

*République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de
l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

Université 20 Aout 1955 –Skikda-



Faculté des sciences

Département de chimie

*Polycopié du Cours : les méthodes de
séparation de phases et chromatographie*

Présenté Par :Dr. Boudremine Sihem

3^{ème} Année Licence : Chimie Analytique.

2022/2023

L'analyse chimique est l'ensemble de procédures permettant l'identification (analyse qualitative pour la détermination de la nature) et la quantification (dosage quantitatif) de la composition d'un échantillon. L'analyse chimique immédiate est la séparation des corps purs d'un mélange. Un procédé de séparation est une technique permettant de transformer un mélange de substances en deux ou plusieurs composants distincts. Ses buts peuvent être divers ; la purification, la concentration, le fractionnement.

Mode d'évaluation : Continu + examen

Références bibliographiques :

- 1) *Electrochimie preparative, mise en oeuvre industrielle ; Ecole du printemps du CNRS, Les Houches ; Mai (1982)*
- 2) *Pollycope : innovations en electrochimie*
- 3) *Synthetic organic electrochemistry ; A.J ; Fry*
- 4) *Industrial electrochemistry ; D. Pletcher ; Ed Chapman and Hall*
- 5) *Precis de thermodynamique et cinetique electrochimique ; J. Besson ; Ed Ellipes (1984)*
- 6) *Elements de genie electrochimique ; Coeuret et Storcks*
- 7) *A.J. Bard, Electrochimie : principes, methodes et applications, Ed Masson. Paris (1983)*
- 8) *F. Mlomandre, Electrochimie du concept aux applications, Ed Dunod-Paris (2005)*
- 9) *L'actualité chimique ; J.B ; Donnet ; janvier -fevrier 1992 N°1*

Semestre : 5

Unité d'enseignement : UEF2

Matière : Les méthodes de séparation de phases et chromatographie

Crédits : 5

Coefficient : 2.5

Objectifs de l'enseignement : *Connaissances de bases des méthodes de séparation de phases et chromatographie*

Connaissances préalables recommandées : *Bases théoriques fondamentales des méthodes de séparation de phases et chromatographie*

Contenu de la matière :

- 1) Les méthodes de séparation classiques : Extraction-Distillation- Cristallisation-Filtration-Centrifugation.
- 2) Généralités sur les méthodes chromatographiques
- 3) La chromatographie sur couche mince (CCM).
- 4) La chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- 5) La chromatographie liquide à haute performance (CLHP).
- 6) La méthode de séparation électrophorétique

Mode d'évaluation : Continu + examen

Table De Matière

Chapitre I : Le Méthodes De Séparations Classiques

INTRODUCTION.....	05
1-Definitions.....	05
2-Classification	05
3-Les Principales Techniques De Séparation Des Mélanges	06

Chapitre II : Généralité Sur Techniques Chromatographiques

1- Définition	12
2-Historique	12
3-principe	12
4-Classement des techniques chromatographiques	13
4-2- Classement selon les techniques opératoires	13
5-Choix de la technique.....	14
6-Aspect Théorique De La Chromatographie	14
6-1- le chromatogramme	14
6-2 Effet de la vitesse d'éluion sur l'efficacité de la colonne	20
7- Séparation Chromatographique	23
7-1- Chromatographie d'adsorption	24
7-2-Chromatographie De Partage	25
7-3- Chromatographie D'exclusion	25
7-4- Chromatographie Par Echange D'ions	26
7-5- Chromatographie d'Affinité	27

Chapitre III : La Chromatographie Sur Couche Mince Et Sur Papier

I- Chromatographie Sur Papier	29
2.Préparation D'échantillon	29
II-Chromatographie Sur Couche Mince (CCM) :.....	30
a)Définition et Appareillage.....	30
2-Principe De La Technique	31
3- Applications de la CCM.	32
4-Adsorbants et plaques chromatographiques	33
5- Dépôt de l'échantillon	33
6- Éluion de la CCM	34

7- Révélation de la CCM.....	34
8- Mesure du R_f	35
9- CCM bidirectionnelles	35

Chapitre IV : La Chromatographie En Phase Gazeuse (CPG)

1-Principe	38
2-Description d'un chromatographe en phase gazeuse	38
2-1 Appareillage.....	38
2-2 Choix des conditions opératoires	46
3 -Classification des phases stationnaire	49
a)Indice de Kovats et droite de Kovats	49
b)Constantes de phases stationnaires	50
4-Application.....	51

Chapitre V : La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

1.Généralités	53
2- Chromatographie classique.....	53
2-1 Description et principe	53
2-2Détection des substances éluées	54
3- Principe Général De La Chromatographie	55
4- Appareillage	56
5- Choix Du Procédé Chromatographique	62
5-1 La Chromatographie D'adsorption.....	62
5-2 La Chromatographie De Partage (Liquide-Liquide).....	62
5-3 La Chromatographie Sur Echangeurs D'ions	64
5-4 La Chromatographie D'exclusion	65
6-Application de L'HPLC	67

Chapitre VI : La Méthode De Séparation Electrophorétique

1.Definition.....	69
2. Principe	69
3. Les Différents Types D'électrophorèses	69
4.Appmication	74

Références Bibliographiques

Chapitre I : Les Méthodes De Séparation Classiques

1-DEFINITIONS :

Un mélange est une association de deux ou plusieurs substances qui n'interagissent pas chimiquement. Il peut être hétérogène ou homogène.

- **Un mélange hétérogène** :(au moins deux phases) est formé de plusieurs corps visibles les uns par rapport aux autres. Il peut être obtenu par suspension d'un solide dans un liquide ou par mélange de deux liquides non miscibles.
- **Un mélange homogène** : comprend une seule phase formée de plusieurs corps que l'on ne peut pas distinguer à l'œil nu. Il peut être obtenu par dissolution d'un solide ou un gaz dans un liquide ou par mélange de deux

2-CLASSIFICATION :

Les composants d'un mélange retiennent leurs propriétés physicochimiques propres. Pour séparer ces composants, on met à profit certaines différences de propriétés entre le composé d'intérêt et le reste du mélange (états physiques, densité, températures de changement d'état). Plus cette différence sera grande, plus la séparation sera aisée. Ainsi, Le choix de la technique appropriée varie en fonction du mélange (état physique et type), de la substance que l'on doit séparer et des phases qui constituent le mélange. Ce qui nécessite une bonne connaissance de la composition du mélange et des propriétés individuelles des différents composants.

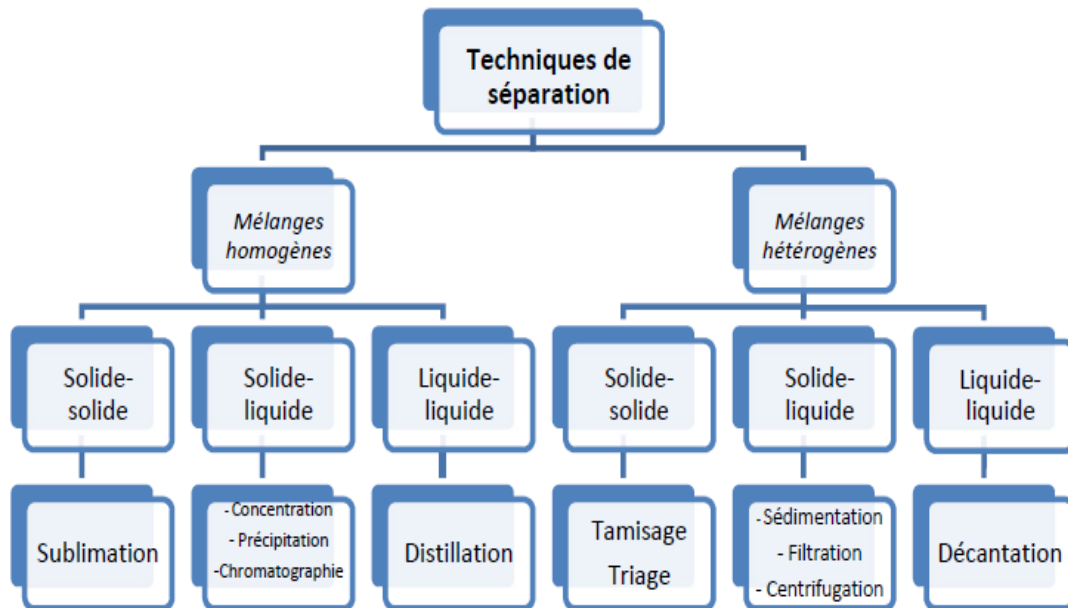


Figure 1 .

La séparation de divers mélanges fait appel à des techniques de purification/séparation variées. Cela nous procure donc l'occasion d'étudier de petites techniques. Les techniques de séparation des mélanges servent à isoler ou à séparer certains constituants des mélanges dans lesquels ils se trouvent. Il est souvent nécessaire, pour obtenir une substance pure, de la séparer de toutes les autres substances qui l'accompagnent. Le choix de la technique varie en fonction du mélange, de la substance que l'on doit séparer du reste du mélange et des phases qui constituent le mélange.

3-Les Principales Techniques De Séparation Des Mélanges :

Les plus utilisées sont

- **La décantation :**

C'est un procédé de séparation mécanique qui permet de séparer les constituants d'un mélange hétérogène composé de deux liquides non miscibles sous l'effet de leur densité ou un solide en suspension d'un liquide sous l'effet du poids (souvent nommé sédimentation). La séparation se réalise en laissant seulement se reposer le mélange. Les corps les plus lourds vont alors se déposer dans le fond du récipient. Lorsque les deux phases sont bien distinctes, on peut les séparer

facilement. Cette méthode simple n'est pas couteuse car elle nécessite peu de matériel mais son temps de réalisation est long et elle n'est pas sélective.

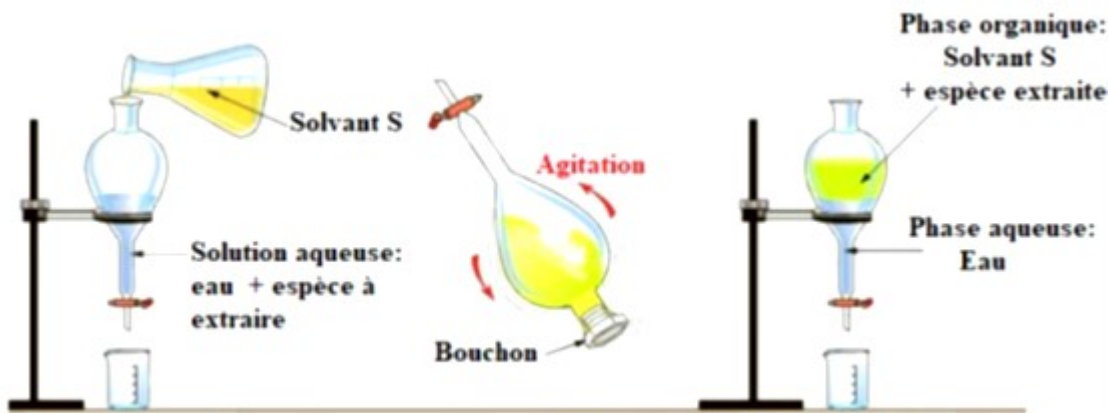


Figure 2.

Pour un mélange solide-liquide, le dépôt solide est appelé sédiment (voir figure.3.). La séparation obtenue est parfois partielle ne permettant pas d'obtenir un liquide limpide.

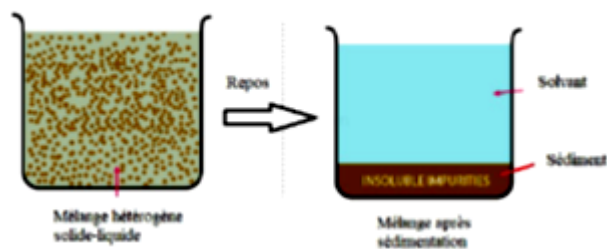


Figure 3.

- La filtration

La filtration est une technique qui permet de séparer physiquement les constituants d'un mélange lorsqu'un des constituants est sous la phase liquide ou gazeuse et l'autre, sous la phase solide qui y est insoluble. Pour ce faire, on utilise une substance poreuse minérale ou organique (voir figure.4.), appelée filtre. Ce dernier doit être chimiquement inerte et il permet de retenir les particules solides en suspension dans le mélange qui sont plus grosses que ses pores.

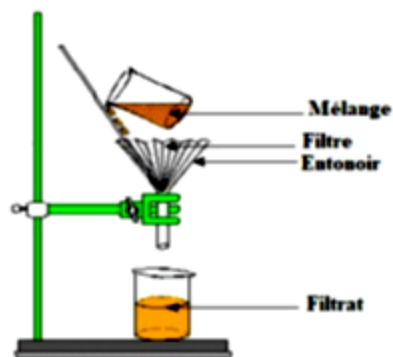


Figure 4.

- La centrifugation

Lorsque la décantation de particules sous l'effet du poids est inefficace (particules légères) ou trop lente, on a alors recours au procédé de centrifugation qui permet de séparer de deux à trois phases par l'action de la force centrifuge. Le mélange est entraîné dans un mouvement de rotation très rapide. Les particules solides les plus lourdes sont alors poussées vers les parois du récipient (culot), alors que les particules les plus légères et les liquides restent en surface, ce que l'on nomme surnageant.

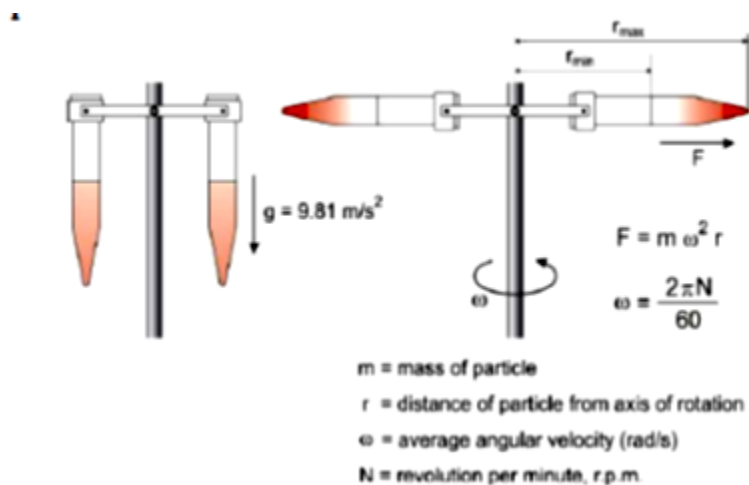


Figure 5.

- Évaporation du solvant :

C'est un processus par lequel on élimine la partie liquide d'un mélange homogène en le transformant en gaz. Pour ce faire, on peut laisser le constituant liquide du mélange s'évaporer naturellement à température ambiante, ou on peut accélérer le processus en chauffant le mélange. L'évaporation totale sert à récupérer la partie solide d'un mélange hétérogène ou encore le soluté

d'une solution. L'évaporation partielle permet de concentrer le soluté d'une solution dans un plus petit volume de solvant.

- **Précipitation :**

On peut diminuer la solubilité du soluté par des moyens physiques ou chimiques. Son but est de transformer un mélange homogène en un mélange hétérogène facile à séparer par les moyens discutés précédemment. La précipitation chimique consiste à former une phase hétérogène au sein d'une phase homogène par l'ajout d'un autre soluté qui pourra réagir avec l'analyte pour former une substance solide. Les moyens physiques consistent en ; la modification de la température, l'addition d'un non solvant ou le relargage (C'est une technique qui consiste à séparer une substance en solution de son solvant en introduisant une autre substance plus soluble qui prend sa place).

- **Distillation**

1- Distillation simple :

C'est une technique utilisée pour séparer les constituants d'un mélange homogène liquide ou d'un mélange hétérogène comportant au moins une phase liquide. En utilisant cette technique, on fait appel à la propriété de point d'ébullition. La distillation ressemble à l'évaporation. La seule différence est que la vapeur est récoltée par condensation au contact d'une surface froide. Elle repose sur deux changements d'état inverses : la vaporisation et la liquéfaction.

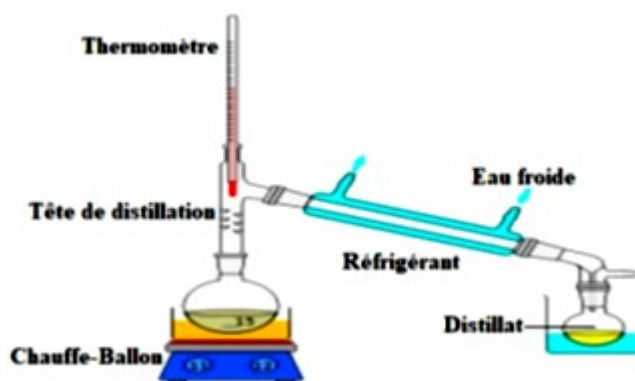


Figure 6.

2- Distillation fractionnée :

Elle concerne un mélange de plusieurs liquides miscibles, elle utilise une colonne de séparation (ou colonne de **Vigreux**) pour séparer les différents constituants du mélange en fonction de leurs températures d'ébullition au niveau de chaque plateau de cette colonne.

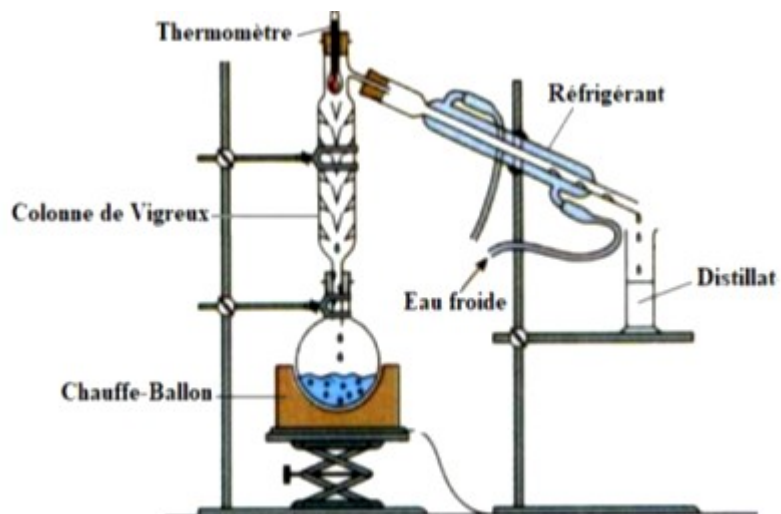


Figure 7.

- Sublimation :

Quelques solides passent directement par chauffage à l'état gazeux sans passer par la phase liquide. Cette sorte de solide peut être séparée d'un mélange en chauffant ce dernier au-delà du point de sublimation et en fournissant une surface relativement froide pour la sublimation inverse (condensation).

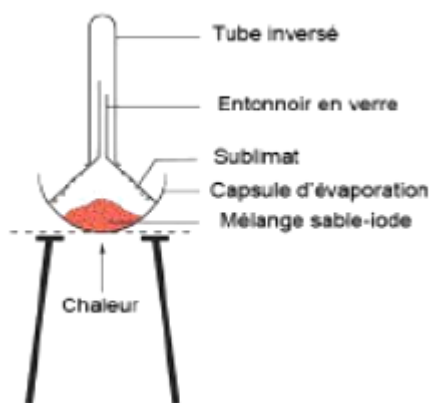


Figure 8.

Chapitre II : Généralité Sur Techniques Chromatographiques

1- Définition :

La chromatographie est une méthode destinée à séparer les constituants d'un mélange (ou soluté) en les distribuant entre deux phases: une phase stationnaire (PS) et une phase mobile (PM) non miscibles. Le chromatogramme traduit la variation du soluté dans l'éluant en fonction du temps. Le terme de chromatographie recouvre donc plusieurs technologies basées sur un principe commun : l'identification par la séparation.

Nous avons à retenir avant tout que :

Chromatographie = Séparation

Il existe différents types de chromatographie suivant la méthode de séparation utilisée :

- la chromatographie en couche mince (**CCM**).
- la chromatographie en colonne (**CC**).
- la chromatographie en papier (**CP**).
- la chromatographie en phase gazeuse (**CPG**).
- la chromatographie en phase liquide à haute performance (**HPLC**).

Elles sont différentes quant au matériel utilisé. Une CCM nécessite une feuille de papier, un solvant et une cuve en verre. La CPG, ou la HPLC nécessite des appareils de technologies poussées de coût élevé.

2-Historique :

- **1900 : Invention de la chromatographie (Michel TSWETT)**
- **1938 : Première chromatographie sur couches minces (Ismailov et Schraiber).**
- **1952 : Naissance officielle de la chromatographie phase gaz (Martin et Synge ,Nobel1952).**
- **1955–1960 : Age d'or de la chromatographie en phase gazeuse.**
- **Fin des années 60 : Naissance de la chromatographie en phase liquide à haute performance.**
- **De nos jours : Amélioration instrumentale (informatisation) et innovation dans le domaine de la miniaturisation (nanotechnologie).**

3-principe :

La chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire. Celle-ci retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon dilué selon l'intensité des forces d'interactions de faible énergie

(comme les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogène, etc.) réalisées entre les différentes espèces moléculaires et la phase stationnaire.

Les différents composants de l'échantillon ont généralement une vitesse caractéristique qui permet de les séparer, voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement dépendante de la nature de la phase mobile et de la phase stationnaire.

4-Classement des techniques chromatographiques :

4-1- Classement selon la nature des phases et processus mis en jeu :

Phase Mobile	Phase Stationnaire	Méthode Chromatographique
Gaz	Solide	C.G.S
Gaz	Liquide	C.G.L
Liquide	Solide	C.L.S
Liquide	Liquide	C.L.L

Mécanismes	Méthodes Chromatographiques
Adsorption	C.G.S et C.L.S
Partition	C.G.L et C.L.L
Echanges d'ions	C.L.S
Perméations	C.L.S

4-2- Classement selon les techniques opératoires :

- Chromatographie sur couche mince ou sur papier.
- Chromatographie sur colonne.
- Chromatographie par perméation de gel ou d'exclusion (polymères).
- ✓ **Adsorption** : C'est l'accumulation de substances à **la surface** d'une des phases.
- ✓ **Partage** : 2 corps différents ne se partagent pas de façon identique entre 2 phases (Coefficient de partage).

- ✓ **Echange d'ions** : La phase stationnaire a des propriétés d'échanges d'ions. Présence de groupements acide ou basique permettant l'échange de certains de leurs ions avec ceux, de même signe, de l'échantillon.
 - Phase mobile : Solution de sels ou d'acide ou de base.
 - Les coefficients de partage sont appelés coefficient d'échanges d'ions.
- ✓ **Exclusion** : également appelé tamisage moléculaire ou gel-filtration, vise à séparer les molécules en fonction de leur masse moléculaire, bien que la forme intervienne également.

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)...

6-Aspect Théorique De La Chromatographie :

6-1- le chromatogramme :

Diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur (à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution)

Elution : entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile. En CLS (colonne ou CCM), la phase mobile peut être appelée éluant.

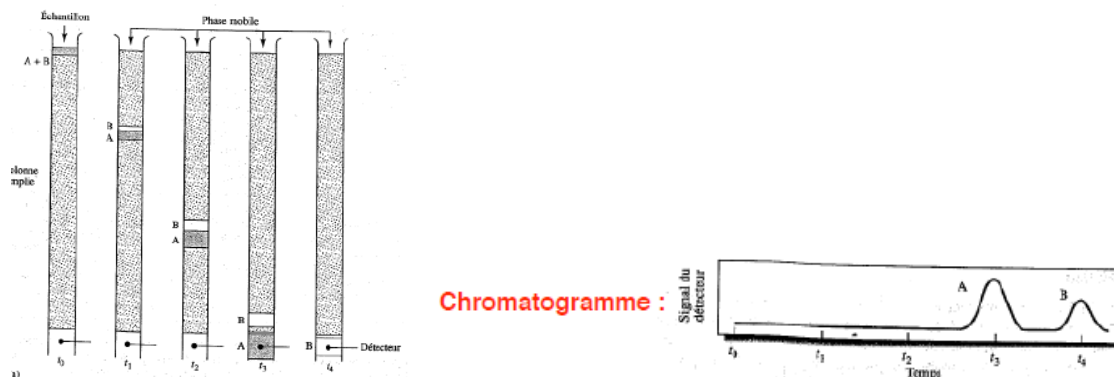
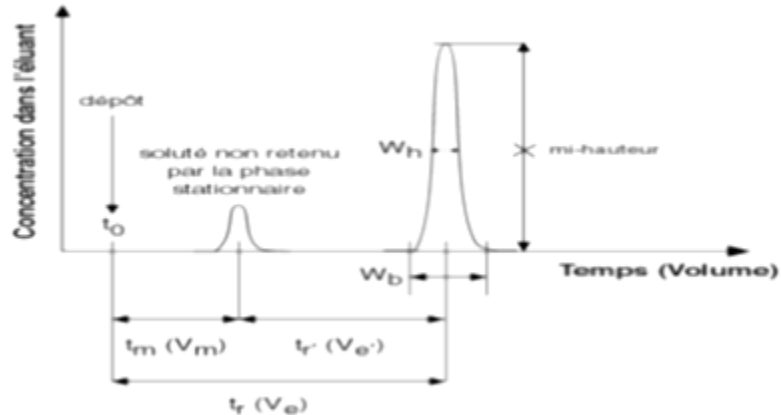


Figure 9.

L'analyse du chromatogramme permet une analyse :

- qualitative : identification / position du pic
- quantitative : aire des pics

➤ **Profil des pics chromatographiques :**



- T_0 = début de l'injection.
- Le pic de gauche correspond au soluté qui n'est pas retenu par la phase stationnaire et qui atteint le détecteur à la même vitesse que celle de l'éluant. Son temps de rétention t_m est le temps nécessaire pour qu'une molécule de la phase mobile traverse la colonne.
- t_m = temps mort = t_0 = temps nécessaire pour que le pic d'un constituant non retenu par la phase stationnaire.

$$\text{On a : } u = L / t_m$$

u = vitesse linéaire de la P_m , L = longueur de colonne

En CPG, t_m = temps de l'air ou du méthane.

- **Volume mort V_m** : Volume occupé par la phase mobile dans la colonne: $V_m = t_m * D$

V_m ne dépend que de la géométrie et du remplissage de la colonne (volume interstitiel accessible)

- **Temps de rétention T_r** : temps écoulé entre l'injection et le moment où le constituant sort de la colonne.
- **Volume de rétention V_r** : correspond au volume de phase mobile nécessaire pour éluer un produit S.

$$\text{Si le débit } D \text{ de la phase mobile est constant : } V_r = t_r * D.$$

- **Volume et temps de rétention réduits** : Volume de rétention réduit :

$$V'r = V_r - V_m$$

De la même façon, on définit un temps de rétention réduit t'_r : $t'_r = t_r - t_m$.

- **Facteur de rétention (ou de capacité) :** Le facteur de rétention k' pour un produit donné est défini comme suit : Un composé de masse m_T se répartit en m_m dans la phase mobile et m_s dans la phase stationnaire. Si les conditions opératoires ne changent pas, m_M et m_S restent constantes au cours de la migration dans la colonne. Leur rapport est indépendant de m_T . Il est appelé facteur de rétention (recommandé par UICPA) plutôt que facteur de capacité. Ce n'est pas une constante.

$$k = m_s / m_m = C_S \cdot V_S / C_M \cdot V_M = K' \cdot V_S / V_M$$

K : coefficient de distribution

mS : masse de soluté dans la phase stationnaire

mM : masse de soluté dans la phase mobile

$$\text{Avec le rapport de phase } \beta = V_M / V_S : K' = \beta \cdot k$$

Si $K = 0$, le soluté migre aussi vite que le solvant ;

Si $K = \infty$ le soluté reste sur la colonne.

$$\text{On démontre : } k' = (t_r - t_m) / t_m = t'_r / t_m$$

Si $k' < 1$; élution très rapide, difficile à étudier.

Si $k' > 20$ ou 30 ; durée d'élution très longue.

En HPLC, la séparation est optimale pour $2 < k' < 10$ afin que le temps de passage des constituants ne soit pas trop long ; $k'=5$ =valeur "idéale".

- **Facteur de sélectivité ou de séparation :**

$$\alpha = K_B / K_A$$

α = rapport de distribution du constituant B le plus retenu sur le rapport de distribution du constituant A le moins retenu (1er pic).

$$k'_A = K_A \cdot V_S / V_M \quad k'_B = K_B \cdot V_S / V_M$$

$$\text{donc : } K_B / K_A = k'_B / k'_A$$

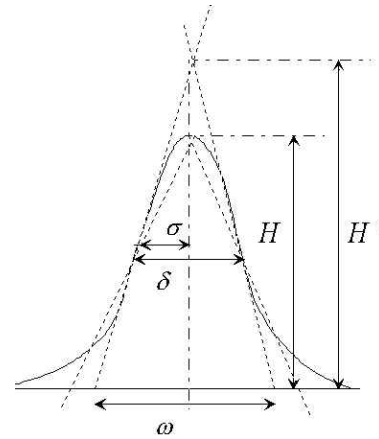
$$\text{et } \alpha = k'_B / k'_A$$

$$\alpha = [(t_r(B) - t_m) / t_m] \cdot [t_m / (t_r(A) - t_m)]$$

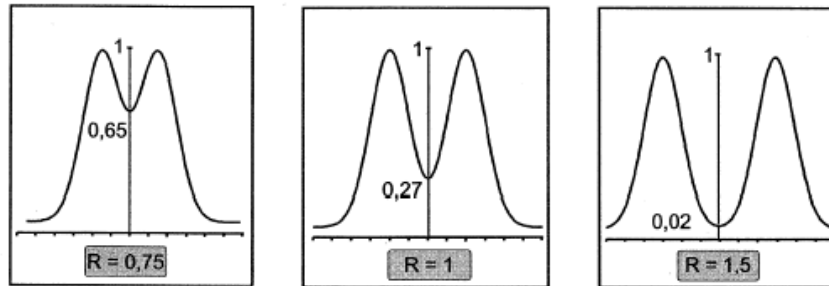
$$\alpha = t'_r(B) / t'_r(A)$$

- **Courbe de Gauss :** Les pics chromatographiques ont une allure gaussienne L'aire des pics est calculée en assimilant le pic à un triangle. La largeur d'une courbe de Gauss est définie par : ω , δ et σ

- σ = écart type = Largeur du pic à 60,6% de la hauteur.
- $\delta = 2,35 \sigma$ = largeur à mi-hauteur
- $\omega = 4 \sigma = 1,7 \delta$ = largeur mesurée à 13,5% de la hauteur = largeur à la base du pic



- **Résolution des pics :** La résolution est la grandeur qui caractérise l'aptitude d'un système chromatographique (colonne, solutés, solvants) à séparer 2 solutés. Le but de la chromatographie est d'obtenir la meilleure résolution dans le temps le plus court.



Facteur de résolution : $R = 2 [t_r (B) - t_r(A)] / [\omega (B) + \omega(A)]$

➤ Si on fait apparaître la largeur à mi-hauteur δ , on a :

$R = 1,18 [t_r (B) - t_r(A)] / [\delta (B) + \delta(A)]$

Généralement : bonne séparation pour $R \geq 1$,

- **Efficacité d'une colonne :**

1- Modèle des plateaux théoriques : Assimilation d'une colonne de chromatographie à une colonne à distiller pour essayer d'expliquer la forme des pics:

- Les pics d'un chromatogramme ont une allure de courbe de Gauss . Les molécules subissent de très nombreux transferts entre la phase mobile et la phase stationnaire. Elles ont des comportements individuels aléatoires, certaines pouvant rester dans la

phase stationnaire plus longtemps que la durée moyenne. La largeur de la bande augmente en longueur au cours du déplacement dans la colonne et cela se répercute dans la largeur du pic du chromatogramme en fonction du temps.

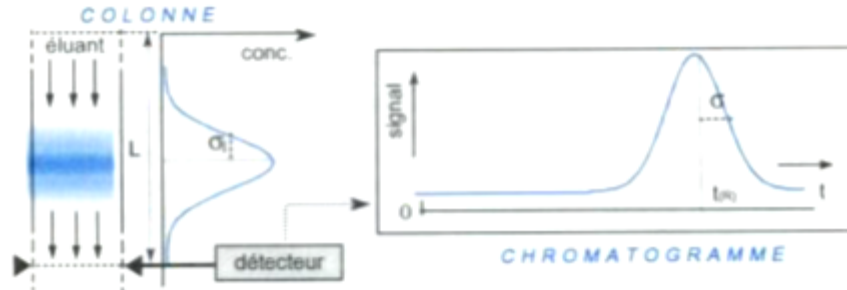
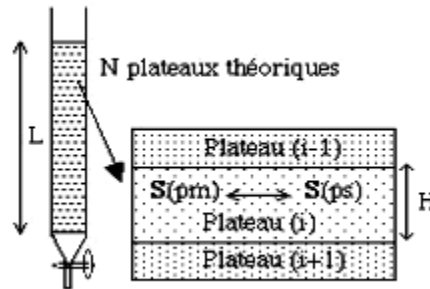


Figure 10.

2- **Nombre de plateaux théoriques** : On considère alors qu'une colonne de longueur utile L est composée de N petits disques fictifs superposés (plateaux théoriques) de même hauteur H.



Nombre de plateau théorique : $N = L / H$

L : longueur utile de la colonne

N : nombre de plateaux théoriques : 100 - 106

H : hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) : 1 cm - 10 μm

✓ Une colonne sera d'autant plus efficace que : N est grand (L grand) et H est petit.

On peut montrer que : $H = \frac{\sigma^2}{L}$ et $\sigma = \frac{L\omega}{4t_R}$

Donc $H = \frac{L\omega^2}{16t_R^2}$ et $N = 16(t_R/\omega)^2$

Ou $N = 5,545 (t_R/\delta)^2$

- ✓ Hauteur de plateau effectif : $H_{eff} = L / N_{eff}$
- ✓ Hauteur de plateau réduite : $h = H/dp = L/(N \cdot dp)$

dp = diamètre moyen des particules sphériques des colonnes;

Des colonnes ayant même L/dp ont des efficacités ou performances semblables. Le nombre de plateaux théoriques exprime l'efficacité de la colonne.

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

C'est pourquoi on utilise la relation de **PURNELL**

$$R_s = \frac{\sqrt{N_2}}{4} \cdot \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \cdot \left[\frac{k_2}{k_2 + 1} \right]$$

➤ **Variation de R avec α**

- Si $\alpha = 1$, il n'y a pas de séparation quelle que soit la valeur de N.
- Si α passe de 1,1 à 1,2, la valeur de R double.
- Si $\alpha > 2$, la valeur de R ne change presque pas comme le montre la figure 11

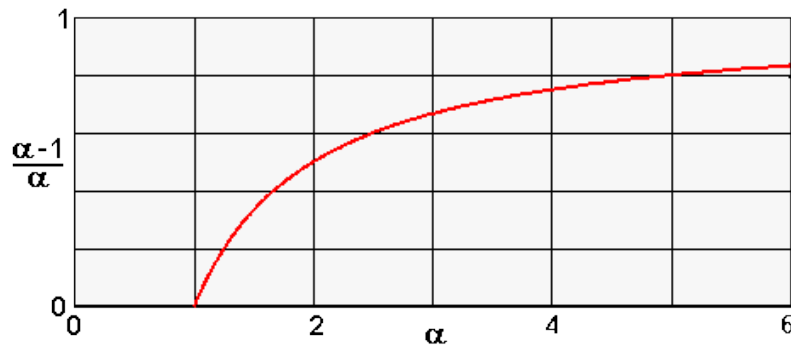


Figure 11.

➤ **Variation de R avec k'**

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

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

À ce moment le temps de rétention devient très long et le pic de plus en plus large (figure 12).

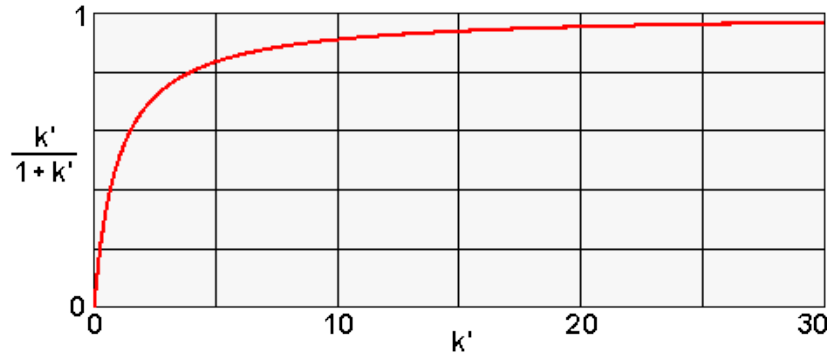


Figure 12.

➤ **Variation de R avec N :**

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

6-2 Effet de la vitesse d'élution sur l'efficacité de la colonne :

La hauteur d'un plateau théorique h peut être affectée par la vitesse du gaz vecteur ou son débit. En effet plus le débit du gaz vecteur est grand, plus le soluté migre rapidement et inversement car le débit modifie le coefficient de partage. Cette relation entre débit ou vitesse moyenne du gaz vecteur et la hauteur d'un plateau théorique moyenne h a été mise en évidence par **Van Deemter (1956)** (équation et figure ci-après).

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

Allure de la courbe de Van Deemter en CPG :

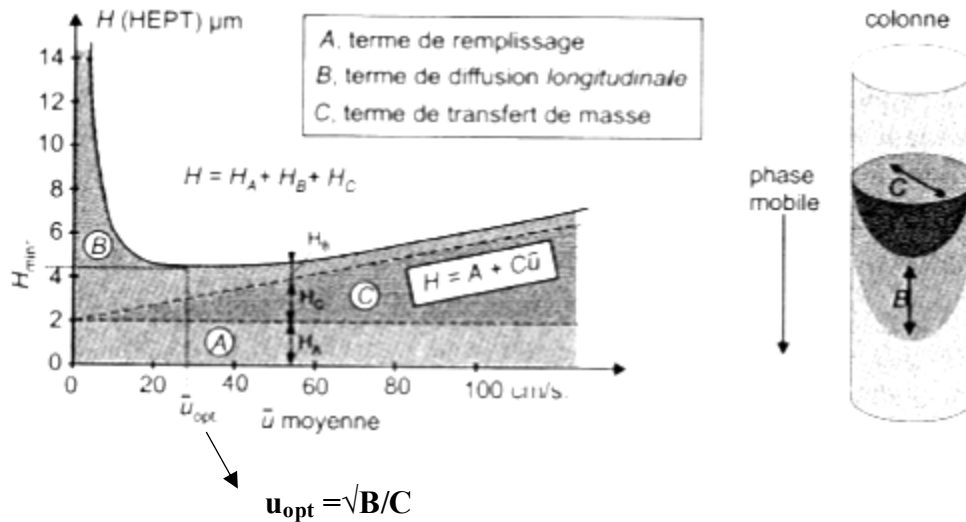


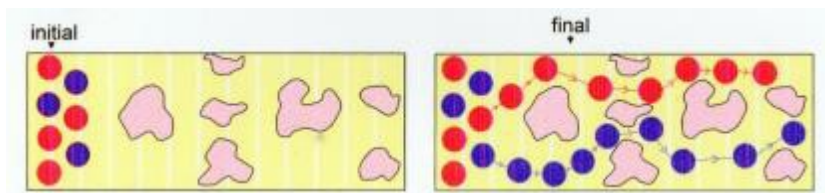
Figure 13.

$U = L / t_m =$ vitesse moy de déplacement ou d'écoulement des mol de la phase mobile

(cm /s) . $h = H/dp$

➤ **A : Coefficient de diffusion turbulente ou terme de remplissage**

Dépend de la taille et de la répartition des particules de la Phase Stationnaire. La largeur de la bande dépend des chemins que peuvent suivre les molécules durant l'éluion. Les molécules de soluté arrivent en sortie de colonne a des instants différents. C'est le phénomène de diffusion turbulente.



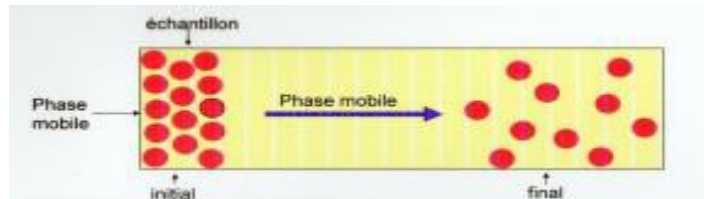
$A = 2\lambda.dp (\mu m)$

- $\lambda =$ Cte concernant la régularité du remplissage.
- $dp =$ diamètre des particules.

Plus les particules sont petites, plus le remplissage est homogène, plus A petit et plus l'efficacité de la colonne augmente. La contribution de A est nulle pour une colonne capillaire de chromatographie en phase gaz.

➤ **B/u : Coefficient de diffusion longitudinale**

Les molécules de soluté diffusent des régions les plus concentrées vers les plus diluées. Elles se dispersent dans toutes les directions, d'autant plus que le débit est faible. (**Diffusion**= quand une grandeur change de direction ; ex. transfert de matière du a l'agitation moléculaire.)



$$B/u = 2\gamma \cdot D_M$$

- γ = cte sans dimension liée a l'espace entre les particules de remplissage
 $\gamma = 0,6$ pour les colonnes remplies et $1,0$ pour les colonnes capillaires.
- D_M = coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile (en cm^2/s).

Le coefficient de diffusion est plus important dans les gaz que dans les liquides donc phénomène Important en CPG (principale cause d'élargissement des pics). B est inversement proportionnel à u (moins de diffusion lorsque le soluté séjourne moins longtemps dans la colonne).

➤ **C.U : Coefficient de transfert de masse**

Le transfert de molécules entre la Phase mobile et la Phase stationnaire n'est pas instantané. Par ex. les molécules éloignées de la Phase stationnaire peuvent être entraînées avant d'être transférées sur la Phase stationnaire. Le terme C devient important quand la vitesse d'écoulement (cm/s) de la phase mobile ou son débit (cm^3/s) est trop rapide. Cette résistance empêche la formation de l'équilibre : soluté dans PM --- > soluté dans PS.

$$C.u = (C_S + C_M).u$$

Plus u petit, plus les molécules pénètrent dans la PS et plus la colonne est efficace.

- C_S : terme de transfert de masse dans la phase stationnaire : est proportionnel à d_f^2/D_S .
 d_f = épaisseur moyenne de la couche de PS déposée sur les particules du support solide.
 D_S = coefficient de diffusion du soluté dans la phase stationnaire
- C_M , terme de transfert de masse dans la phase mobile; est proportionnel a d_p^2/D_M
 d_p = diamètre des particules de remplissage.
 D_M = coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

➤ **Les colonnes efficaces sont régulièrement remplies, avec un d_p le plus faible possible.**

- Il est aussi préférable d'utiliser un solvant de faible viscosité pour minimiser C.
- L'élargissement longitudinal du pic provient du déplacement des molécules dans des directions parallèles à l'écoulement
- L'élargissement du au transfert de masse provient de la diffusion dans une direction perpendiculaire à l'écoulement.

La courbe de van Deemter est une hyperbole. Il existe un minimum de $H=L/N$. Il correspond à une efficacité maximale de la colonne, pour une vitesse u optimale (ou un débit optimal) et pour un nombre de plateaux théoriques N maximale.

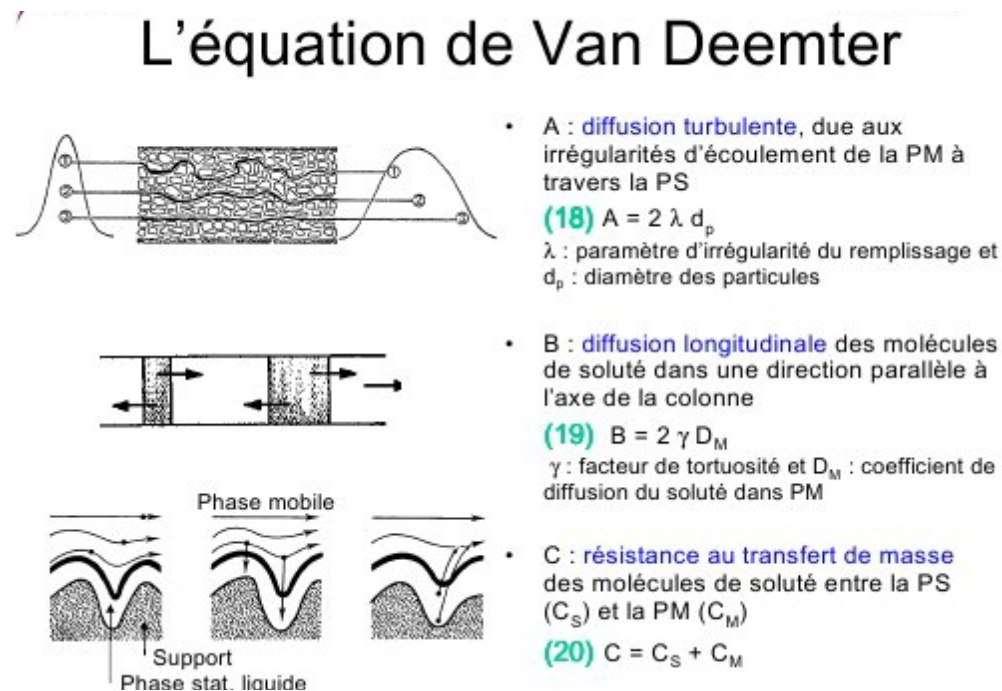


Figure 14.

7- Séparation Chromatographique :

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire. En chromatographie les constituants d'un mélange se partagent entre les deux phases : l'une phase mobile et l'autre stationnaire (où la répartition entre les deux phases peut être différente). Ce phénomène est dynamique, les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre ; ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un

constituant en particulier. À ce moment le rapport des concentrations est égal au rapport des répartitions dans les deux phases ou coefficient de partage K .

- Plus K est grand, plus le composé est absorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement.
- La valeur de K dépend
 - de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des phases
 - de la nature de la phase stationnaire qui est un adsorbant ou un solvant pour chacun des composés
 - de la phase mobile, seulement si elle est un liquide, et donc un solvant pour chacun des composés
 - de la température qui affecte les pressions de vapeur et les solubilités

7-1- Chromatographie d'adsorption :

En chromatographie d'adsorption, la répartition des molécules se fait entre la phase mobile et la surface de la phase stationnaire qui n'est pas liquide, donc qui ne joue pas le rôle de solvant. C'est l'accumulation de substances à **la surface** d'une des phases.

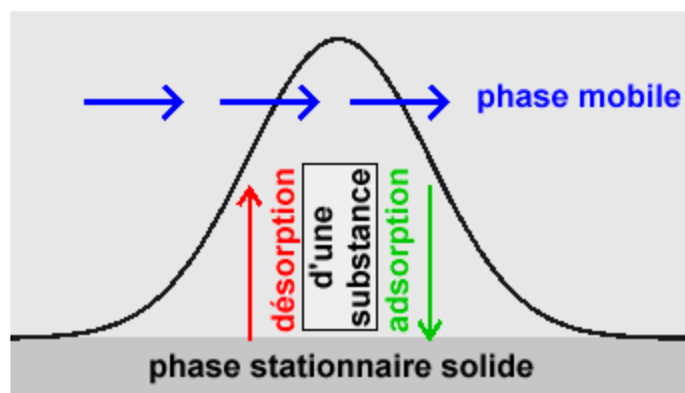


Figure 15.

La phase mobile : La phase mobile peut être un gaz (gaz vecteur) ou un liquide (ou solvant). Si la phase mobile est un gaz elle ne sert qu'à entraîner les constituants à travers la colonne. Le passage des constituants vers la phase mobile ne dépend pas de leur solubilité mais de leur pression de vapeur. Si la phase mobile est un liquide elle a un double rôle : celui d'entraîner les composés à travers la colonne et celui de solubiliser les constituants du mélange.

Adsorbants possibles (du moins polaire au plus polaire): Papier, cellulose, amidon, carbonate de sodium, **gel de silice**, **alumine**, charbon activé.

7-2-Chromatographie De Partage :

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

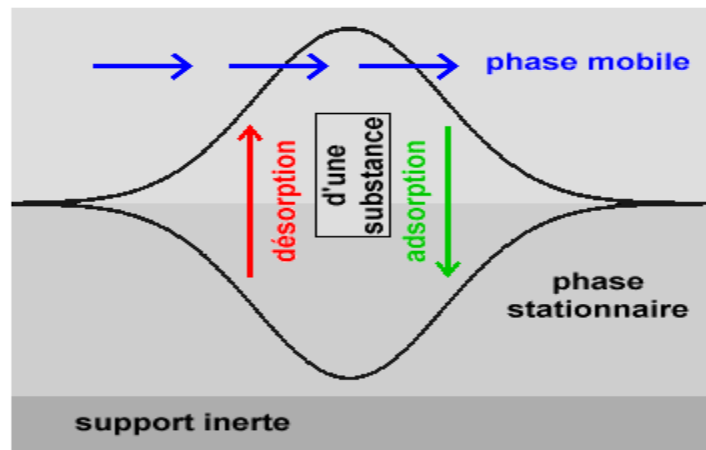


Figure 16.

7-3- 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.

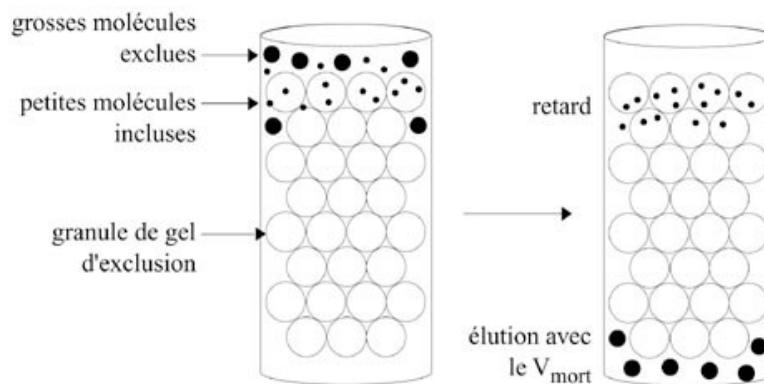


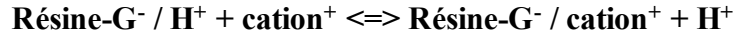
Figure 17.

7-4- Chromatographie Par Echange D'ions : (ou chromatographie ionique)

La phase stationnaire est une résine échangeuse d'ions (polymère porteur de groupements ionisés, négativement pour séparer des cations, positivement pour séparer des anions) : interactions électrostatiques.

Phase stationnaire = résine (polymère organique, ex styrène-DVB) échangeuse d'ions

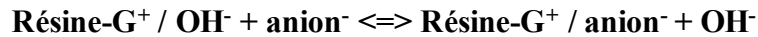
✓ **Résine anionique (échangeuse de cations) :**



Forts : acide sulfonique ($\text{G}^- = \text{SO}_3^-$)

Faibles : acide carboxylique ($\text{G}^- = \text{COO}^-$)

✓ **Résine cationique (échangeuse d'anions) :**



Forts: ammonium ($\text{G}^+ = \text{N}(\text{CH}_3)_3^+$)

Faibles : amines II ou III

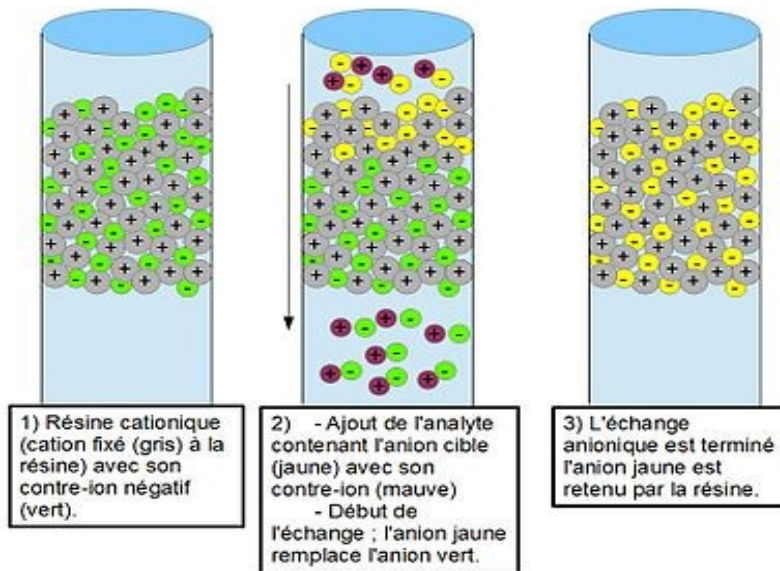


Figure 18.

- Phase mobile : Solution de sels ou d'acide ou de base
- Les coefficients de partage sont appelés coefficient d'échanges d'ions

7-5- La Chromatographie D'affinité

La chromatographie d'affinité exploite les propriétés des interactions biologiques entre les molécules, et, théoriquement, capable de séparer et purifier les molécules d'un mélange en une seule étape. Au début, elle est utilisée pour purifier les enzymes, et ensuite étendue aux acides nucléiques, aux immunoglobulines, aux récepteurs membranaires, aux fragments cellulaires et même aux cellules. La phase stationnaire de cette méthode qui remplit la colonne est un support (silice, polymère) inerte chimiquement, sur lequel se lie un ligand par covalence. Cette méthode est basée, donc, sur des interactions spécifiques et réversibles entre le ligand et son partenaire (affinant) en solution. Voir la figure 19.

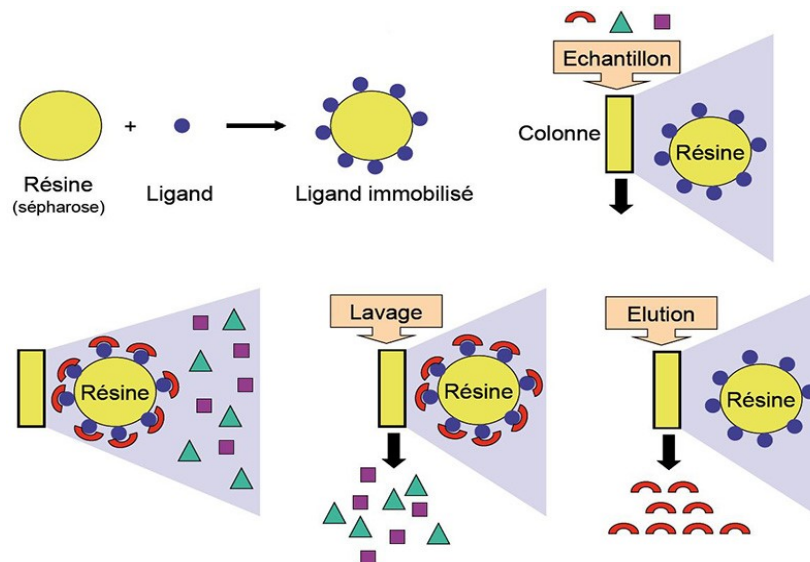


Figure 19.

- La chromatographie d'affinité est donc très puissante par sa sélectivité importante, mais elle n'est pas adaptée 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.

Chapitre III : La Chromatographie Sur Couche Mince Et Sur Papier

I- Chromatographie Sur Papier :

1. Définition :

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

2. Préparation D'échantillon :

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

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

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

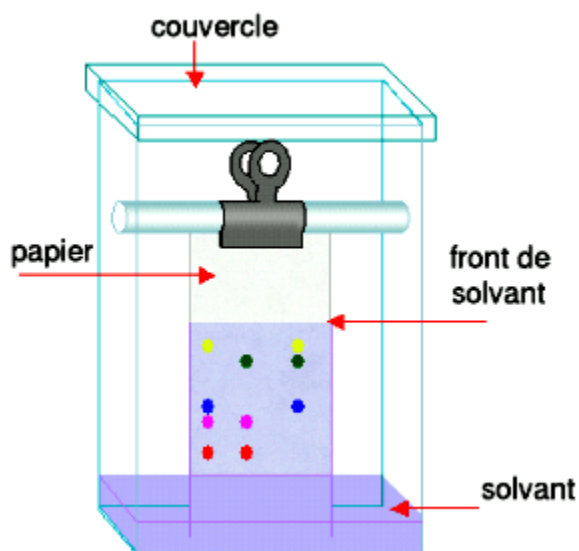


Figure 20.

- Papier :

On peut utiliser 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 sont uniformes. Les marques principales sont Whatman, Schleicher et Schüll, Durieux, Arches. Il existe huit catégories.

-Identification les substances de l'échantillon :

Le chromatogramme est utilisé pour comparaison avec d'autres analyses effectuées sur des substances connues et prises dans des conditions identiques, pour identifier les substances de l'échantillon. Les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur Rf qui peut être comparée à celles se trouvant dans les tables. Cette valeur est calculée de la façon suivante :

$$\mathbf{Rf = (distance\ parcourue\ par\ l'\acute{e}chantillon) / (distance\ parcourue\ par\ le\ solvant)}$$

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

1. les produits sont colorés, il n'y a rien de spécial à faire.
2. les produits sont fluorescents, on peut les identifier sous une lampe ultraviolette.
3. sinon, il faut utiliser un révélateur qui réagira chimiquement avec les produits (en les détruisant) et dont le résultat sera coloré.

II-Chromatographie Sur Couche Mince (CCM) :

a) Définition et Appareillage :

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

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique ccm sont :

- **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 fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.

- **l'échantillon** : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé 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.

2-Principe De La Technique :

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

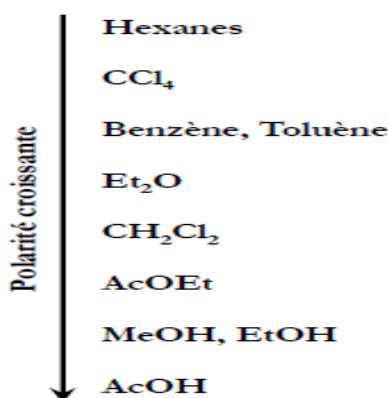
a) Choix De L'éluant :

Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'éluant et le soluté (mélange de composés à séparer):

- 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.
 - **Moins un composé est polaire, moins il s'accroche à l'adsorbant, plus il migre avec l'éluant. (Choix d'un éluant peu polaire)**
 - **Plus un composé est polaire, plus il s'accroche à l'adsorbant, moins il migre avec l'éluant. (Choix d'un éluant polaire)**

b) Phase mobile :

Une phase mobile liquide est appelée éluant. C'est elle qui fait migrer les composés, son choix est donc important. Il faut que le soluté soit soluble dans l'éluant. Il est possible de faire des mélanges de solvants pour changer sa polarité.



❖ **Polarité des groupements fonctionnels neutres :**

Le gel de silice est polaire, il a par conséquent une plus grande affinité pour les composés polaires :

-Un composé peu polaire est peu adsorbé.

-Un composé polaire est très adsorbé.

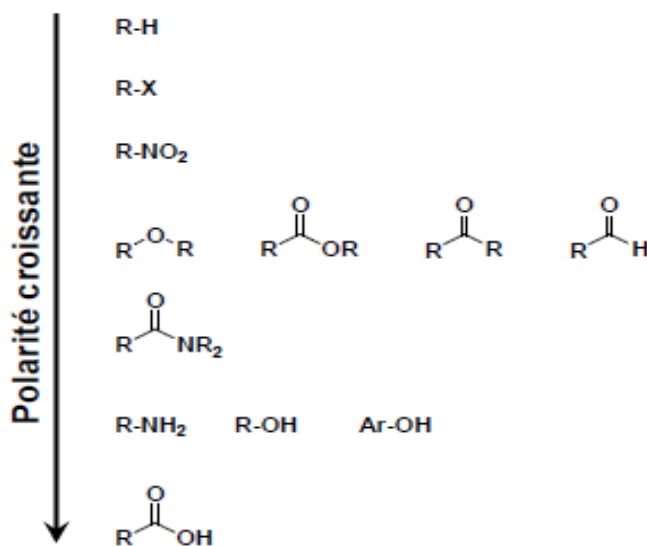


Figure 21.

3- Applications de la CCM.

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon

est probablement pur. De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction. La chromatographie sur couche mince est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne.

4-Adsorbants et plaques chromatographiques :

Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose.

5- Dépôt de l'échantillon :

L'échantillon est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : on emploie fréquemment le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution est déposée en un point de la plaque située à environ 1 cm de la partie inférieure. Il est important que le diamètre de la tache produite au moment du dépôt soit faible; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3 mm. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large.

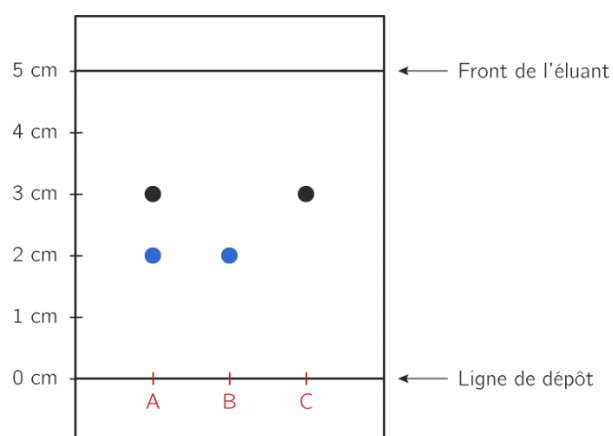


Figure 22

6- Éluion de la CCM

Préparer une **cuve d'éluion** avec un Bêcher de 250 mL avec un papier absorbant à l'intérieur et Verre de montre. Y verser 10 mL d'éluant (ex. 8 mL Hex + 2 mL AcOEt) .Placer la CCM dans la cuve en veillant à ce que la ligne soit au-dessus du liquide. Faire éluer jusqu'à ~5 mm du bord et tracer un trait pour marquer le front de solvant.

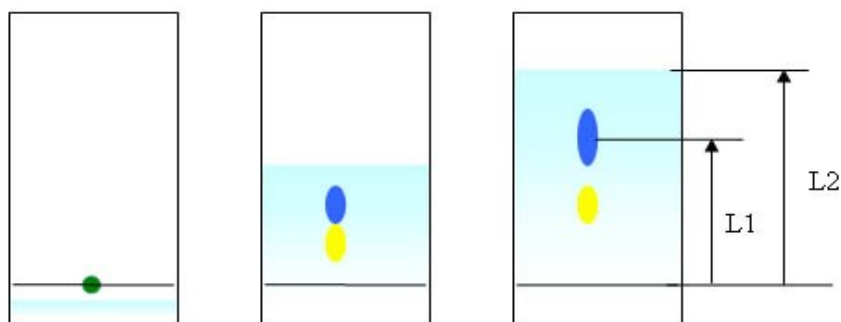


Figure 23.

7- Révélation de la CCM

- **À l'œil nu**: si le produit est coloré
- **À la lampe UV** : les molécules qui absorbent les UV à 254 nm seront visibles (noyaux aromatiques par exemple).
- **Avec un révélateur chimique** : l'iode est le premier révélateur à tester, car il est non destructif. Il permet de révéler des doubles liaisons et les halogénures. L'iode est évaporé à chaud ou dans la hotte. De nombreux autres existent : KMnO_4 , acide phosphomolybdique, Vanilline, ninhydrine...

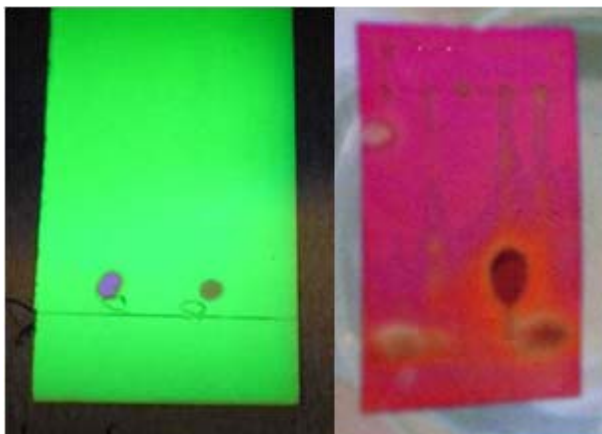
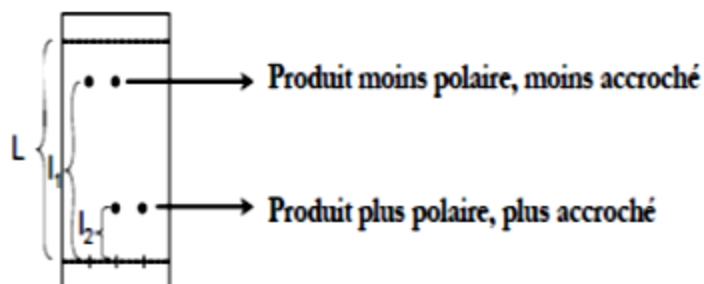


Figure 24.

8- Mesure du R_f :

Le R_f (**r**apport frontal ou **r**étention frontale) est caractéristique d'un produit dans un éluant donné et pour une phase stationnaire donnée.



$R_f = \text{Hauteur de migration} / \text{Hauteur du front de solvant} = \text{valeur entre 0 et 1.}$

9- CCM bidirectionnelles :

C'est une expérience qui permet de prouver si un produit décompose sur la silice, ou si un "spot" de la CCM contient en fait deux produits

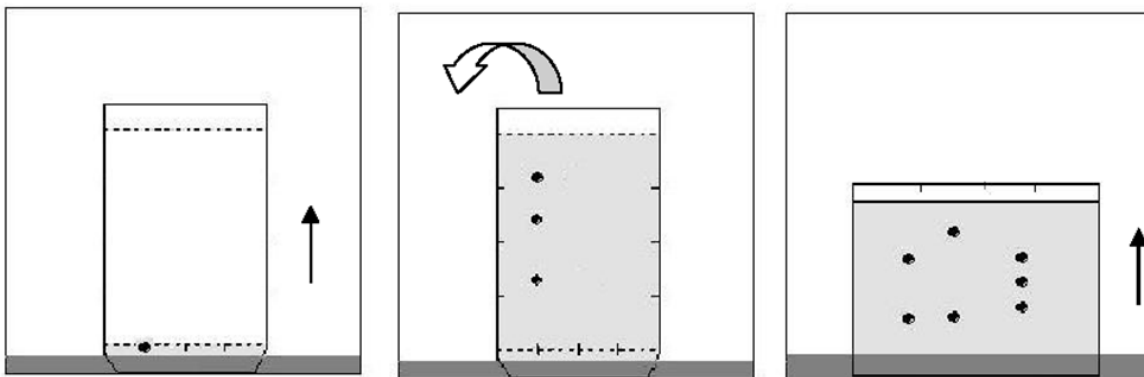


Figure 25.

Chapitre IV : La Chromatographie En Phase Gazeuse (CPG).

1- Principe :

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation dont les principes généraux sont les mêmes que ceux énoncés pour la chromatographie en général, c'est-à-dire fondés sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser au travers d'un support choisi. La phase stationnaire liquide (C.G.L) ou parfois solide (C.G.S) placée à l'intérieure d'une colonne.

- ❖ **C.G.S : La phase mobile est un gaz et la phase stationnaire est un solide qui retient les analytes par adsorption physique.**
- ❖ **C.G.L : C'est une chromatographie de partage, la phase mobile est un gaz et la phase stationnaire est un liquide qui est immobilisé sur la surface d'un support inerte par adhésion ou par liaison chimique.**

La particularité du procédé est d'opérer en totalité sur des produits volatilisés, ce qui implique de maintenir une température minimale convenable, mais sans qu'il y ait décomposition des solutés, et de travailler en circuit étanche aux gaz.

Un grand nombre de molécules organiques peuvent ainsi être séparées directement ou après transformation lorsqu'elles sont thermolabiles ou peu volatiles.

2- Description d'un chromatographe en phase gazeuse :

2-1 Appareillage :

Un appareil de CPG comprend schématiquement 5 modules spécifiques : une source de gaz (1), un injecteur (2), une colonne (3) contenue dans une enceinte thermostatée (four)(4) et un détecteur (5) relié à un intégrateur ou un ordinateur sur lequel apparaît le chromatogramme.

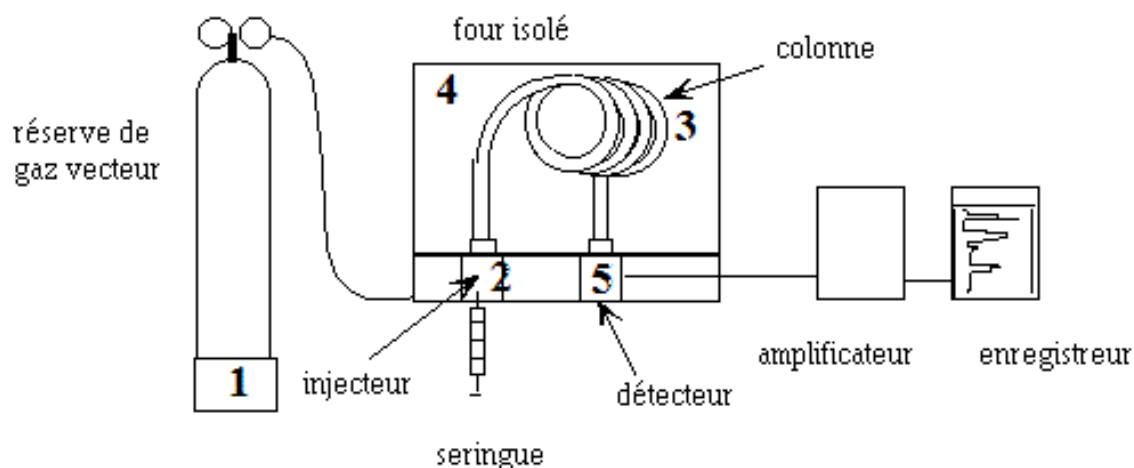


Figure 26 : Appareillage de chromatographie en phase gazeuse.

a) Réserve de gaz vecteur :

le gaz conservé dans des bouteilles métalliques sous forte pression est introduit après passage par un détendeur dans le système chromatographique sous une pression allant de 1 à 4 bars. La qualité de la chromatographie dépend du débit de ce gaz.

Les gaz utilisés doivent répondre à un certain nombre d'exigences :

- Très grande pureté
- Inertie vis-à-vis des substances à chromatographier .
- Très faible viscosité

Les principaux gaz utilisés sont : **l'azote, l'argon, l'hélium, l'hydrogène**

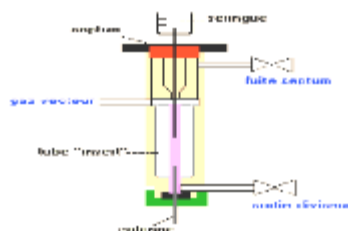
Le choix du gaz vecteur dépend parfois du détecteur : exemple le catharomètre nécessite l'hélium ou l'hydrogène. Le détecteur à ionisation de flamme (D.I.F) nécessite l'emploi d'azote.

b) Chambre D'injection :

Ce système permet à la fois l'introduction de l'échantillon dans la colonne du chromatographe, ainsi que la volatilisation des analytes. La température de l'injecteur doit être réglée de manière à entraîner la vaporisation de tous les analytes de l'échantillon : elle est généralement maintenue à 50 °C au-dessus de la température d'ébullition de l'analyte le moins volatil. L'introduction se fait à l'aide d'une micro seringue (le volume à injecter est généralement voisin de 1 µL) à travers un septum (qui assure l'étanchéité) dans un *liner* (typiquement un tube de verre rempli d'un petit morceau de coton). Si l'échantillon contient des espèces non-volatiles, celles-ci sont retenues sur le coton et donc non-injectées dans la colonne, ce qui permet de la protéger. Les espèces volatiles sont vaporisées et entraînées par le gaz vecteur vers la tête de la colonne.

- ***Injecteur split / splitless*** (Injecteur avec système de fuite)

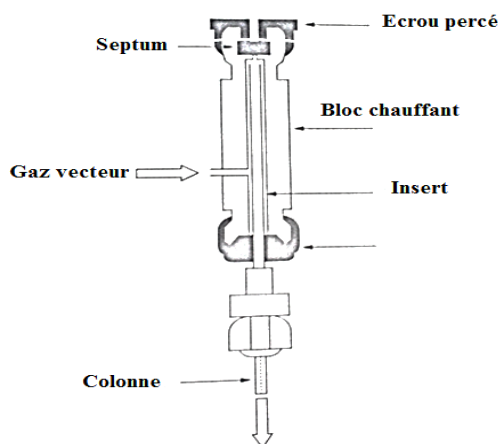
Une grande partie de l'échantillon injecté, vaporisé et mélangé au gaz vecteur est éliminée de l'injecteur par une vanne de fuite. Ainsi, une petite fraction du mélange pénètre dans la colonne. Il existe deux modes selon que l'on injecte vanne de fuite



ouverte (**mode split**) ou vanne fermée pendant environ 1 minute après l'injection (**modesplitless**). Cela peut être utile dans le cas d'échantillon en solution concentrée, pour éviter de surcharger la colonne

- **Injecteur à vaporisation directe (on column)**

Pour les colonnes remplies et les colonnes capillaires de gros diamètre. Tout l'échantillon introduit par la seringue est entièrement entraîné dans la colonne à froid (40° C). Les chambres de vaporisation sont portées à une température supérieure à celle de la colonne pour que l'échantillon soit volatilisé immédiatement pour être introduit le plus rapidement possible.



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

Programmation de la température de la chambre d'injection de 20 à 300°C en quelques dizaines de secondes : conjugue les avantages de l'injecteur **split/splitless** et de l'injecteur "on column" : possibilité d'injecter à froid, en mode split, avec une seringue "classique"

c) **Four :**

Les colonnes sont placées dans des enceintes chauffées appelées four dont la température peut-être réglée au 1/10^{ème} de °C près.

La température du four peut-être :

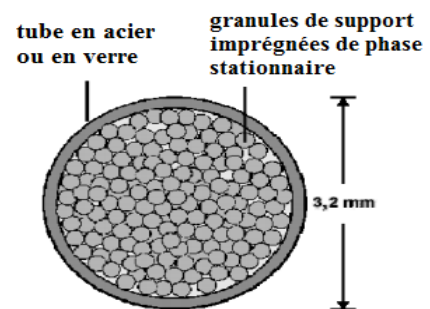
- stable et identique du début à la fin de la manipulation (= conditions isothermes)
- programmée par palier successif (= en gradients)

d) Colonnes :

Elles contiennent la phase stationnaire. Elles se présentent sous forme de tubes fins enroulés. Il existe deux types de colonnes :

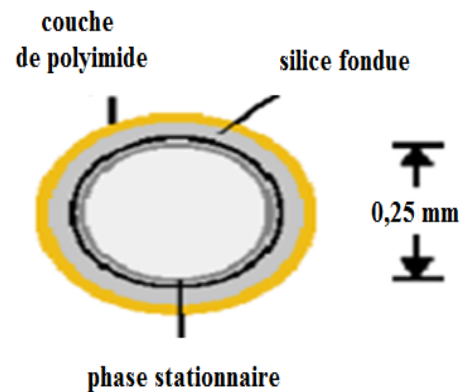
• Les colonnes remplies

- matériau : verre, téflon, acier
- caractéristiques géométriques: d.i.=1-6 mm, L= 0,5 – 3 m, d.p.= 60 –70 μm .
- le tube est rempli d'un support : Graphite (carbopack B)
- Tamis moléculaire au carbone (carbox en 1000)
- Polymères-Terre de diatomées (Chromsorb P)- Silice-Alumine - Zéolithes.



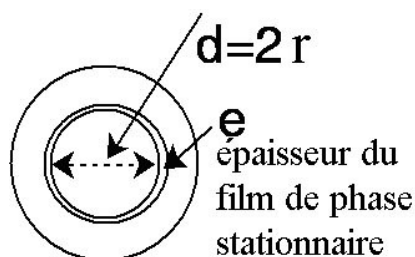
• Les colonnes capillaires (à tube ouvert)

Colonnes tubulaires ouvertes formées d'un tube de métal, de verre, de silice fondue ou de quartz.
 d.i.=0,1 – 0,53 mm, L=5 –100 m, (25 m) enroulée en spirales de $\varnothing \approx 15$ cm.
 La phase stationnaire (P. S) tapisse les parois internes, sous forme d'un film. $e_f = 0,1-5,5 \mu\text{m}$



Donc le temps d'analyse augmente si :

- Le diamètre interne de la colonne diminue.
- L'épaisseur du film de la phase stationnaire augmente.



$$V_m = \pi r^2 L \quad V_s = 2\pi r L e \quad d = 2r$$

$$\beta = \frac{V_m}{V_s} = \frac{\pi r^2 L}{2\pi r L e} = r/2e \quad \beta = \frac{d}{4e}$$

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

- Les colonnes capillaires, se différencient entre elles par les caractéristiques de la phase stationnaire qui tapisse leur paroi interne : WCOT - SCOT - PLOT.

- **WCOT** (Wall-coated open tubular column) : ou la phase stationnaire forme une pellicule liquide à l'intérieur du tube.
- **PLOT** (Porous-layer open tubular) : la phase stationnaire solide est déposée en couche mince directement sur la paroi de la colonne.
- **SCOT** : (Support-coated open tubular) column: le support inerte solide est déposé en couche mince et est imprégné de phase stationnaire liquide.

- Les nouvelles colonnes **WCOT**, sont en silice fondue (très pure) (**FSOT** : Fused-Silica Open Tubular column) recouvert d'une gaine extérieure en polyimide (thermiquement résistant).

Tableau 1 : Propriétés et caractéristiques de colonnes de chromatographie gazeuse

Caractéristiques	Type de colonne			
	FSOT	WCOT	SCOT	Remplie
Longueur en mètre	10-100	10-100	10-100	1-6
Diamètre interne en mm	0,1-0,3	0,25-0,75	0,5	2-4
Efficacité, plateaux/mètre	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Taille de l'échantillon, µg	10-75	10-1000	10-1000	10-106
Vitesse relative	rapide	rapide	rapide	lente
Inertie chimique	La meilleure			la moins bonne

❖ La Phase Stationnaire Liquide

En chromatographie gaz liquide C.G.L, la phase stationnaire liquide est immobilisée dans une colonne. Elle doit présenter les propriétés suivantes :

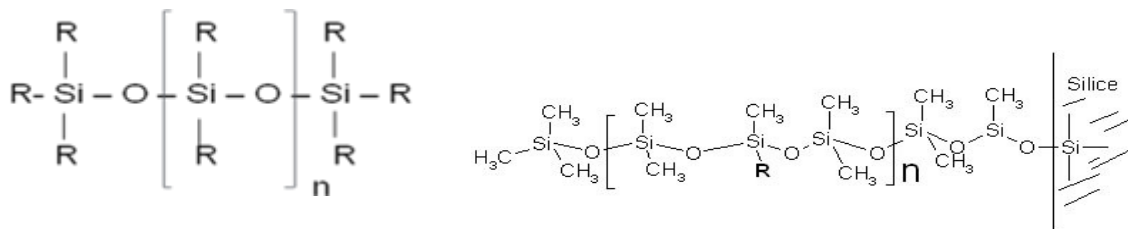
- ✓ Faible tension de vapeur (idéalement, le point E_b du liquide doit être au moins à $100\text{ }^\circ\text{C} >$ à la T_{\max} d'utilisation de la colonne).
- ✓ Stabilité thermique.
- ✓ Inertie chimique.

* Quelques phases stationnaires très utilisées

Le tableau (2) fournit une liste des phases stationnaires les plus utilisées dans les colonnes remplies et capillaires en chromatographie en phase gazeuse ; elles sont classées par ordre de polarité croissante. La polarité de la colonne dépend de la phase greffés ou le pourcentage de R .

Cinq des liquides sont des polysiloxanes, qui ont la structure générale :

❖ Polysiloxanes :



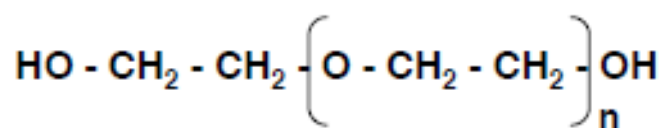
R = Me : polydiméthylsiloxane (OV1 ou SE30) apolaire.

Possibilité de substituer des groupes Me par R = Ph (5%, 50%,...), $C_3H_6CF_3$, C_3H_6CN d'une polarité élevé .

Tableau 2 : les phases stationnaires les plus utilisées

Phase stationnaire	Nom commercial	T _{max} (C°)	Utilisation habituelle
Polydiméthylsiloxane	OV-1,SE-30	350	Phase non polaire à usage général ; hydrocarbures ; aromatiques polynucléaires; médicaments ; stéroïdes ; PCB
5% phényl-polydiméthylsiloxane	OV-3,SE-52	350	Ester méthyliques d'acides gras ; alcaloïdes ; médicaments ; composés halogénés.
50% phényl-polydiméthylsiloxane	OV-17	250	médicaments ; stéroïdes ; pesticides ; glycols
50%trifluoropropylpoly Diméthylsiloxane	OV-210	200	chloroaromatiques ; nitroaromatiques ; alkylbenzène substitués.
Polyéthylène glycol	Carbowax 20M	250	acides libres ; alcools ; éthers ; huiles essentielles ; glycols.
50%cyanopropylpoly diméthylsiloxane.	OV-275	240	acides gras polyinsaturés ; acides de la colophane ; acides libres ; alcools.

❖ Polyéthylène glycol (PEG) : Carbowax



❖ Greffage d'une phase stationnaire :

On effectue une liaison covalente entre la fonction silanol libre du support (C. remplie ou la surface de proie interne de C. capillaire) et la fonction terminale réactive de la phase stationnaire. Le griffage est obtenu à haute température il conduit à une forte liaison avec la surface --> stabilité de la colonne.

❖ **Imprégnation du support par la phase stationnaire :**

On dissout la phase stationnaire dans un solvant et on mélange la solution avec le support nu, puis on évapore le solvant, le taux d'imprégnation correspond à la masse en g de la phase stationnaire. Plus le taux d'imprégnation est bas, plus la rétention est faible.

❖ **Phase Stationnaire Solide (Chromatographie Gaz/Solide) :**

Matériau adsorbant (silice ou alumine) déposé sous forme de fines particules très fines sur la paroi interne des colonnes capillaires : **PLOT** (Porous Large Open Tubular). Pour séparation de gaz (N₂, CO, CO₂) et hydrocarbures très légers.

e) **Détecteurs :**

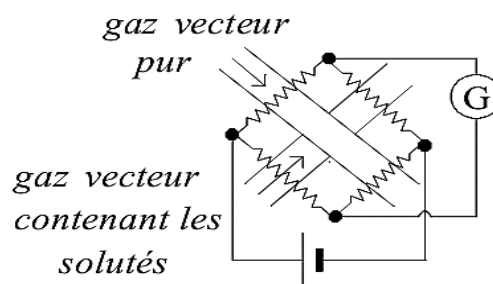
- Placés à l'extrémité des colonnes, les détecteurs décelent la présence de substances dans le gaz vecteur au fur et à mesure de leur élution.
- Le choix du détecteur se fait en fonction de leur sensibilité et de leur spécificité.

Performances du détecteur :

Ils doivent de plus présenter un faible temps de réponse, une bonne reproductibilité, un domaine de linéarité étendu ; même pour des concentrations plus élevées, le signal doit être proportionnel aux quantités de substances présentes. Il est également nécessaire qu'il puisse être porté à des températures aussi élevées que les colonnes pour éviter qu'à leur contact les vapeurs se condensent.

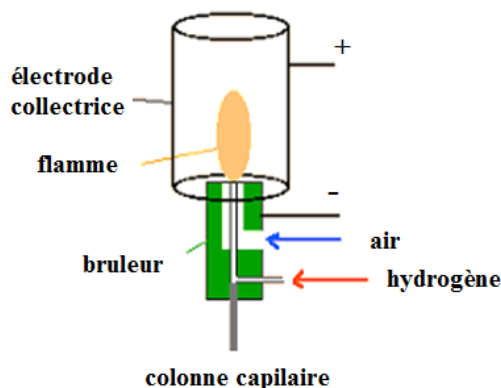
1) Détecteur à conductibilité thermique (TCD) ou Catharomètre

- Mesure des variations de la conductibilité thermique du gaz vecteur.
- La conductibilité d'un gaz vecteur est constante, en présence de molécules étrangères et en fonction de leur quantité cette conductibilité diminue.
- Universel.



2) Détecteur à ionisation de flamme : F.I.D (flamme ionisation detector)

Le gaz vecteur arrive dans une flamme d'hydrogène brûlant dans l'air. Lorsque des molécules organiques sont présentes dans le gaz le nombre d'ions formés augmentent produisant une forte intensité de courant. Le courant d'ions proportionnels à leur nombre est recueilli par électrodes et transmis après amplification à l'enregistreur.



- C'est actuellement le détecteur le plus employé, il peut déceler pratiquement tous les composés combustibles c'est-à-dire organiques (quasi-universel).

3) Détecteur par capture d'électron : E.C.D (électron capture detector)

Le gaz vecteur après avoir traversé la colonne arrive au détecteur où se trouve une source ionisante émettant des électrons de forte énergie, ceci provoque la formation d'électrons. Ces électrons sont collectés par les électrodes auxquelles est appliquée une différence de potentiel. Un courant est ainsi produit. Lorsque le gaz vecteur contient des substances électrophiles, les électrons sont captés et il se forme des ions négatifs ($AB + 1e^- \rightarrow AB^-$) \Rightarrow le courant diminue. Ils sont spécifiques des composés halogénés, soufrés, phosphorés.

- On procède actuellement au couplage C.P.G avec la spectrométrie de masse, permettant ainsi une identification plus sûre des substances. C.P.G/S.M, aussi avec la spectroscopie infrarouge (C.P.G/I.R).

2-2 Choix des conditions opératoires :

La bonne séparation des substances dépend essentiellement de leurs volumes ou distances de rétention et de la largeur de leurs pics.

Lorsque l'on désire améliorer une séparation, il est donc nécessaire d'agir sur ces grandeurs

- ✓ **Température** = on peut opérer à température constante, comme on peut faire varier la température. Pour certains mélanges la séparation peut se faire en seule opération à température constante, souvent dans d'autres mélanges les distances de rétention des

composés sont très différentes les uns des autres, dans ce cas la programmation de température permet d'obtenir de bonnes séparations. La chromatographie est commencée à une température suffisamment basse pour séparer correctement les composés les moins retenus, puis s'élève progressivement pour permettre l'élution des autres substances dans des temps plus rapides et sous forme de pics étroits.

- ✓ **Vitesse de la phase mobile** = nous avons montré lors de l'étude de la théorie cinétique, que la courbe de Van-Deemter permet de définir la valeur optimale de la vitesse d'écoulement de la phase mobile. Pour cette valeur optimale, la H.E.P.T est la plus basse et la colonne présente le plus grand nombre de plateaux théoriques.
- ✓ **Caractéristiques de la colonne** = la colonne intervient dans les séparations par sa longueur et sa composition.
- ✓ **Longueur de la colonne** : toutes les conditions précédentes, de température et de vitesse d'écoulement de la phase mobile étant considérés comme optimales, le nombre de plateaux théoriques est évidemment fonction de la longueur de la colonne. Par conséquent toute augmentation se traduit par un nombre de plateaux N supérieur.
- ✓ **Composition de la colonne** : la phase stationnaire doit être bien choisie pour prétendre à une bonne séparation.
- ✓ **Préparation de l'échantillon** :
 - 1) **Formation de dérivés** : L'**injection** directe dans le chromatographe de certains solutés ne permet pas toujours d'obtenir des séparations satisfaisantes quelles que soient les modifications tentées sur les facteurs précédents.
 - ✓ Aussi est-il nécessaire de recourir à la transformation de substances, afin d'obtenir des dérivés beaucoup plus facilement séparables. Ce procédé est utilisé dans plusieurs cas :
 - ✓ Lorsque le point d'ébullition des substances est trop élevé : la formation d'ester ou d'amide facilite ainsi la chromatographie de dérivés carboxyliques peu volatils tels les acides aminés.
 - ✓ Pour modifier la polarité de composés trop polaires qui traînent sur les colonnes rendant toute interprétation quantitative impossible, dérivés hydroxylés, sucres etc.....

- ✓ Pour augmenter la stabilité de composés fragiles aux températures nécessaire à leur séparation : hormones stéroïdiennes.
- ✓ Pour améliorer la sensibilité et spécificité de la détection : formation de dérivés halogénés permettant la détection par capture d'électrons.
- ✓ Les méthodes généralement mise en œuvre relèvent le plus souvent de trois types : La silylation, L'alcoylation et L'acylation.
- ✓ **Silylation** : sous ce terme général, on regroupe un certain nombre de réactions ayant pour but de fixer un groupe triméthylsilyl $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ - T.M.S sur une molécule en le substituant à un hydrogène mobile ; cette substitution en empêchant la formation de liaisons hydrogène diminue la polarité des molécules, donc leur possibilité d'association, et augmente ainsi leur volatilité.
- ✓ Réactifs utilisés : se sont des dérivés du triméthyl silane $(\text{CH}_3)_3\text{Si} - \text{H}$ triméthylchloro silane T.M.C.S $(\text{CH}_3)_3\text{Si} - \text{Cl}$
- ✓ $(\text{CH}_3)_3\text{Si} - \text{Cl} + \text{R} - \text{H} \rightarrow (\text{CH}_3)_3\text{Si} - \text{R} + \text{HCl}$
- ✓ $\text{R} - \text{H}$ est un composé à hydrogène mobile : alcool, phénol, amine. Cette réaction s'effectue en milieu pyridiné ou en présence de diméthylformamide pour neutraliser HCl formé.
- ✓ **Alcoylation** : cette réaction a pour objet le remplacement d'un hydrogène mobile par un radical alcoyle et la transformation des alcools en éthers et des acides en esters.
- ✓ $\text{R} - \text{OH} \rightarrow \text{R} - \text{O} - \text{R}'$
- ✓ $\text{R} - \text{COOH} \rightarrow \text{R} - \text{COO} - \text{R}'$
- ✓ **Acylation** : les acides et surtout leurs précurseurs chlorures d'acide ou anhydrides d'acide donnent naissance au cation acylium $\text{R} - \text{C}^+$ qui réagit avec les alcools et les amines en les transformant en esters ou amides. \parallel
- ✓ $\text{R}' - \text{OH} + \text{R} - \text{CO Cl} \rightarrow \text{R} - \text{C}(\text{O}) - \text{O} - \text{R}' + \text{HCl}$
- ✓ $\text{R}' - \text{NH}_2 + \text{R} - \text{CO Cl} \rightarrow \text{R} - \text{CO} - \text{NH} - \text{R}' + \text{HCl}$

3 -Classification des phases stationnaire :

a) Indice de Kovats et droite de Kovats :

Pour identifier un composé dans un mélange complexe constitué des composés appartenant à une série analogue des alcanes, cétones , alcoolsext . L'objectif est de caractériser la rétention de différents solutés sur une phase stationnaire. Les Log Tr' croissant linéairement avec le nombre des carbonnes.

Pour un alcane linéaire. La droite de Kovats est établie sur une série **d'homologues** et dans des conditions opératoires fixées en **régime isotherme et isobare**. $\text{Log } t_{R'} = an+b$

- ✓ Pour un composé X : La méthodes est basée sur les Tr' des deux alcanes à n et n+1 qui encadrent X sur le chromato $I_X = 100n \exp : n=5$ pentane , $I_X = 100 \times 5 = 500$. Il existe des tables de I_X afin d'identifier un composé inconnu. La figure suivante montre la droite de Kovats des 6 alcanes de C4 à C9 : **$\log t'_{R'} = an + b$** La pente de la droite dépend de la colonne et du réglage du chromatographe. L'indice de rétention ne dépend que de la phase stationnaire. Indice de rétention du toluène =749.

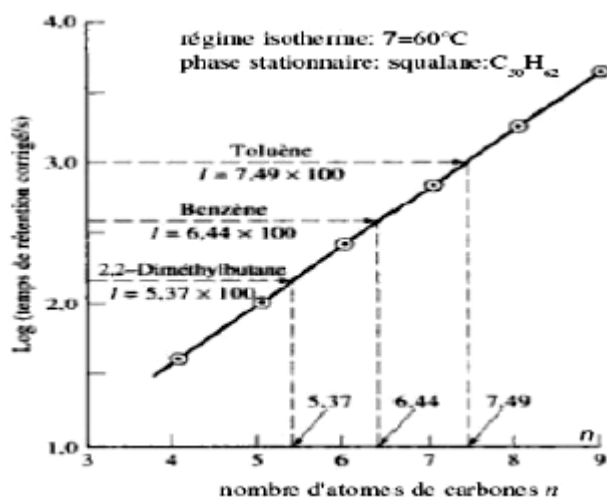


Figure 27.

Sans changer les réglages de l'appareil, on injecte un composé inconnu X. Le nouveau chromatogramme va permettre de calculer l'indice de rétention de Kovats de X sur la colonne considérée. Il est défini comme étant le produit par 100 du nombre de carbonnes de « l'alcane linéaire » ayant le même temps de rétention réduit que le composé inconnu injecté.

Deux méthodes sont utilisées pour trouver ce nombre de carbones :

- la méthode graphique qui s'appuie sur la droite de Kovats,
- la méthode basée sur le temps de migration réduit des deux alcanes qui encadrent le produit X sur le chromatogramme : Pour un composé X : $I_x = 100n$, avec n le nombre fictif d'atomes de carbones de l'alcane linéaire équivalent où :

$$I_x = 100 \times n + 100 \frac{\log t'_{R(x)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}}$$

A la différence de la droite de Kovats, les indices de rétention ne dépendent que de la phase stationnaire et non de la colonne et des conditions opératoires d'analyse.

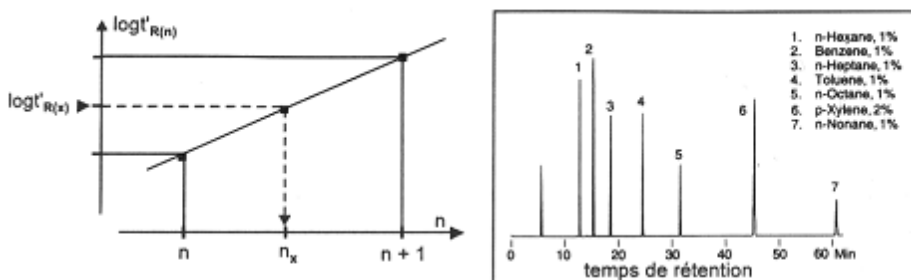


Figure 28.

b) Constantes de phases stationnaires :

Pour caractériser le comportement d'une phase stationnaire ou définir sa polarité globale on compare les indices de Kovats de cinq composés de types structuraux différents sur la phase étudiée d'une part et sur le squalane d'une autre part. Le squalane est la phase prise comme référence car c'est la seule phase apolaire qui est reproductible car c'est un produit pur. Les cinq constantes de **Mac Reynolds** pour une phase donnée sont obtenues en calculant les différences entre l'indice de Kovats sur squalane et sur la phase étudiée.

$$\text{Cste de Mc Reynolds} = \Delta I = I_{\text{phase}} - I_{\text{squalane}}$$

La somme de ces 5 valeurs calculées a été retenue pour définir la polarité globale de la phase testée. Ces constantes, qui ont un lien avec la structure des molécules, permettent d'apprécier les forces d'interaction soluté/phase stationnaire en relation avec quelques grandes classes de composés.

4-Application :

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode :

- D'analyse qualitative par les t_R et V_R .
- D'analyse quantitative par exploitation de la surface des pics

- Les applications sont nombreuses, en particulier dans le domaine pharmaceutique :

- Contrôle des **matières premières** : recherche des impuretés en particulier les solvants résiduels utilisés dans les étapes de purification de matières premières.
- Contrôle des **préparations pharmaceutiques** ou produit finis: identification et dosage du principe actif.
- Etude de la stabilité des matières premières et du produit fini avec la recherche d'éventuels produits de dégradation.
- Contrôle des gaz médicaux (O_2 , N_2O , N_2).

Chapitre V : La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).

1. Généralités :

La chromatographie liquide haute performance est une forme moderne des méthodes chromatographiques dont les intitulés sont rassemblés sous le vocable général de chromatographie liquide sur colonne, qui quel que soit le phénomène physique invoqué (adsorption, partage, échange d'ions...) est assez peu utilisée en raison :

- de la lenteur des séparations
- de l'absence de détection aisée et rapide

La mise au point de phases stationnaires de granulométrie fine et homogène a permis d'améliorer l'efficacité de la chromatographie et d'accélérer considérablement la vitesse des analyses (ordre de grandeur des durées 5 min à 1h pour une CLHP et 1 h à 20 h pour une chromatographie liquide « ancienne »). De plus le couplage à la colonne de chromatographie de détecteurs fonctionnant selon plusieurs principes a permis de simplifier les manipulations.

2- Chromatographie classique

2-1 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 varier de quelques centimètres à un mètre et parfois plus. Le diamètre moyen est voisin du quinzième de la hauteur ; 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. 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. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas **figure 26** Elle présente cependant plusieurs inconvénients :

- de grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution
- la durée de l'élution est généralement très grande
- la détection des composés exige une attention constante

Elle est adaptée à la purification de faibles quantités de produit, lorsque les conditions opératoires sont au point. Cependant, la méthode étant très empirique, sa mise au point nécessite souvent de nombreux essais.

- 1 à 4 cm **diamètre interne**
- 15 à 20 cm **de longueur**
- **Le diamètre des particules**
150 et 200 μm .

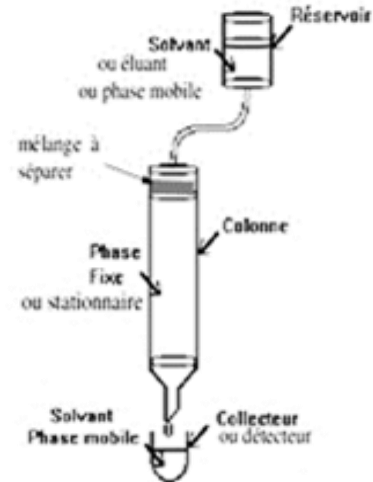
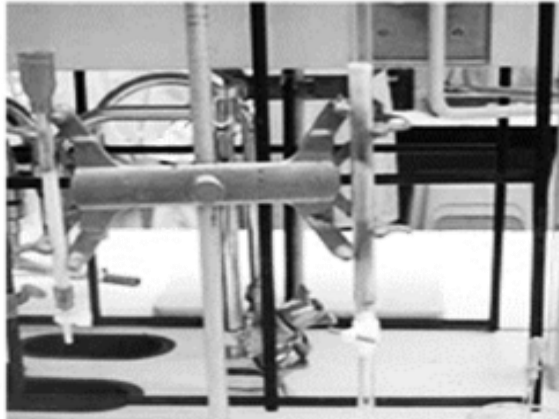


Figure 28: Chromatographie classique sur colonne.

2-2 Détection des substances éluées :

Au fur et à mesure de sa sortie, l'éluant est recueilli à l'extrémité de la colonne par petites fractions de volume bien déterminé qui sont ensuite systématiquement soumises à l'analyse **figure 29**.

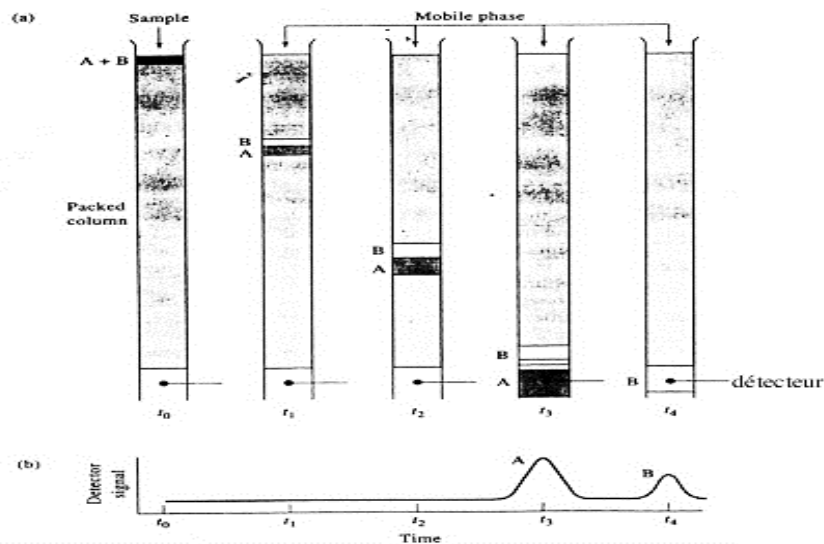


Figure 29 : Séparation des constituants d'un mélange par chromatographie d'éluion sur colonne.

La chromatographie liquide sur colonne utilisée actuellement de nos jours se distingue de la chromatographie classique par les points suivant :

- diamètre interne plus petit 2 à 8 mm.
- phases stationnaires de granulométrie fines et régulière 3 à 10 μ m.
- pression d'entrée élevée qui nécessite l'utilisation d'une pompe.
- contrôle du débit de la phase mobile.
- introduction de faible quantité de substances.
- détecteurs spécifiques et sensibles.
- rapidité des analyses.
- résolution élevée.

En raison de ces différentes caractéristiques, cette nouvelle technique a été appelée : **Chromatographie liquide haute performance, haute pression, ou haute résolution (HPLC)**. Le terme général de chromatographie liquide (C.L) est actuellement adopté.

3- Principe Général De La Chromatographie :

Quel que soit le genre de chromatographie effectué, la séparation des composés d'un mélange est basée sur la distribution différente de ces composés entre une phase stationnaire et une phase mobile. Les composés seront séparés uniquement si certains d'entre eux sont plus fortement retenus par la phase stationnaire . La chromatographie liquide haute performance est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier. Elle met en oeuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion.

4- Appareillage :

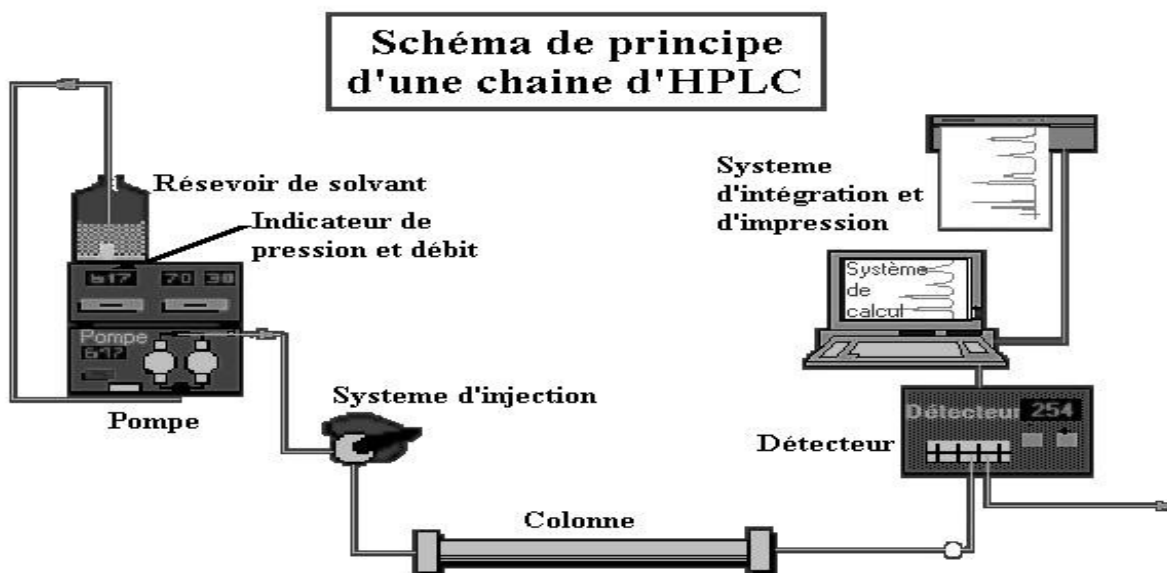


Figure 30 : Appareillage de chromatographie CLHP.

4-1 Les réservoirs de phase mobile :

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile.
- Des réservoirs de 0,5 à 2 litres équipent en général les appareils les plus courants.
- Des volumes importants qui peuvent aller jusqu'à 10 litres sont réservés aux chromatographies préparatives (appareillage différents dans ce cas).
- les réservoirs doivent être étanches afin d'éviter l'évaporation des solvants ou leur contamination par la vapeur d'eau de l'atmosphère.
- La phase mobile doit être filtrée et dégazée pour éliminer les poussières et chasser les gaz dissous afin d'éviter la perturbation de la chromatographie et les systèmes de détection par les bulles formées par ce gaz.
 - **Techniques de dégazage :**
 - Barbotage à l'hélium : ce gaz, très peu soluble, permet de déplacer l'oxygène et l'azote dans la plupart des solvants.



- Filtration sous vide : cette technique permet en outre de se débarrasser des petites impuretés qui pourraient se trouver dans le solvant.
- Bain ultrasonique : permet d'éliminer environ 50 % de l'air contenu dans la phase mobile.

4-2 Pompe :

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

➤ ***Elution en mode isocratique :***

Dans ce type d'élution, la composition de la phase mobile reste constante tout au long de l'analyse chromatographique.

- Elle peut être préalablement préparée et déposée dans un seul réservoir.
- Certains appareils permettent cependant de l'obtenir instantanément par mélanges de solvants provenant de réservoirs différents. La proportion de chaque liquide est alors réglée par des vannes dont l'ouverture est réglable.
- On utilise généralement soit un mélange binaire type eau / méthanol, eau / acétonitrile, etc, soit un mélange ternaire eau / acétonitrile / méthanol.

➤ ***Elution en mode gradient (une élution avec programmation de solvant)***

- L'utilisation d'un mélange de solvants dont la composition est variable dans le temps
- La modification de la polarité de la phase mobile nécessite la présence des systèmes munis de dispositifs de programmation qui permettent de faire varier dans le temps la composition des mélanges de solvant qui constituent la phase mobile
- Les appareils modernes proposent des systèmes gérés par microordinateurs qui permettent de réaliser des gradients par mélange de 2 à 4 solvants constants, la pression peut atteindre environ 500 bars.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min . Les pompes les plus utilisées sont les pompes de types piston avec lesquelles les débits sont constants, la pression peut atteindre environ 500 bars.

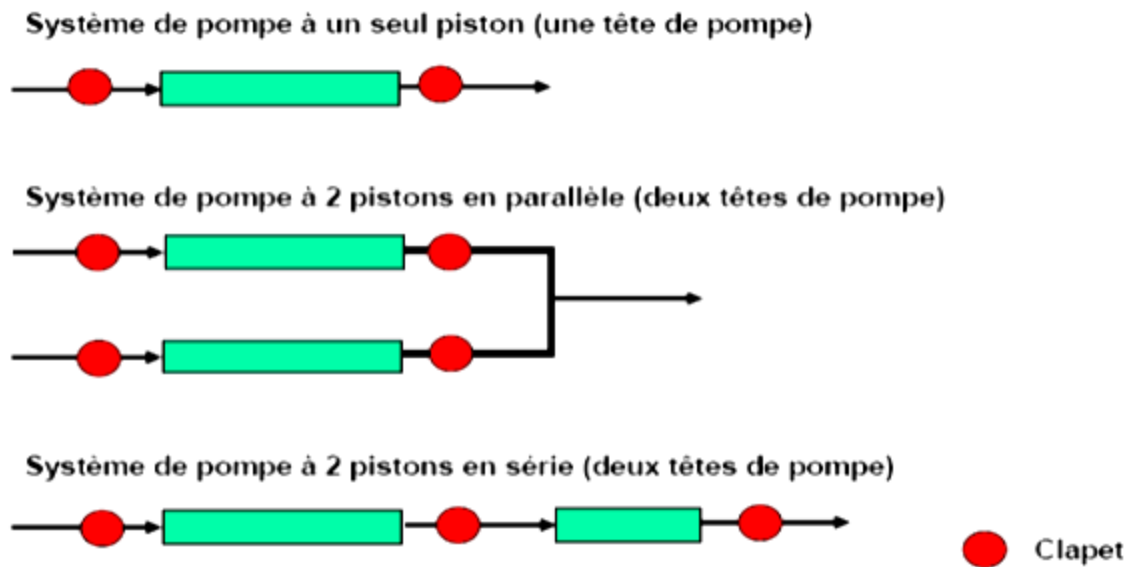


Figure 31

4-3 Injecteur :

Le type d'injecteur le plus courant consiste en une Vanne à boucles d'échantillonnage. On introduit d'abord l'échantillon dans une boucle de volume connu ; après rotation de la vanne, la phase mobile entraîne l'échantillon en tête de la colonne. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

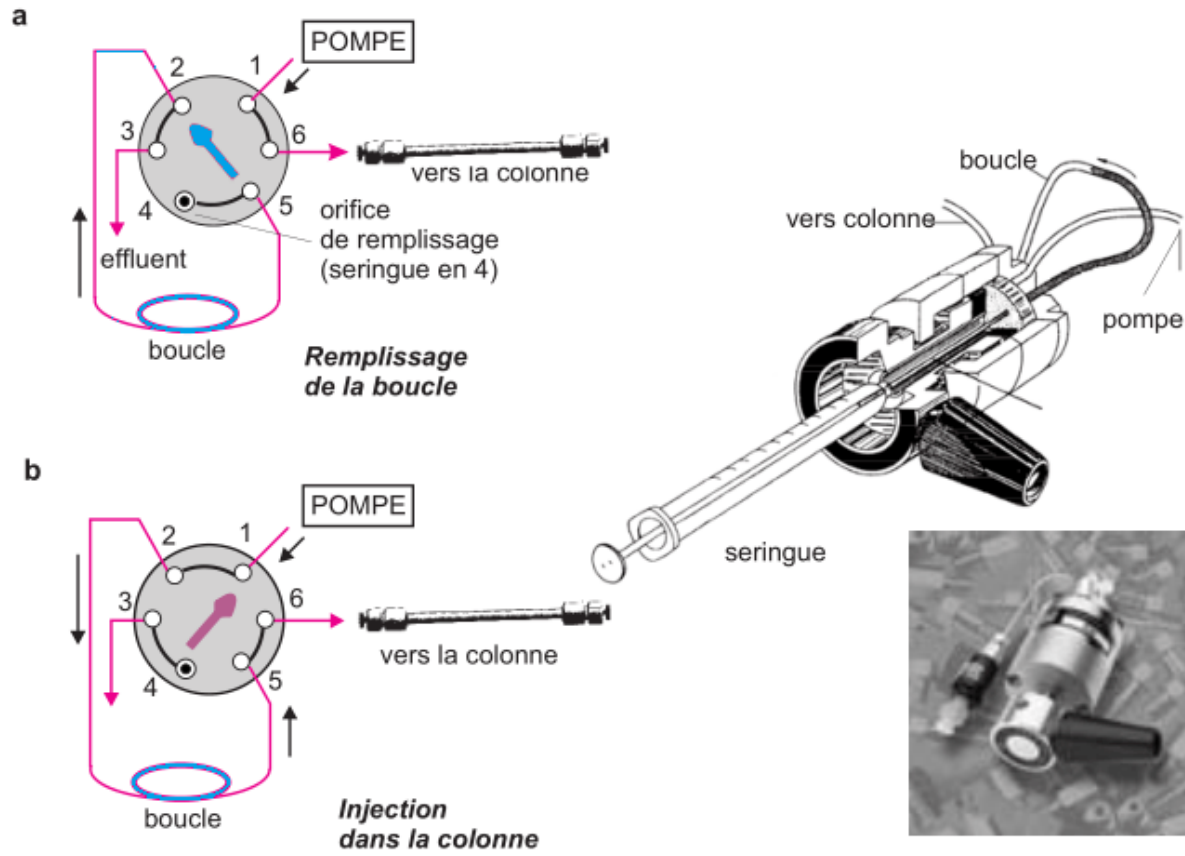


Figure 32.

4-4 Colonne :

Les colonnes utilisées en H.P.L.C se caractérisent par leur géométrie et par la nature des phases stationnaires qu'elles contiennent.

Les colonnes sont en acier inoxydable

- diamètre intérieur **2 à 8 mm**
- une longueur de **10 à 30 cm**.



Figure 33.

Capables de résister aux fortes pressions. Le remplissage (en **silice, silice greffée ou particules polymériques**) a une granulométrie de **3, 5, ou 10µm**. Depuis peu sont apparues sur le marché des micros colonnes à haute performance et à grande vitesse. Leur diamètre interne est de 1 à 4,6 mm et leur longueur de 3 à 7,5 cm. Ces colonnes qui sont remplies de particules de 3 à 5 µm possèdent jusqu'à 100 000 plateaux par mètre et présentent l'avantage de la rapidité et d'une consommation minimale de solvant, car les solvants utilisés en H.P.L.C sont très coûteux.

✓ Colonnes de garde

On place souvent une courte colonne de protection avant la colonne afin d'en augmenter la durée de vie de notre colonne par élimination des impuretés contenus dans les solvants, et aussi des espèces qui se lient de manière irréversible à la phase stationnaire. La composition de la colonne de garde doit être semblable à celle de la colonne analytique.

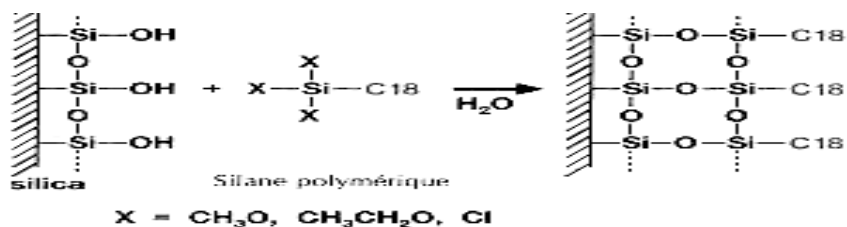
- La Phase Stationnaire :

a) La phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires 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.

b) La phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffées 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.

4-5 Les détecteurs :

Ces systèmes de détection sont des éléments indispensables au système chromatographique CLHP. Ils permettent de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration instantanée des différents solutés d'un mélange à analyser.

Il est impératif de connaître exactement le type d'analyses à effectuer pour choisir le détecteur adapté. Cependant, depuis quelques années, de nouveaux modes de détection sont apparus. Le plus couramment utilisé est le couplage de la CLHP avec un spectromètre de masse constituant alors un détecteur universel et un puissant moyen d'identification. Les principaux détecteurs utilisés en HPLC sont :

- ✓ **Photomètre UV-Visible** : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne.
- ✓ **Réfractomètre différentiel** : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne.
- ✓ **Détecteur fluorimétrique**: Il mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. Ce procédé sert pour les composés fluorescents ou les dérivés fluorescents de certains composés.
- ✓ **Détecteur électrochimique** : Cette méthode de détection ne s'adresse qu'à la détection de molécule douée de propriétés oxydoréduction.
- ✓ **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).

4-5 L'enregistreur :

Il s'agit en fait d'un petit ordinateur qui récupère toutes les données issues des détecteurs, trace **les chromatogrammes** et intègre la surface des pics. Il imprime un rapport d'analyse donnant les temps de rétentions et les surfaces de chaque pic.

5- Choix Du Procédé Chromatographique :

La connaissance des **poinds moléculaires**, des **polarités et des caractères ioniques** des solutés va orienter le choix du procédé chromatographique à mettre en œuvre pour réaliser leur séparation (voir chapitre II).

5-1 La Chromatographie D'adsorption

- En chromatographie d'adsorption : les analytes sont adsorbés à la surface d'un support polaire (un solide polaire finement divisé).
- Les phases stationnaires utilisées en chromatographie d'adsorption sont : la silice (SiO_2) et l'alumine (Al_2O_3).
- La phase mobile est usuellement un solvant organique ou un mélange de solvants organiques.

✓ **Applications :**

- La CLHP liquide-solide s'utilise surtout pour séparer des composés de masse molaire inférieur à 5000 (lipides, acides aminés, peptides).

5-2 La Chromatographie De Partage (Liquide-Liquide)

Les constituants d'un mélange se partagent entre les deux phases l'une phase mobile et l'autre stationnaire Ce phénomène est dynamique, les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre ; ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier. À ce moment le rapport des concentrations est égal au rapport des répartitions dans les deux phases ou coefficient de partage K.

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

La chromatographie de partage peut être divisée en :

- ❖ Chromatographie liquide – liquide
- ❖ Chromatographie liquide – phase greffée.

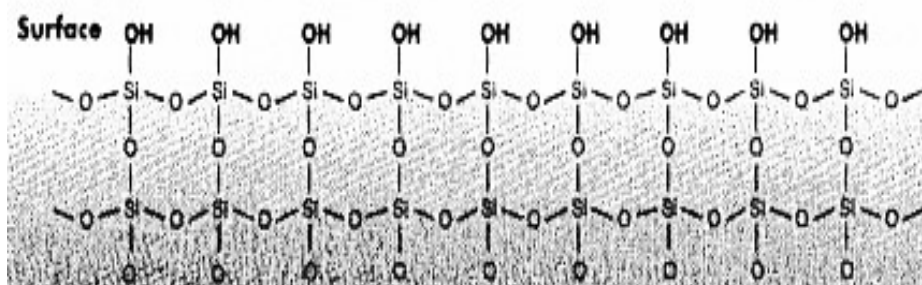
La différence entre ces techniques réside dans la manière de fixer la phase stationnaire sur les particules du support.

En chromatographie liquide – liquide, la phase stationnaire est un solvant qui est immobilisé par adsorption physique sur la surface des particules du support,

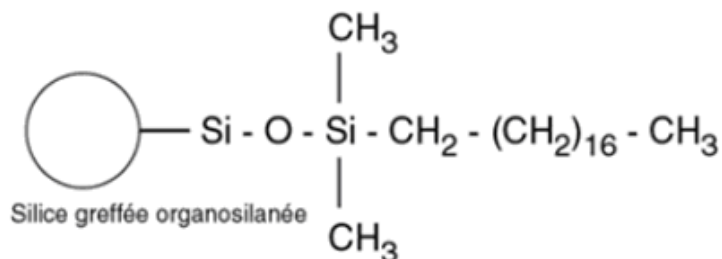
En chromatographie liquide – phase greffée, la phase stationnaire est fixée au support par liaison chimique. Ce qui permet d'augmenter la stabilité des phases stationnaires. à l'origine, les chromatographies de partage étaient exclusivement du type liquide – liquide, actuellement celles-ci présentent certains inconvénients comme la dissolution de la phase stationnaire dans la phase mobile. Ainsi la chromatographie liquide – phase greffée est devenu prédominante.

✓ **Colonnes de chromatographie liquide – phase greffée :**

Les supports de la majorité des matériaux de remplissage en chromatographie liquide – phase greffée sont préparés à partir de silice ou de dérivés à base de silice.



- ✓ la plupart des supports à phase greffée sont constitués de organosiloxane ($\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$) formés par la réaction d'un organochlorosilane avec les groupements $-\text{OH}$ (*préalablement formé sur la surface de particule de silice par hydrolyse dans l'acide HCl dilué et chaud*).
- ✓ La plupart du temps, le groupement R du siloxane est une chaîne en C_8 (n-octyle) 8 atomes de carbones, ou en C_{18} (n-octadecyle) 18 atomes de carbones.



Silice greffée par un alkyl à 18 atomes de carbones C_{18}

5-3 La Chromatographie Sur Echangeurs D'ions

Dans la chromatographie échangeuse d'ions, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la charge nette. Pour cela, on utilise des résines chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations). Les principaux groupements utilisés pour fabriquer des résines chargées sont :

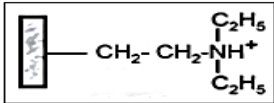
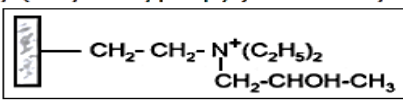
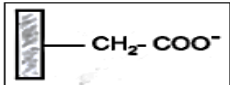
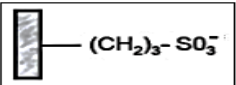
Résines échangeuses d'anions (chargées positivement)	
Faible (Pka \approx 10 d'où pH \leq 9)	Fort (Pka élevé)
Diéthylaminoéthyl (DEAE) 	Diéthyl(2 hydroxypropyl)aminoéthyl (QAE) 
Résines échangeuses de cations (chargées négativement)	
Faible (Pka \approx 4 d'où pH \geq 5)	Fort (Pka \approx 2)
Carboxyméthyl (CM) 	Sulphopropyl (SP) 

Figure 34 : Type De Résine.

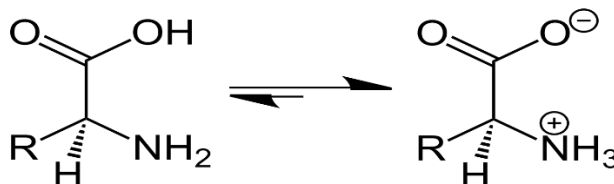
5-3-1 Principe.

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

- dans le cas d'une base (échangeur d'anions), le pH doit être inférieur au pKa du groupement ionisable (exemple : le pKa du groupement diéthylaminoéthylammonium est 9,5)
- dans le cas d'un acide (échangeur de cations), le pH doit être supérieur au pKa du groupement ionisable (exemple : le pKa du groupement carboxyméthyl est 4)

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

le point isoélectrique ou potentiel hydrogène isoélectrique est le pH auquel une molécule est sous forme forme zwitterionique ou ion mixte.



le pH pour lequel la molécule est électriquement neutre.

- A un pH supérieur au pI, une protéine aura une charge nette négative.
- Un pH inférieur au pI rend les protéines chargées positivement (assez de H⁺)

5-4 La Chromatographie D'exclusion :

En chromatographie d'exclusion, la séparation est basée sur la taille 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. Cette technique est encore appelée *filtration sur gel* ou *perméation de gel* selon la nature de la phase mobile (aqueuse ou organique).

- La filtration de gel est une chromatographie d'exclusion sur un support *hydrophile*. Elle est utilisée pour séparer des *espèces polaires*.
- La perméation de gel est une chromatographie d'exclusion sur un support *hydrophobe*. Elle est utilisée pour séparer des *espèces non polaires*.

5-4-1- Théorie de la chromatographie d'exclusion :

Si on dépose un mélange de deux solutés A et B, dont les constantes de distribution sont respectivement égales à 0 et à 1,

A sera élué avec un volume d'éluion $V_e(A) = V_m$ et B sera élué avec un volume d'éluion $V_e(B) = V_m + V_i = V^*$.

5-4-2 Représentation des résultats :

- Soit on porte le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'éluion :

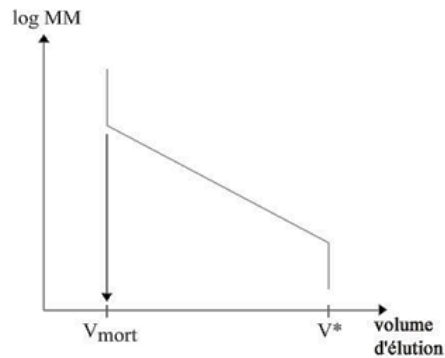
$$\log MM = f(V_e).$$

- Soit on porte le logarithme de la masse moléculaire en fonction du K, le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel :

$$\log MM = f(K),$$

Avec
$$K = (V_e - V_m) / (V_t - V_m)$$

où : V_t est le volume total (mesuré en remplissant la colonne d'eau) et V_m est le volume mort (déterminé en mesurant le V_e d'une substance que l'on sait totalement exclue).



- Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc toutes éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0).
- Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est gênée.
- Une molécule totalement incluse sera éluée avec un volume $V^* = V_m + V_i$, où V_i est le volume d'eau interne aux granules de gel.
- Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

5-4-3 Applications de la chromatographie d'exclusion :

Cette technique est très utilisée pour la séparation ou l'élimination de sels ou de petites molécules dans les solutions protéiques ;

- La détermination rapide des masses molaires, ou la distribution de masses molaires de hauts polymères ou de produits naturels. Pour la détermination de MM, il faut d'abord

étalonner la colonne avec des protéines de masse molaire connue, tracer la courbe $V_e = f(\log M)$, puis effectuer une détermination graphique.

- Détermination des constantes d'équilibre
- Cette technique est aussi utilisée comme dernière étape de purifications de produits isolés en phytochimie en utilisant le gel de **Séphadex LH20** comme phase stationnaire et un mélange de MeOH-eau à gradient croissant comme éluant.

6- Application de L'HPLC :

Le domaine d'application de la technique (CLHP) est très vaste.

- Industries chimiques et para chimiques.
- Agro-alimentaires.
- Environnement.
- Pharmacie.
- Biochimie.

Chapitre VI : La Méthode De Séparation Electrophorétique

L'**électrophorèse** est la principale des techniques utilisées en biologie pour la séparation et la caractérisation des molécules. Elle a quelques applications en chimie, mais principalement utilisée en biochimie ou biologie moléculaire pour la séparation des protéines ou des acides nucléiques. La séparation des particules se fait en fonction de leur charge électrique et pour des charges identiques, en fonction de leur taille.

1. Définition

Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Le préfixe « électro » fait référence à l'électricité et la racine « phorèse » vient du grec phoros, qui signifie « porter d'un côté à l'autre ». L'électrophorèse est donc une technique d'analyse et de séparation basée sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champ électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ.

2. Principe :

L'électrophorèse est une technique permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective : Les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode. Pour les molécules non chargées, il n'existe pas de migration. Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces différents ions, ce qui permet leur séparation.

- Cation : **chargé +**. Attiré lors de l'électrolyse par la CATHODE (ou électrode négative)
- Anion : **chargé -**. Attiré lors de l'électrolyse par l'ANODE (ou électrode positive)

Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon. Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant.

L'ELECTROPHORESE peut donc séparer :

- Des molécules portant des CHARGES DIFFERENTES,
- Des molécules portant des CHARGES IDENTIQUES mais de TAILLES DIFFERENTES

3. Les différents types d'électrophorèses

Le choix du support est dicté par la nature des molécules à séparer et selon le support on distingue deux types d'électrophorèse :

3.1. L'électrophorèse libre, en veine liquide selon Tiselius (1937)

Une méthode ancienne (mise au point par Arne Tiselius 1937) utilisée généralement pour la séparation des grosses particules (cellules, organites); la technique est réalisée dans un tube en U de section carrée (ceci afin de pouvoir réaliser des mesures optiques au travers du tube, comme avec une cuve de spectrophotomètre) : la séparation n'est pas totale, mais les frontières qui se forment sont mises en évidence par des méthodes optiques (absorption UV, indice de réfraction, fluorescence...). Cette méthode est utilisée en recherche pour mesurer la mobilité électrophorétique et pour vérifier la pureté des protéines

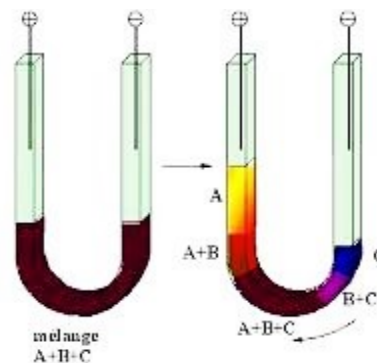


Figure 35 : L'électrophorèse en veine liquide.

3.2. L'électrophorèse sur supports poreux (électrophorèse de zone)

Ce type d'électrophorèse utilise un support poreux pour stabiliser la phase liquide. Le support doit être homogène, poreux et inerte.

a) Electrophorèse sur papier et acétate de cellulose :

Migration des molécules principalement en fonction de la charge globale et en conditions non dénaturantes, Séparation des petites molécules (acides aminés ou petites peptides) L'électrophorèse sur papier est assez peu résolutive, cette technique d'électrophorèse est surtout destinée à séparer des molécules de petite taille, dont les acides aminés. Des phénomènes d'interférence liés à la charge des acides aminés et de la cellulose du papier interviennent de façon notable.

Elle est pratique pour la séparation des acides aminés,

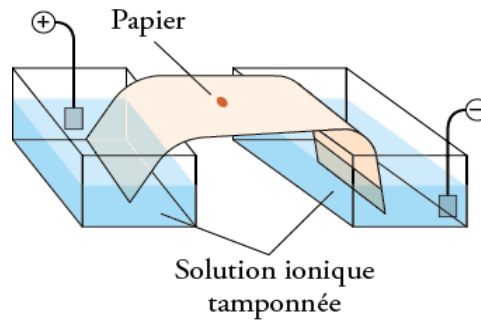


Figure 36 : L'électrophorèse sur papier .

b) Électrophorèse sur acétate de cellulose

Se fait dans des conditions proches de celles de l'électrophorèse sur papier. Les bandes d'acétate de cellulose sont fragiles, mais elles limitent la diffusion des molécules à séparer. La révélation des protéines se fait également par une réaction colorimétrique (rouge de ponceau par exemple). Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement des groupes de protéines. Elle est peu coûteuse et permet une analyse rapide des protéines sériques.

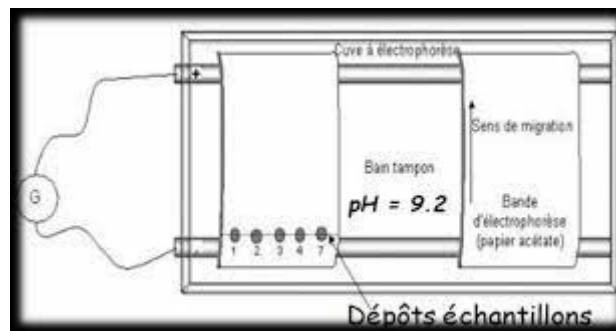


Figure 37 : L'électrophorèse sur acétate de cellulose.

c) Électrophorèse en gel :

L'électrophorèse en gel est une des méthodes de routine les plus performantes pour séparer des macromolécules, Les gels d'usage courant (polyacrylamide et agarose), ont des pores de dimensions moléculaires dont on peut spécifier la taille.

- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE est une application de l'électrophorèse de zone, elle est très utilisée pour l'étude des protéines ou pour le séquençage de l'ADN.

* Gel de acrylamide : ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) polymériser avec BIS NN'méthylène –bis-acrylamide donnant des chaines latérales linéaires.

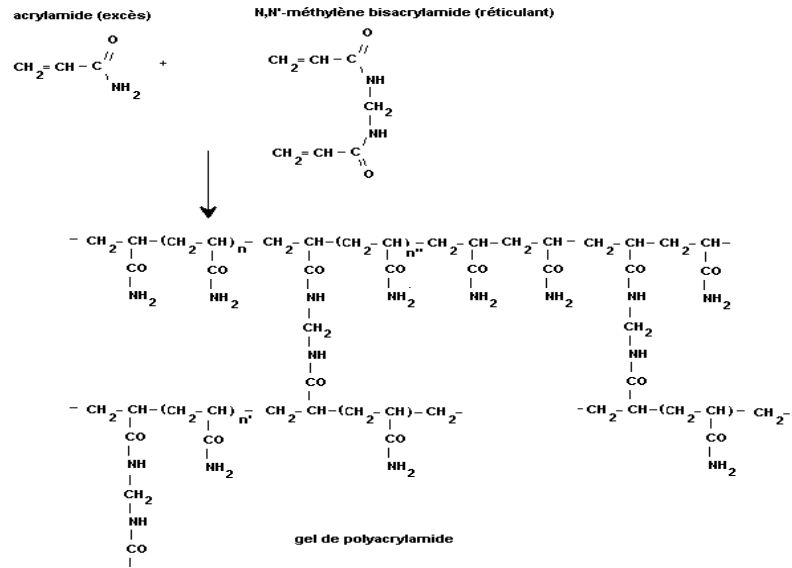


Figure 38 : gel de polyacrylamide.

Plus que le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus que la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. Par conséquent, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer. Donc, plus que la masse moléculaire du composé est élevée, plus que la migration est lente.

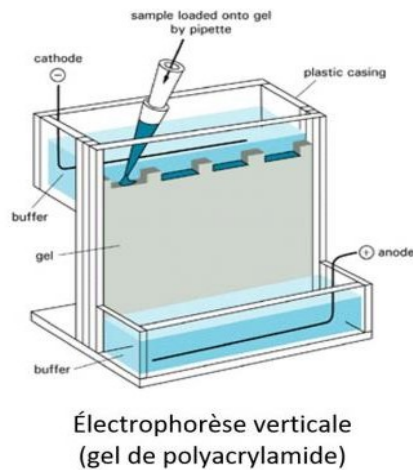


Figure 39 : électrophorèse sur gel polyacrylamide.

- Électrophorèse sur gel d'agarose

Un polysaccharide de Masse Moléculaire élevée extrait à partir d'agar, un Gel très ouvert (pores larges), ♣ Utilisé fréquemment pour de grosses molécules.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leur poids moléculaire : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

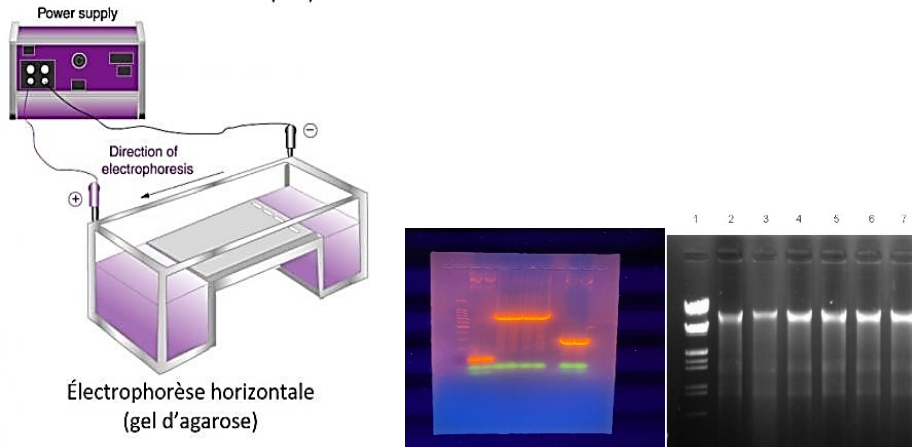


Figure 40 : Electrophorèse sur gel d'agarose.

3.3. Electrophorèse capillaire

Elle correspond à une adaptation particulière de la méthode générale d'électrophorèse. Cette méthode séparative est basée sur la migration des espèces de l'échantillon en solution porteuse d'une charge électrique globale sous l'effet d'un champ électrique au contact d'un support approprié.

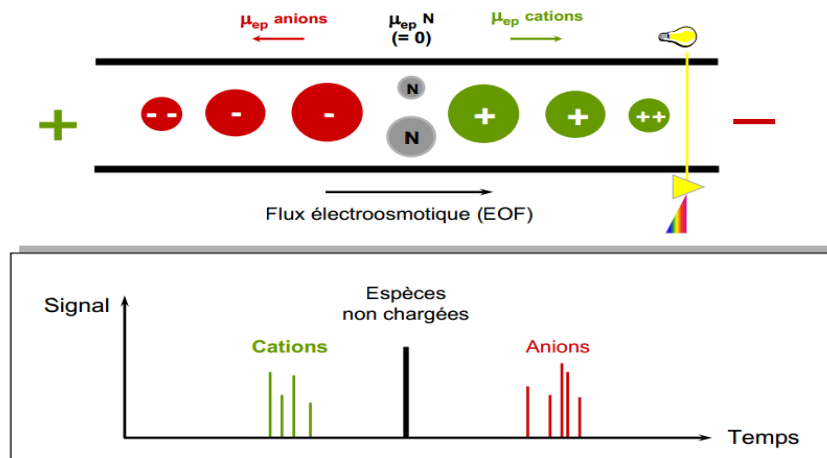


Figure 41: Electrophorèse capillaire.

En électrophorèse capillaire, le support plan de la technique est remplacé par un tube capillaire ouvert à ses extrémités, en verre de silice de très faible diamètre (15 à 150 μm). Ce capillaire d'une longueur ($L=20$ et 80 cm) est rempli d'un électrolyte tampon. (la d.d.p $\approx 600\text{V/cm}$), mais l'intensité ne doit pas dépasser une centaine de microampères afin que la puissance dissipée reste inférieure à 3 W. Pour limiter l'échauffement du capillaire, il est préférable de le placer dans une enceinte thermo statée. Un détecteur est placé près du compartiment cathodique ne sont détectées que les espèces qui se dirigent vers la cathode.

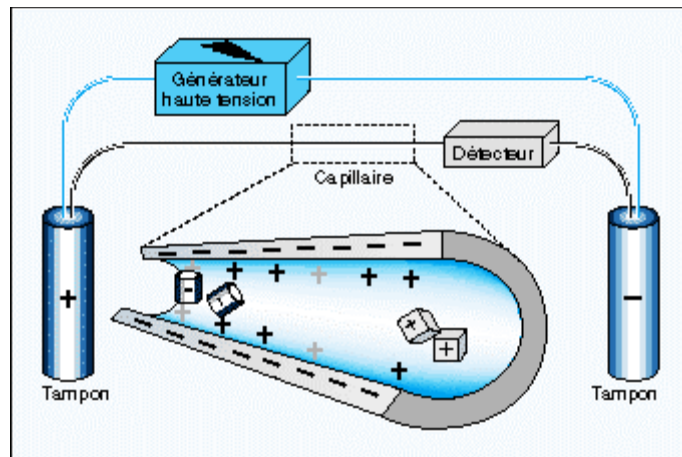


Figure 42 : Installation d'électrophorèse capillaire.

4. Application :

- ✓ Déterminer le nombre de sous-unités d'une protéine et de déterminer leur masse molaire respective.
- ✓ D'évaluer le degré de purification d'une protéine.
- ✓ De séparer des protéines pour les révéler par la technique du Western blot (réaction avec un ou des anticorps) .
- ✓ De séquencer l'ADN et de déterminer la taille de fragments d'ADN.
- ✓ De séparer des acides nucléiques pour les analyser par la technique du Northern blot (ARN) ou du Southern blot (ADN).

Références Bibliographiques :

1. *J.Tranchant ,Manual Pratique De Chromatographie En Phase Gaseuse ;Masson 1955.*
2. *J .Cazese,Encyclopedia Of Chromatography,Marced Dekker 2001 .*
3. *Paul C Sadek Illustrated Pocket Dictionary Of Chromatography, John Wiley And Sons 2004.*
4. *C-S Wu, Column Hand Book for Size Exclusion Chromatography, Academic Press 2006.*
5. *Z.Kabouche,Cours Et Exercices De Chromatographie, Université De Frères Mentouri Constantine 2007.*
6. *A.Dari, Technique Chromatographique ,Université De dar elbeidha Maroc 2016.*