse souvent 104 kPa.

5) La colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. La phase stationnaire est maintenue entre deux disques poreux situés aux extrémités. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.



Figure 18 : colonne de chromatographie HPLC

Il existe des micro-colonnes d'une longueur de 5 cm et d'un diamètre de 0,3 mm pour lesquelles le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Ces colonnes ont l'avantage de consommer très peu d'éluant et de conduire à une meilleure résolution.

6) Le détecteur

Le détecteur doit fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de la composition de l'éluant à la sortie de la colonne, ce qui permet de détecter le passage des composés successifs. Aucun détecteur n'est universel, mais un bon détecteur doit réunir les qualités suivantes :

- Donner une réponse proportionnelle à la concentration instantanée pour un même composé - être sensible
- Avoir une faible inertie - être stable dans le temps
- Avoir peu de bruit de fond

Il existe plusieurs types de détecteurs dont les plus courants sont cités ci-dessous.

➤ **Détecteur spectrophotométrique**

Les détecteurs spectrophotométriques peuvent faire une détection monochromatique (détecteur UV avec lampe au deutérium) ou polychromatique (détecteur à barrette de diodes ce qui permet d'obtenir des renseignements spectraux pouvant servir à l'identification des composés). On mesure en permanence l'absorbance de la phase mobile à la sortie de la colonne à une ou plusieurs longueurs d'onde dans l'UV/visible. Pour pouvoir repérer les solutés, il faut qu'ils absorbent et que la phase mobile n'absorbe elle-même pas ou très peu. L'absorbance d'un composé est proportionnelle à sa concentration à condition que celle-ci reste faible (loi de Beer Lambert).

➤ **Détecteur spectrofluorimétrique**

Certains composés sont fluorescents et l'intensité de la fluorescence d'un composé est proportionnelle à sa concentration à condition que celle-ci reste faible.

➤ **Détecteur réfractométrique**

Son principe est basé sur la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent à la sortie de la colonne. C'est un détecteur assez peu sensible et qui doit être thermostaté ainsi que la colonne car sa réponse est très sensible aux variations de température.

Il ne peut être utilisé qu'en mode isocratique car la variation de la composition de l'éluant au cours de l'analyse entraîne une dérive de la ligne de base. Il conduit à des pics soit négatifs soit positifs, ce qui implique un réglage de la ligne de base à mi-hauteur du graphe.

III.2.4 Interaction moléculaire entre phase mobile et soluté

En chromatographie en phase liquide les principales interactions qui régissent les mécanismes de rétention et d'éluion de solutés sont, en fonction de l'énergie mise en jeu, liées à d'interactions diélectriques, de liaisons de type hydrogène ou de liaisons de Van der Waals.

1) Force éluante et polarité

- **La phase stationnaire**

- **La phase normale** : est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.
- **La phase inverse** : est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

- **La phase mobile**

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

- Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;
- Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés.

Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'éluion est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'éluion en

diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution).

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile.

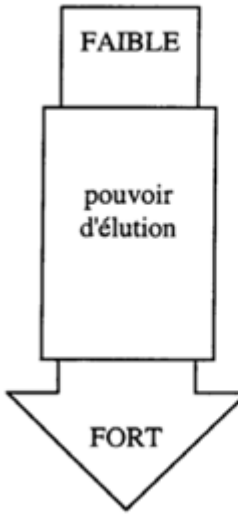
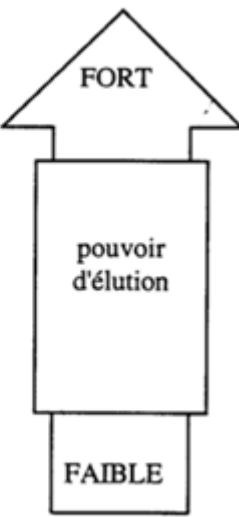
phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

Figure 19 : pouvoir d'élution de la phase mobile en HPLC

2) Polarité selon Snyder

Les solvants dont les interactions avec le soluté sont importantes sont souvent appelés solvants forts ou solvants polaires. L'indice de polarité de Snyder est le plus utile en chromatographie de partage pour décrire quantitativement la polarité d'un solvant. Ce paramètre est basé sur des mesures de solubilité de la substance étudiée dans trois solvants : le dioxane (accepteur de protons à faible moment dipolaire), nitrométhane (accepteur de protons à moment dipolaire élevé) et l'alcool éthylique (donneur de proton à moment dipolaire élevé). L'indice de polarité est donc une mesure numérique des polarités relatives de différents solvants.

La polarité globale d'un mélange de trois solvants sera : $P' = \log K_1 + \log K_2 + \log K_3$

En normant : $x_1 + x_2 + x_3 = 1$

Alors : $x_1 = \log K_1 / P'$

III.2.5 Mécanismes d'interaction avec la colonne

Selon la nature de la phase stationnaire (c'est-à-dire le phénomène physico-chimique sur lequel est basée la séparation proprement dite) on peut distinguer les **mécanismes** suivants :

chromatographie d'adsorption, chromatographie de partage, chromatographie par échange d'ions et chromatographie par exclusion de taille.

1) Chromatographie d'adsorption

• L'adsorption

L'adsorption est un phénomène de surface par lequel des molécules se fixent sur la surface d'un adsorbant, selon divers processus plus ou moins intenses. Pour que cette adsorption soit utilisable à des fins préparatoires, il faut que cette fixation soit réversible.

Le phénomène inverse, par lequel les molécules adsorbées sur une surface s'en détachent se nomme la désorption.

• La chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption est la plus ancienne méthode de chromatographie (TWSETT, 1906). Elle s'applique à la plupart des composés organiques de masses molaires inférieures à 3000 et ceci d'autant mieux que ces masses sont plus élevées.

Cette chromatographie liquide-solide est basée sur la répartition des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et à une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

• Les adsorbants

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 naturellement souhaitable car elle permet d'obtenir de meilleures séparations tout en diminuant la longueur des colonnes (important en CL).

L'adsorbant doit être pratiquement insoluble dans les solvants et éluant utilisés d'une part et présenter, d'autre part, une inertie chimique vis-à-vis des solutés.

L'origine des adsorbants est très diverse. Les **poudres de charbon** végétal ou animal sont parfois utilisées mais elles présentent un trop grand pouvoir adsorbant. C'est parmi les oxydes, les hydroxydes et les sels minéraux insolubles que l'on trouve la plus grande majorité des adsorbants. Ceux que l'on emploie le plus couramment sont :

- **La silice** (SiO_2). Souvent désignée aussi sous le terme de gel de silice (silice plus ou moins hydratée (4% H_2O), provenant de la déshydratation de l'acide silicique). Elle se présente sous forme d'une poudre blanche de très fines granulométries.

Le mécanisme de rétention sur cet adsorbant est maintenant admis comme résultant de la présence, à sa 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.

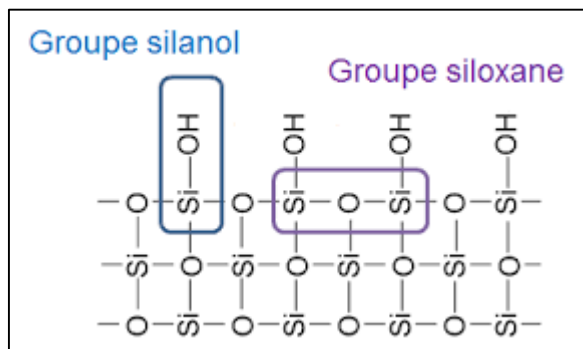


Figure 20 : représentation du gel de silice

- **L'alumine** (Al_2O_3). Elle s'obtient par déshydratation de l'hydroxyde ($\text{Al}(\text{OH})_3$). Selon sa préparation, elle renfermera un certain nombre de molécules d'eau liées ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$).

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.

A côté de ces adsorbants, on peut encore citer les sels de calcium (phosphates et carbonates), les oxydes de magnésium, les silicates de magnésium ainsi que des adsorbants organiques tels que l'urée, polyamide, saccharose et dérivés du polystyrène.

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.

- **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.

2) Chromatographie de partage

• Principe

La chromatographie de partage est la technique de chromatographie liquide, la plus utilisée. Elle fonctionne par partage de solutés entre deux phases non miscibles l'une mobile et l'autre stationnaire.

La phase stationnaire peut-être un film liquide imprégné sur un support en principe inerte (la silice perd ses propriétés adsorbantes par saturation des sites d'adsorption) mais il a tendance à être emporté avec la phase mobile ("lessivage", "bleeding"), ou une phase organique fixée par liaison chimique covalente sur un support (phase greffée).

Il s'établit un équilibre qui dépend de la solubilité relative du soluté dans les deux solvants donc du coefficient de partage.

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

Ce mécanisme est surtout utile pour la séparation de molécules très polaires de masses molaires inférieures à 3000 et aux homologues d'une même série, mal séparés par chromatographie d'adsorption.

• Support

Les supports sont inertes vis-à-vis des composés à séparer. Ils ne servent qu'à immobiliser, par adsorption ou formation de liaisons chimiques covalentes, la phase stationnaire liquide.

Ce sont des solides très finement divisés qui présentent une très grande surface afin de retenir, sous un petit volume, une grande quantité de phase stationnaire. Il est nécessaire que leurs rétention soit énergétique et qu'ils ne réagissent pas avec le soluté. Leurs propriétés d'adsorption doivent être totalement masquées.

Les phases stationnaires décrites en chromatographie d'adsorption peuvent être utilisées comme support.

• Types de chromatographie de partage

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

✓ Chromatographie de partage sur phase normale

La phase stationnaire est polaire, de nature hydrophile, avec des groupements : amine : NH_2 , nitrile : CN , dialcool : $(\text{CHOH})\text{CH}_2\text{OH}$, greffés sur la silice.

La phase mobile est un solvant apolaire, de nature lipophile, l'hexane ou l'éther isopropylique $(\text{CH}_3)_2\text{CHOCH}(\text{CH}_3)_2$. 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'élution.

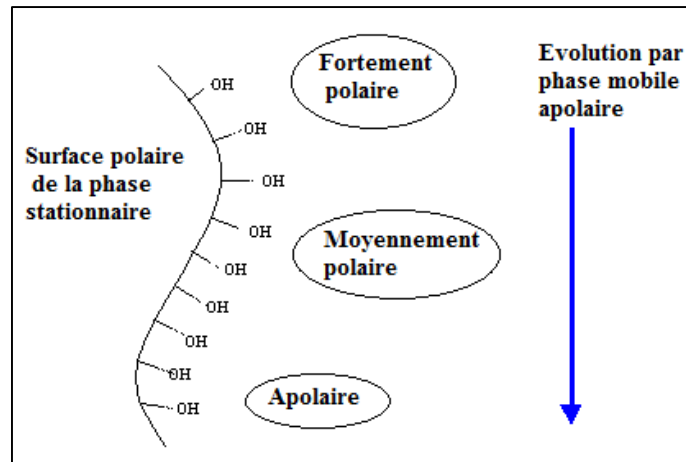


Figure 21 : chromatographie de partage sur phase normale

✓ Chromatographie de partage sur phase inversée

C'est la phase stationnaire, constituée souvent d'un hydrocarbure qui est apolaire, de nature lipophile avec des chaînes alkyles de C_4 à C_{30} , des groupements propyle, phényle ou diphényle. La phase mobile est un solvant polaire, tel l'eau, le méthanol, ou le cyanure de méthyle (acéto nitrile). 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'élution.

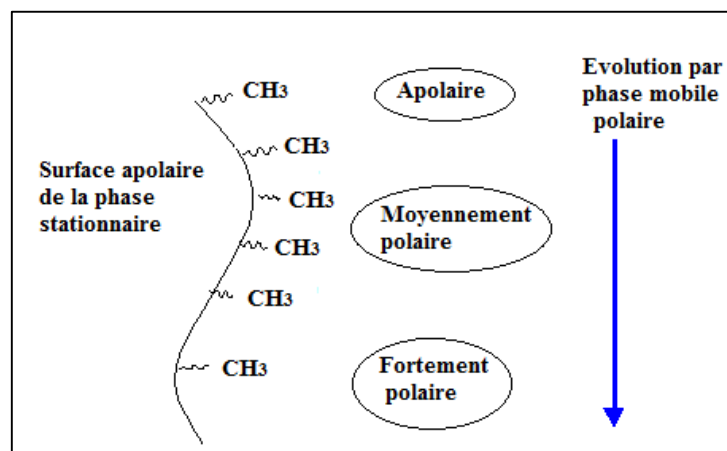


Figure 22 : chromatographie de partage sur phase inverse

3) chromatographie d'exclusion sur gel

- **principe**

La chromatographie d'exclusion, ou gel filtration ou gel perméation est fondée sur la “rétention” des molécules de soluté en fonction de leur taille en raison de leur pénétration dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée. Si on suppose que les molécules de soluté ne présentent aucune affinité pour les parois de la phase stationnaire particulière, les grosses molécules ne pourront pas pénétrer dans les pores, elles migreront plus rapidement que les petites molécules qui peuvent, quant à elles, pénétrer dans un plus grand nombre de pores. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

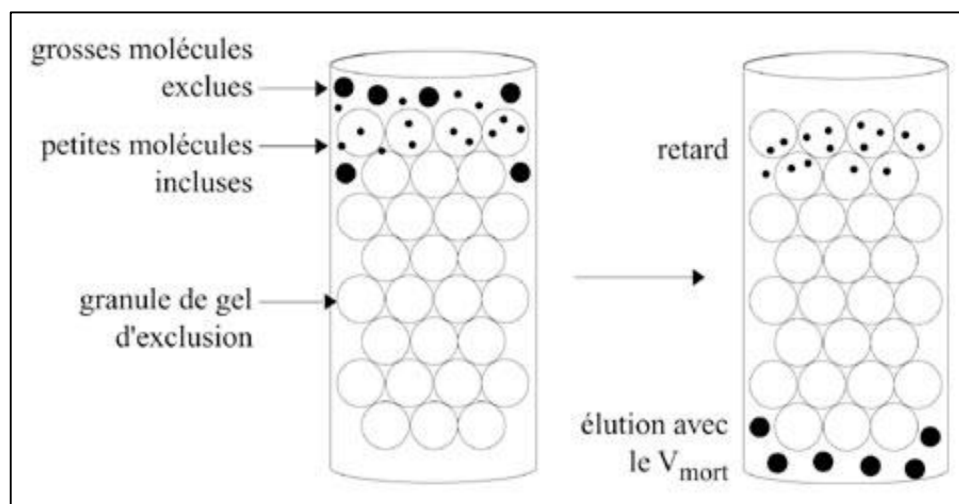


Figure 23 : la chromatographie d'exclusion stérique

- **La phase stationnaire**

La phase stationnaire est généralement un polymère poreux dont les pores ont des dimensions choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer.

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.

On distingue les gels mous, semi-rigides et rigides :

- **Les gels mous** : 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. Ils s'utilisent principalement avec des solutions aqueuses (chromatographie de filtration sur gel). Il s'agit le plus souvent de dextrane rendu insoluble dans l'eau par réaction à

l'épichlorhydrine. Il existe des gels dont le polymère est du polyacrylamide et des gels mixtes composés d'acrylamide et de dextrans.

- **Les gels semi rigides** : ils sont produits par polymérisation, ce sont des dérivés du vinylbenzène en présence d'agent réticulant. On les utilise principalement avec des solvants organiques : gels de polystyrène, ce type de gel possède des propriétés remarquables et ne gonfle pratiquement pas, il peut être utilisé dans la plupart des solvants sauf : l'eau, les alcools, l'acétone, l'acide formique. Il est utilisable en haute pression.
- **Les gels rigides** : Ils sont constitués par des silices poreuses ou des verres poreux. Ils ont évidemment des sites d'adsorption (groupements hydroxyles) qui peuvent retarder excessivement les espèces polaires. On modifie alors chimiquement la silice.
- **La phase mobile**

En chromatographie d'exclusion sur gel, le choix de la phase mobile ne s'effectue plus selon la polarité du solvant comme dans le cas de la chromatographie de partage et celui de la chromatographie d'adsorption. En effet, la phase mobile doit surtout être capable de dissoudre l'échantillon et être suffisamment semblable à la phase stationnaire afin de la mouiller 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.

Dans le cas idéal, la phase mobile, le solvant piégé et le gel doivent interagir de manière identique avec les molécules du soluté, ainsi, on peut être sûr que son déplacement dans les pores ne se fait que par diffusion. Il faut aussi que le solvant soit compatible avec l'appareillage et le détecteur si l'on en fait usage directement.

4) La chromatographie sur échangeurs d'ions

- **Principe**

La chromatographie à échange d'ions (ou chromatographie à ions ou chromatographie échangeuse d'ions) est un type de chromatographie en phase liquide permettant d'isoler une substance chargée électriquement d'un mélange de molécules chargées (liquide).

La séparation des composés est assurée dans tout système chromatographique par la phase stationnaire qui, dans le cas de la chromatographie ionique (CI) est une résine échangeuses d'ions. Cette phase stationnaire est un support solide comportant des groupes fonctionnels ionisés chargés soit positivement (pour séparer les anions) soit négativement (pour séparer les cations). L'éluant emporte les anions ou les cations à séparer. Selon que l'interaction

électrostatique entre la résine de la colonne et les ions à séparer est plus ou moins forte, la séparation se fera plus ou moins facilement.

- **La phase stationnaire**

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

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 :

- **Les échangeurs de cations** portent des groupements chargés négativement (-). Le groupement négatif, habituellement la base conjuguée d'un acide (carboxylique ou sulfonique), est lié à la résine (souvent un polymère organique) de façon covalente et est en général sous forme protonnée avant utilisation (c'est donc le cation H^+ qui est alors échangé). L'échange se fait suivant l'équation

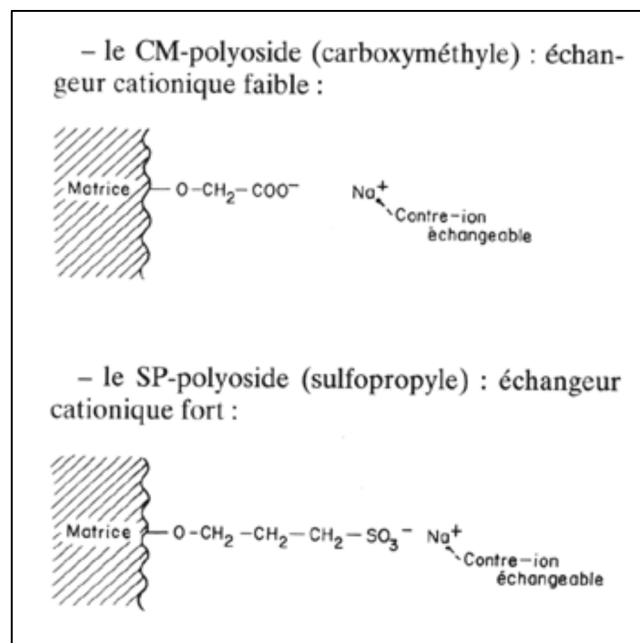
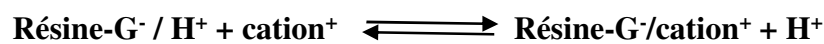


Figure 24 : échangeurs cationiques

- **Les échangeurs d'anions** portent des groupements chargés positivement (+). Le groupement positif, habituellement une amine ou un ammonium est lié à la résine

(souvent un polymère organique) de façon covalente. L'échange se fait suivant l'équation

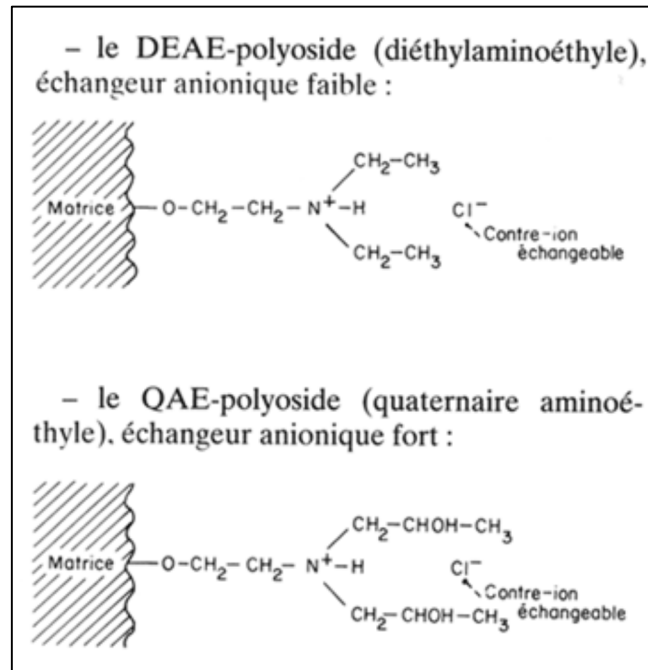
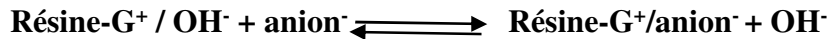


Figure 25 : échangeurs anioniques

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

- Les groupements sont dit **forts** car leur capacité d'échange est constante et indépendante du pH (ex : résine cationique SO_3^- acide sulfonique, résine anionique $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ammonium quaternaire)
- les groupements **faibles** ne sont pas ionisés à un certain pH (ex : résine cationique COO^- groupement carboxylique, résine anionique NH_3^+ amine primaire)

- **Support**

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

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

- **La phase mobile**

La plupart des séparations utilisant les résines échangeuses d'ions s'effectuent avec une solution aqueuse en raison des propriétés de solubilisation et d'ionisation de l'eau.

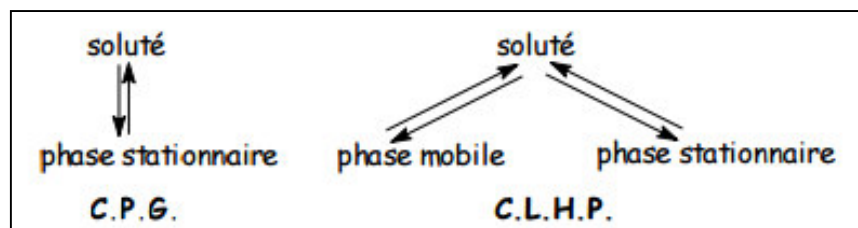
Toutefois, il peut être nécessaire d'utiliser des mélanges de solvants polaires (méthanol-eau) afin d'optimiser une élution ou faciliter la solubilité de certains solutés.

L'élution est assurée par déplacement des équilibres : soit par la présence d'un ion ayant plus d'affinité pour la résine, soit par l'élévation des concentrations en ions H^+ ou OH^- , soit, dans le cas des échangeurs faibles, par modification du pH qui agit ainsi sur l'ionisation aussi bien des groupements échangeables de la résine que de ceux des solutés.

III.2.6 Comparaison de (HPLC) avec la (CPG)

- **Les avantages**

- Il n'y a en CPG que des interactions du soluté avec la phase stationnaire alors qu'en CHPL il y a des interactions du soluté avec la phase stationnaire et avec la phase mobile d'où des possibilités beaucoup plus grandes.



- Les phases stationnaires sont beaucoup plus variées en CHPL qu'en CPG, en particulier on peut opérer par échange d'ions, par exclusion, alors que c'est impossible en CPG.
- La température est beaucoup moins élevée qu'en CPG, la CHPL se pratiquant le plus souvent à température ordinaire.
- La préparation de l'échantillon avant son injection est souvent plus simple qu'en CPG.

- **Les inconvénients**

- Les coefficients de diffusion dans les liquides sont 10^4 à 10^5 fois plus faibles que dans les gaz. De ce fait, la vitesse des échanges entre phase stationnaire et phase mobile est faible ce qui fait que l'on est obligé de travailler avec des vitesses lentes, ce qui explique la lenteur des séparations.
- La viscosité des liquides est environ 100 fois plus grande que celle des gaz.
- La vitesse d'échange entre le soluté et la phase mobile liquide est plus lente qu'entre le soluté et la phase stationnaire, le temps d'analyse est plus long.