

RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MUSTAPHA STAMBOULI DE MASCARA

Faculté des Sciences Exactes

Département de Chimie



Spécialité : CHIMIE

POLYCOPIE DE COURS

Identifications et caractérisations I

Présentée par:

M^{me}. SAIAH Ouiddad

**Polycopié destiné pour les étudiants de première année Master catalyse du
département de chimie**

Année Universitaire 2024/2025.

Résumé

Une chromatographie est initialement une méthode de séparation. Cette séparation a deux utilisations possibles : **purifier** et **caractériser**. On distinguera donc les méthodes chromatographiques destructives destinées à l'identification des méthodes non-destructives pouvant être utilisées en purification

Étymologiquement, chromatographie signifie l'image en couleur, puisque historiquement, les premières méthodes chromatographiques utilisées étaient faites sur support papier et servaient à séparer des mélanges. Si les produits étaient colorés, le chimiste ne faisait que constater la migration, sinon il utilisait des révélateurs colorés pour constater la migration.

La technique de chromatographie a été découverte par le botaniste russe Mikhail Tswett.

De façon générale, une chromatographie utilise une phase stationnaire, une phase mobile. Le produit qui sera chromatographié sera selon ses affinités soit plutôt attiré par la phase stationnaire (et migrera), soit par la phase mobile (et ne migrera pas). La technique de séparation est donc la conséquence d'un processus complexe d'interactions favorables ou défavorables entre le produit et les deux phases

Selon les techniques, la phase stationnaire sera solide ou fluide, et la phase mobile toujours fluide (liquide ou gaz).

Mots-clés :Chromatographie liquide, Chromatographie en phase gazeuse, Chromatographie sur couche mince, Chromatographie d'adsorption ,

Notations et Abréviations

CCM : La chromatographie sur couche mince

CPG : La chromatographie en phase gazeuse.

HPLC : La chromatographie liquide à haute pression .

LSC : La chromatographie liquide-solide.

LLC : La chromatographie liquide-liquide.

GLC : La chromatographie gaz-liquide .

GC : La chromatographie gaz-liquide.

GSC-GC : La chromatographie gaz-solide.

SFC : La chromatographie supercritique.

Ø: Porosité de la phase stationnaire.

HEPT : La hauteur équivalente à un plateau théorique .

H : La hauteur d'un plateau théorique .

N : Nombre de plateaux théoriques.

H_{eff} : Hauteur de plateau effectif .

W.C.O.T : Tube ouvert à paroi revêtue de phase liquide.

FID : DéTECTEUR a ionisation de flamme.

TCD : DéTECTEUR a conductibilité thermique.

ECD : DéTECTEUR a capture d'électrons .

TID : DéTECTEUR a thermo-ionisation.

PID : DéTECTEUR a photo-ionisation.

FPD : DéTECTEUR a photométrique.

LC-MS : La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse.

Table des matières

Résumé

Introduction générale	1
Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales	
I. Introduction	2
II.Définition	2
III.Principe général de la chromatographie	2
IV.Phénomènes physiques	3
IV.1.Phénomène d'adsorption	3
IV.2. Influence de la polarité des composés	3
IV.3. Influence de la polarité de la phase mobile	3
IV.4.Phénomène de partition	4
IV.5.Influence de la solubilité des composés	4
V. Les différents types de chromatographie	4
V.1. Classification selon la nature physique des phases	4
V.2. Classification selon le phénomène chromatographique	5
V.2. 1.La chromatographie d'adsorption	5
V.2. 2.La chromatographie de partage	5
V.2. 4.La chromatographie d'exclusion	5
V.2.5.La chromatographie d'affinité	5
V.3 Classification selon les procédés utilisés	5
VI. Terminologie générale de la chromatographie	6
VII.modèle des plateaux	8
VIII. Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)	9
IX. Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)	11
X. Hauteur de plateau	11
XI. Facteur de rétention k (ou de capacité)	12
XI.1.Approche expérimentale du facteur de rétention k	13
XII. Facteur de séparation (ou sélectivité) entre deux solutés	14
XIII. Facteur de résolution entre deux pics	14
XIV. Influence de la vitesse de la phase mobile	16

XIV.1 Équation de Van Deemter	16
XV .Optimisation d'une analyse chromatographique	19
XVI. Les diverses techniques chromatographiques	21
Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse	
I.Généralités	23
II.Principe	23
III.Appareillage et matériaux	24
III.1.1. Influence de la nature et de la vitesse du gaz vecteur	25
III.2.Injecteurs	26
III.3.Four principal	26
III.4. Colonne	26
III.5.Phases stationnaires	28
III.6. Détecteurs	29
III.6.1. Catharometre (détecteur a conductivité thermique)	29
III.6. 2. Le détecteur a ionisation de flamme (FID) (très utilise)	29
III.6. 3. Détecteur a capture d'électrons	30
III.6. 4.Autres détecteurs	30
III.6. 5.Enregistreurs	31
IV. Technique expérimentale	31
V. Analyse qualitative	32
V.1. Méthode par exaltation des pics	32
V.2. Méthode des indices de rétention	32
VI. Les méthodes d'analyse quantitative	34
VII. Les applications	37
Exercice d'application	37
Chapitre III : La chromatographie liquide haute performance	
I.Introduction	38
II.Principe	38
III.Appareillage	38
III.1. Réservoir de solvants	39
III.2.Pompe	40

III.3 .Injecteur	40
III.4.Colonnes	41
III.5. DéTECTEURS	42
III.6.Intégrateur – Enregistreur	43
IV. Technique expérimentale	44
V. Résultats et interprétation	44
Exercice d’application	44

Chapitre IV :Chromatographie sur couche mince

I. Introduction	
II. Principe	
III. Appareillage	
III.1.une cuve chromatographique	44
III.2. la phase stationnaire	44
III.3. L’échantillon	46
III.4.L’éluant (phase mobile)	46
IV. Conduite de la chromatographie	47
IV.1. Dépôt de l’échantillon	47
IV.2. Développement	47
IV.3.La révélation !	47
IV. 4. Le rapport frontal R_f	48
V. Efficacité d’une plaque CCM	49
VI.Application de la CCM	49
VI.1. Application de la CCM au suivi d’une réaction	49
VI.2. Application de la CCM à la purification	50
Les exercices d’application	51

Introduction générale

« La chimie analytique est la branche de la chimie qui a pour but l'identification, la caractérisation et la quantification des substances chimiques ainsi que le développement des méthodes nécessaires à cette analyse ». Liée à la perpétuelle amélioration des technologies, l'analyse chimique fait preuve d'innovation par la création d'instruments de plus en plus performants et par l'introduction de méthodes couplées qui apportent de nouvelles possibilités. Il existe, de nos jours, une multitude d'instruments, de détecteurs et de couplages. Parmi toutes les méthodes et techniques existantes, certaines seront choisies pour leur sensibilité, leur sélectivité, ou leur reproductibilité. D'autres seront préférées pour leur facilité d'utilisation, leur coût, ou encore leur rapidité. Toutes ces possibilités amènent l'analyste à devoir connaître les concepts de base de chacune de ces méthodes d'analyse chromatographique et des techniques disponibles et leur domaine d'application, pour ensuite choisir la plus adaptée.

Ce cours est destiné à donner un ensemble de connaissances de base sur les méthodes d'analyse chromatographique les plus souvent rencontrées actuellement en analyse chimique, qualitative, quantitative et structurale, dans des secteurs aussi variés que constituent les industries chimiques, pharmaceutiques, agroalimentaires, ainsi que ceux de l'environnement et catalyse .

Les méthodes passées dans ce cours sont classées en méthodes séparatives, elles font l'objet d'une étude qui s'appuie sur les idées de base pour se prolonger par les principales techniques instrumentales correspondantes.

Ce cours s'articule en quatre chapitres :

- Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales.
- Chapitre II : La chromatographie en phase gazeuse
- Chapitre III : La chromatographie liquide haute performance.
- Chapitre IV : Chromatographie sur couche mince

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

I.Introduction

Le nom de chromatographie dérive du mot grec *khrôma* qui signifie *couleur*, parce que le premier scientifique à utiliser cette technique, le botaniste russe Tswett, sépara en 1903 les pigments colorés d'une plante verte en filtrant un extrait de celle-ci sur une colonne de verre remplie de craie (CaCO_3) finement pulvérisée. Ce fut la première application de la chromatographie d'adsorption sur colonne.

Tandis que l'on perfectionnait la méthode primitive de chromatographie d'adsorption, d'autres chercheurs s'appliquaient à découvrir de nouveaux procédés chromatographiques basés sur des principes physiques différents. L'avènement des méthodes modernes de détection a également contribué à l'éclosion de plusieurs modes de chromatographie différents. Actuellement, certains types de chromatographe permettent la détection de quantités aussi infimes que des parties par billion (ppb) de composés. La découverte des principaux modes de chromatographie apparaît dans la liste suivante par ordre chronologique :

- la *chromatographie sur couche mince* (CCM) (1938).
- la *chromatographie sur papier* (1944).
- la *chromatographie en phase gazeuse* (CPG) (1952).
- la *chromatographie sur gel* (1959).
- la *chromatographie liquide à haute pression* (HPLC) (1967).

II.Définition

La chromatographie est une technique de séparation des constituants d'un mélange, dans le but d'identifier ou de doser certains constituants du mélange.

III.principe général de la chromatographie

Le principe de la chromatographie est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans l'échantillon analysé et obtenue par la partition des solutés entre les phases fixe et mobile. Chaque molécule du mélange à séparer est soumise à une force de rétention, affinité du soluté pour la phase fixe, et une force de mobilité, entraînement du soluté par la phase mobile (entraînement qui dépend essentiellement de la solubilité de la molécule dans la phase mobile). La résultante de

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

ces deux forces étant variable selon la molécule, chacune d'elle migrera à une vitesse qui lui est propre.

Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille, la forme, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers, la polarité, la charge électrique.

IV. Phénomènes physiques

Il existe en chromatographie plusieurs phénomènes physiques responsables de la rétention plus ou moins forte des composés sur la phase stationnaire. Les deux plus exploités sont les phénomènes d'adsorption et de partition.

IV.1. Phénomène d'adsorption

Le phénomène d'adsorption est essentiellement un phénomène de **surface** par lequel les composés sont attirés sur les sites actifs de la phase stationnaire par des liaisons hydrogènes et électrostatiques. La phase stationnaire est un matériau solide en forme de petits granules de différentes grosseurs; les plus utilisées sont le gel de silice, l'alumine et la cellulose en poudre.

IV.2. Influence de la polarité des composés

En chromatographie d'adsorption, la capacité d'adsorption des composés sur la phase stationnaire est en relation directe avec leur polarité. **Plus un composé est polaire, plus fortement il sera adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire et moins vite il se déplacera.**

IV.3. Influence de la polarité de la phase mobile

À l'exception de la chromatographie en phase gazeuse, la phase mobile, appelée également éluant, est un solvant ou un mélange de plusieurs solvants miscibles, dont le rôle est de déplacer les composés du mélange vers le haut de la plaque en chromatographie sur couche mince ou vers la sortie de la colonne en chromatographie sur colonne.

Lorsqu'on exploite le phénomène d'adsorption en chromatographie, la polarité de l'éluant a une influence considérable sur la vitesse de déplacement des composés d'un mélange. **Plus l'éluant est polaire, plus les composés se déplacent rapidement.** En

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

effet, l'éluant est également adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire et entre en compétition avec les composés du mélange.

IV.4. Phénomène de partition

Dans une chromatographie de partition, la phase stationnaire est non pas un solide, mais un liquide fixé physiquement ou greffé chimiquement sur un support solide. Les composés d'un mélange vont donc se solubiliser dans la phase liquide stationnaire, au lieu de s'y adsorber. C'est la solubilité différente des composés dans la phase stationnaire et dans la phase mobile qui rend la séparation chromatographique possible.

IV.5. Influence de la solubilité des composés

- Dans la phase stationnaire :

Plus un composé est soluble dans la phase liquide stationnaire, moins vite il se déplacera.

- Dans la phase mobile :

Plus un composé est soluble dans la phase mobile, plus vite il se déplacera.

V. Les différents types de chromatographie

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon trois modalités différentes :

- Classification selon la nature physique des phases.
- Classification selon le phénomène mis en œuvre.
- Classification selon le procédé opératoire.

V.1. Classification selon la nature physique des phases

- La phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz (soit encore un fluide supercritique)
- La phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide fixé sur un support solide.
- Donc selon le type des phases mobile et solide on distingue:
 - a) La chromatographie liquide-solide(LSC).
 - b) La chromatographie liquide-liquide(LLC).
 - c) La chromatographie gaz-liquide (GLC ou GC).
 - d) La chromatographie gaz-solide (GSC-GC).

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

e) La chromatographie supercritique (SFC).

V.2. Classification selon le phénomène chromatographique

Ce dernier dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée. On distinguera donc :

V.2. 1.La chromatographie d'adsorption : c'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide.

V.2. 2.La chromatographie de partage : c'est une chromatographie liquide-liquide. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte. cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.

V.2.3. La chromatographie sur échangeurs d'ions :la phase stationnaire est un échangeur d'ion constitué par une résine porteuse de groupement ionisés négativement ou positivement exerçant des interactions de type électrostatiques avec les solutés ioniques du milieu.

V.2. 4.La chromatographie d'exclusion : appelée aussi tamisage moléculaire ou perméation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel.

V.2.5.La chromatographie d'affinité : la phase stationnaire est un support chimiquement inerte, sur lequel est greffé un secteur qui présente une bio-affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité entre enzyme-substrat, enzyme-effecteur, antigène-anticord).

V.3 Classification selon les procédés utilisés :

Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :

- La chromatographie sur colonne.
- La chromatographie sur papier.
- La chromatographie sur couche mince.

Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera :

- La chromatographie par développement (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire).
- La chromatographie d'élution (les substances sont entraînées hors de la phase

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

stationnaire).

VI.Terminologie générale de la chromatographie :

VI.1.Elution : percolation d'un composé sur une colonne.

VI.2.Éluât : solution recueillie au bas de la colonne.

VI.3.Soluté: toute substance constituant d'un mélange, séparée par chromatographie.

VI.4.Phase mobile: le vecteur, liquide ou gazeux, qui déplace le soluté.

VI.5.Phase stationnaire: le produit qui, par ses affinités avec les solutés, va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace.

VI.6.Support: Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire.

VI.7.Remplissage: l'ensemble des produits (adsorbant, support + phase stationnaire, etc...) qui garnissent une colonne chromatographique.

VI.8.Colonne chromatographique: tube de diamètre et longueur variable, en verre, métal, ou autre substance, à l'intérieur duquel s'opèrent les séparations chromatographiques.

VI.9.Développant: une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, de telle manière qu'ils demeurent dans celle-ci : cas de la CP et de la CCM.

VI.10.Éluant: une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, jusqu'à ce qu'ils sortent de celle-ci.

VI.11.Rapport frontal: rapport entre la distance parcourue par un soluté dans une phase stationnaire et la distance parcourue en même temps par le développant(solvant).

VI.12.Valeurs de rétention: toutes données qui permettent de chiffrer l'action spécifique d'une phase stationnaire donnée sur un soluté donné, au cours d'une analyse chromatographique.

VI.13.Le chromatogramme : est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne (fig. I.1)

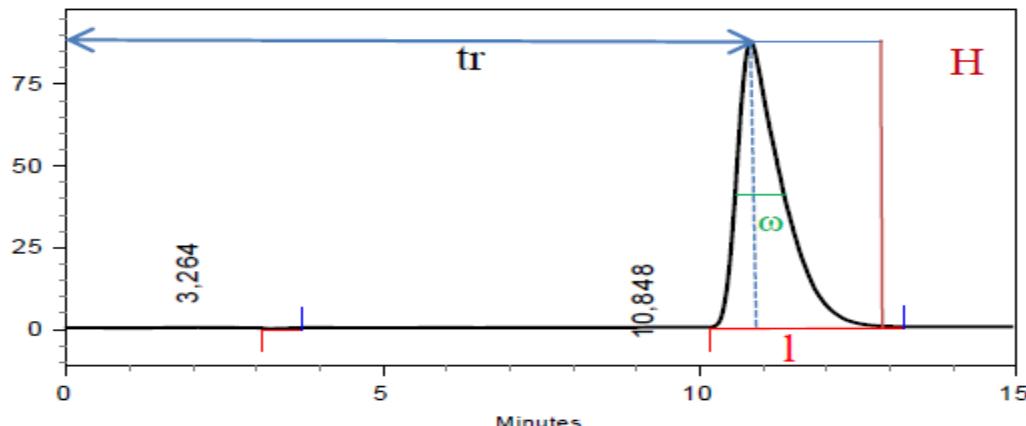


Figure .I.1: Chromatogramme d'un constituant

VI.14. Le temps de rétention t_r : qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal t_r est indépendant de la quantité injectée.

VI.15. Le temps t_m : appelé temps mort ,désigné également par t_0 , Un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_m .

VI.16. Le temps de rétention réduit : (t'_r) représente le temps passé par le soluté dans la phase stationnaire. La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé .

$$t'_r = t_r - t_m \quad 1.1$$

VI.17. Le volume de rétention : Connaissant le débit D de la phase mobile, supposé maintenu constant, on définit le volume de rétention (V_r)

$$V_r = t_r \cdot D \quad 1.2$$

$$V_r = t_r \cdot u \cdot s \cdot G \quad 1.3$$

u: vitesse linéaire moyenne de la phase mobile

s : selection droite de la colonne

G: porosité de la phase stationnaire (0,75 pour la silice poreuse)

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

VI.18. Volume mort : Le volume de la phase mobile dans la colonne , peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. Cette grandeur est exprimée par :

$$V_m = t_m \cdot D \quad 1.4$$

VI.19. Volume de la phase stationnaire : Ce volume désigné par V_s n'apparaît pas sur le chromatogramme. Dans les cas simples on le calcule en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

VI.20. Coefficient (ou constante) de distribution de Nernst (k) : C'est le paramètre physico-chimique de base en chromatographie qui quantifie le rapport de concentration de chaque composé entre les deux phases en présence.

$$k = \frac{C_s}{C_m} \quad 1.5$$

$$k = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}} \quad 1.6$$

Les valeurs de K sont très variables. Elles sont grandes (1 000, par exemple) lorsque la phase mobile est un gaz, et petites (2, par ex.) lorsque les deux phases sont à l'état condensé.

Chaque composé n'occupant qu'un espace limité de la colonne et de plus avec une concentration variable, les valeurs vraies de C_M et de C_S ne sont pas accessibles mais leur rapport est constant.

VII.modèle des plateaux

Depuis un demi-siècle, différentes théories visant à modéliser la chromatographie ont été et continuent à être proposées. Les plus connues sont les approches statistiques (théorie stochastique), le modèle des plateaux, et l'approche par la dynamique moléculaire . Pour expliquer le mécanisme de migration et de séparation des composés dans la colonne, le modèle le plus ancien, ou *modèle des plateaux* de Craig, est une approche statique, jugée obsolète, mais qui permet de décrire de manière simple les séparations. Bien que la chromatographie soit un phénomène continu, on considère dans le modèle statique de Craig, que chaque soluté se déplace progressivement en une

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

suite d'étapes distinctes. Le processus élémentaire est représenté par un cycle d'adsorption/désorption.

L'enchaînement de ces étapes reproduit la migration des fluides dans la colonne, de même qu'un film de dessins animés donne l'illusion du mouvement par un suite d'images fixes. Chaque étape correspond à un nouvel état d'équilibre de toute la colonne. Ces équilibres successifs sont à la base de la notion de plateau théorique selon lequel la colonne de longueur **L** est découpée en **N** petits disques fictifs de même hauteur **H**, numérotés de **1** à **n**. Pour chacun d'eux, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration dans la phase stationnaire de ce soluté. À chaque nouvel équilibre le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire dans la colonne, appelé **plateau théorique**.

La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou *H*) vaut donc (1.7) :

$$H = \frac{L}{N} \quad 1.7$$

Cette approche fait appel aux règles de développement des polynômes pour calculer, au niveau de chaque plateau, les masses réparties entre les deux phases en présence

VIII. Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

À mesure que le soluté migre dans la colonne, il occupe une zone allant s'élargissant (fig.I.2). Cette dispersion linéaire σ_L , repérée par la variance σ_L^2 croît avec la distance parcourue. Lorsque cette distance vaut *L*, longueur de la colonne, on pose :

$$\sigma_L^2 = H \cdot L \quad 1.8$$

En rappel du modèle de la théorie des plateaux, cette approche conduit à la valeur de la hauteur équivalente à un plateau théorique **H** et au nombre **N** de plateaux théoriques.

$$N = \frac{L}{H} \quad 1.9$$

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

Donc, pour tout chromatogramme, à partir d'un pic d'élution d'un composé, dont on pourra mesurer la variance temporelle σ^2 , on pourra calculer pour le composé en question l'efficacité théorique N (la formule 1.9) et en déduire la valeur de H sachant que $H = L/N$.

$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2} \quad \text{ou} \quad N = \frac{t_r^2}{\sigma^2} \quad 1.10$$

Ces deux paramètres sont accessibles de manière indirecte à partir du pic d'élution du composé. On mesure t_r et σ dont le rapport à même valeur que celui de L et de σ_L (1.10).

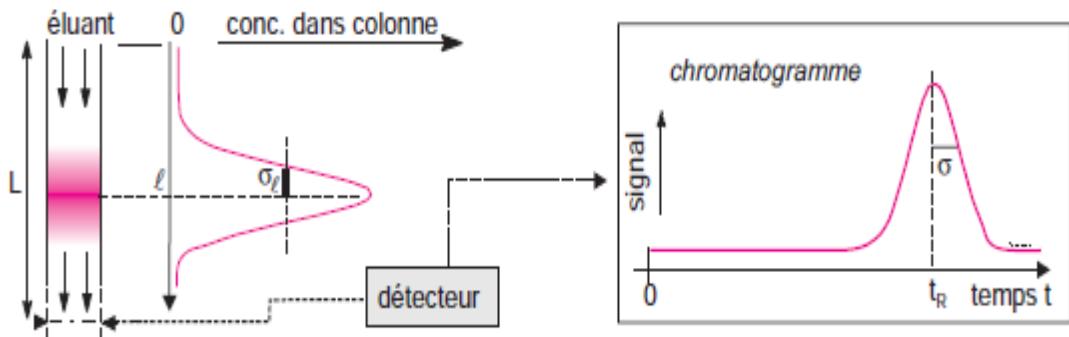


Figure I.2 : Dispersion d'un soluté dans une colonne et traduction sur le chromatogramme.

Sur le chromatogramme, σ représente la demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur et t_r le temps de rétention du composé. t_r et σ doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant). Si on exprime σ en unités de volume (en faisant intervenir le débit), 4σ correspond au « volume du pic » soit 95 % du composé injecté. Par suite des propriétés de la courbe de Gauss ($\omega = 4\sigma$), il en résulte la formule 1.10.

Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée : on utilise de préférence la formule équivalente 1.11.

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

N est un paramètre relatif, puisqu'il dépend à la fois du soluté et des conditions opératoires suivies. On choisit généralement un constituant qui apparaît en fin ce chromatogramme pour avoir une valeur repère, à défaut de savoir si la colonne permet de réussir une séparation donnée.

$$N = 16 \frac{tr^2}{\omega^2} \quad 1.11$$

$$N = 5.54 \frac{tr^2}{\delta^2} \quad 1.12$$

IX. Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

Afin de comparer les performances de colonnes de conceptions différentes, vis-à-vis d'un même composé ;

- c'était notamment le cas en CPG lorsqu'on voulait comparer les performances d'une colonne capillaire et d'une colonne remplie
- on remplace le temps total tr qui figure dans les expressions 1.10 à 1.12 par le *temps de rétention réduit* t'_r qui ne tient pas compte du temps mort t_m passé par le composé dans la phase mobile. Les trois précédentes expressions deviennent :

$$N_{eff} = \frac{t'^2_r}{\sigma^2} \quad 1.13$$

$$N_{eff} = 16 \frac{t'^2_r}{\omega^2} \quad 1.14$$

$$N_{eff} = 5.54 \frac{t'^2_r}{\delta^2} \quad 1.15$$

On considère actuellement que ces trois dernières relations ne sont plus de grande utilité.

X. Hauteur de plateau

La hauteur équivalente à un plateau théorique **H** a déjà été définie (formule 1.7). Ce paramètre est calculé pour des composés de référence car il permet de comparer des colonnes de longueurs différentes, bien qu'il ne s'agisse en aucune façon d'une constante. Sa valeur dépend du composé choisi et des conditions de l'expérience.

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

En chromatographie gazeuse, on a longtemps utilisé une valeur corrigée appelée hauteur de plateau effectif H_{eff} faisant intervenir l'efficacité réelle à la place de l'efficacité théorique.

Le calcul de H_{eff} à partir de l'efficacité réelle utilise l'expression 1.16 :

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{N_{\text{eff}}} \quad 1.16$$

et pour les colonnes dont le remplissage est formé de particules sphériques, on rencontre assez souvent la hauteur de plateau réduite, h , qui tient compte du diamètre moyen d_m des particules. On élimine en quelque sorte l'effet de la taille des particules. Des colonnes présentant le même rapport (longueur de la colonne)/(diamètre des particules) conduisent à des performances semblables.

$$h = \frac{H}{d_m} = \frac{L}{N \cdot d_m} \quad 1.17$$

XI. Facteur de rétention k (ou de capacité)

Quand un composé de masse totale m_T est introduit dans la colonne, il se répartit en deux quantités : m_M dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire. Si on ne change pas les conditions opératoires, ces deux quantités demeurent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Leur rapport, appelé *facteur de rétention*, est indépendant de m_T :

$$k = \frac{m_S}{m_M} = \frac{V_S \cdot C_S}{V_M \cdot C_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad 1.18$$

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

XI.1.Approche expérimentale du facteur de rétention k

En s'appuyant sur le modèle de Craig, on imagine que chaque molécule d'un composé passe alternativement de la phase mobile (où elle progresse à la vitesse de celle-ci), à la phase stationnaire (où elle est alors immobile). Sa vitesse moyenne de progression dans la colonne est donc d'autant plus lente que le cumul des temps passés dans la phase stationnaire est plus grand.

Si on extrapole maintenant au cas de **n** molécules semblables de ce composé (l'échantillon de masse **m_T**), on admettra qu'à chaque instant, le rapport du nombre des **n_S** molécules fixées sur la phase stationnaire (masse **m_S**) et des **n_M** molécules présentes dans la phase mobile (masse **m_M**), est le même que celui des temps passés dans chaque phase pour une molécule isolée. Les trois rapports suivants ont donc même valeur :

$$\frac{n_S}{n_M} = \frac{m_S}{m_M} = \frac{t_S}{t_M} = k \quad 1.20$$

Prenons le cas d'une molécule qui passe les 3/4 de son temps dans la phase stationnaire. Sa vitesse moyenne sera 4 fois plus lente que si elle restait en permanence dans la phase mobile. Par conséquent si **4 mg** de composé ont été introduits dans la colonne, il y aura en moyenne et en permanence **1 mg** dans la phase mobile et **3 mg** dans la phase stationnaire. Sachant que le temps de rétention d'un composé **t_r** est tel que **t_r = t_m + t_s**, la valeur de **k** est donc accessible à partir du chromatogramme (**t_s = t_r - t_m**) (voir figure.3) :

$$k = \frac{t_r}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad 1.21$$

Cette relation importante est également souvent rencontrée sous la forme :

$$t_r = t_m(1+K) \quad 1.22$$

Compte tenu des relations 1.2 et 1.4, le volume de rétention **v_r** d'un soluté pourra s'écrire :

$$v_r = v_m(1+K) \quad 1.23$$

ou :

$$v_r = v_m + K v_s$$

1.24

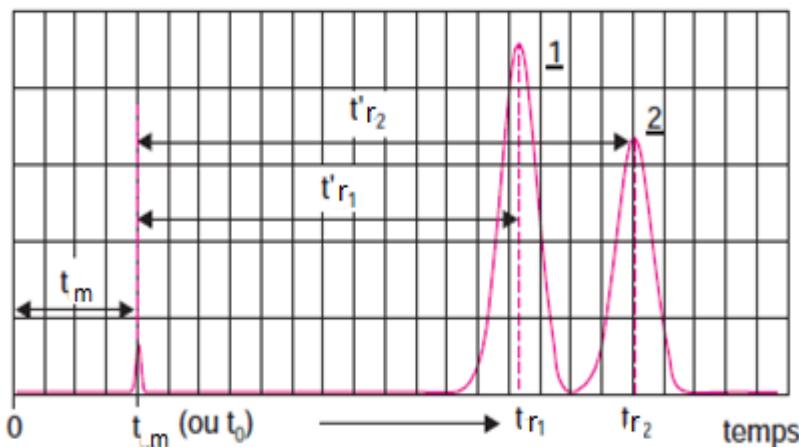
XII. Facteur de séparation (ou sélectivité) entre deux solutés

Le facteur de séparation α (1.25) permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents 1 et 2 sur un chromatogramme (fig. 3). Il est défini par les relations suivantes (1.25 et 1.26). Il ne peut, par définition, être inférieur à 1 :

$$\alpha = \frac{t'_{r(2)}}{t'_{r(1)}} \quad 1.25$$

ou :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad 1.26$$



ici, on a :

$$k_1 = \frac{t'_{r(1)}}{t'_{m(1)}} = 3.08$$

$$k_2 = \frac{t'_{r(2)}}{t'_{m(2)}} = 4$$

$$\alpha = \frac{t'_{r(2)}}{t'_{r(1)}} = 1.3$$

Figure. I.3 :Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents.

Chaque composé a un facteur de rétention qui lui est propre. α à lui seul, ne permet pas de savoir si la séparation est réellement possible. Sur cette figure, le facteur de séparation est d'environ 1,3. Pour des pics non adjacents, on définit le **facteur** de rétention relative r , qui, calculé comme α , ne peut être inférieur à 1.

XIII. Facteur de résolution entre deux pics

Pour traduire numériquement la plus ou moins bonne séparation entre deux composés, on utilise le facteur de résolution R qui est calculé à partir du chromatogramme (fig. 4) :

$$R = 2 \frac{t_{r(2)} - t_{r(1)}}{\omega_1 + \omega_2} \quad 1.27$$

Il existe, pour exprimer la résolution, d'autres relations dérivées des précédentes, établies en vue de remplacer un paramètre par un autre, ou admettant des hypothèses simplificatrices. Ainsi les deux expressions 1.28 et 1.29 sont-elles très souvent employées.

La relation 1.30 montre l'influence, sur la résolution, de l'efficacité, du facteur de capacité et de la sélectivité. La figure 5 en est une vérification expérimentale.

$$R = 1,177 \cdot \frac{t_{r(2)} - t_{r(1)}}{\delta_1 + \delta_2} \quad 1.28$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \quad 1.29$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \cdot \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2} \quad 1.30$$

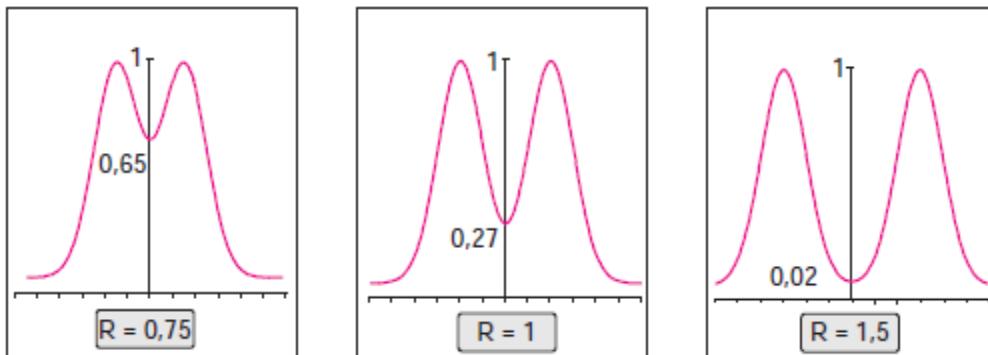


Figure.I .4 : Facteur de résolution.

Simulation de pics chromatographiques par juxtaposition plus ou moins rapprochée de 2 courbes gaussiennes identiques. Aspect visuel correspondant aux valeurs de R indiquées sur les diagrammes. À partir de $R = 1,5$ on considère que les pics sont résolus, la vallée entre les pics étant d'environ 2 %.

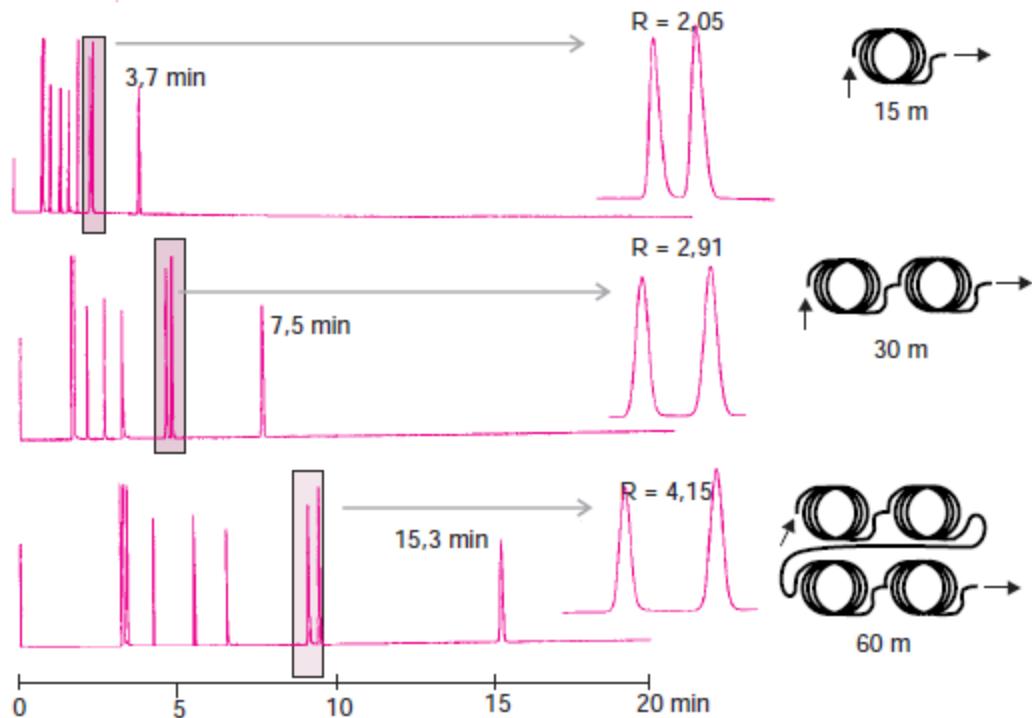


Figure. I.5 : Effet de la longueur de la colonne sur la résolution.

Expériences faites en chromatographie en phase gazeuse en modifiant seulement la longueur de la colonne capillaire. On illustre ainsi qu'en doublant la longueur de la colonne la résolution est multipliée par 1,41.

XIV. Influence de la vitesse de la phase mobile

Dans tout ce qui précède, en particulier dans les différentes expressions caractérisant les séparations, la vitesse de la phase mobile dans la colonne n'est pas prise en compte. Or, de toute évidence, cette vitesse doit avoir une incidence sur la progression des analytes dans la colonne, donc sur leur dispersion, en bref sur la qualité de l'analyse en cours.

L'influence de la vitesse de la phase mobile a été mise en évidence par Van Deemter qui a proposé la première équation cinétique, dans le cas des colonnes remplies en chromatographie en phase gazeuse.

XIV.1 Équation de Van Deemter

La forme simplifiée, proposée par cet auteur en 1956, est très connue en chromatographie en phase gazeuse, pour les colonnes remplies (1.30). Elle relie H

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

(HEPT) à la vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile u dans la colonne (fig. 6) :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \bar{u} \quad 1.31$$

Cette équation montre qu'il existe un *débit optimal* pour chaque colonne, correspondant au minimum de H , tel que le prévoit la courbe représentant l'équation 1.30. La diminution de l'efficacité, quand le débit croît, correspond à un résultat que chacun a pu découvrir à ses dépens en voulant accélérer une séparation chromatographique par augmentation du débit de la phase mobile. Ce qui est moins intuitif par contre, est la perte d'efficacité due à un débit trop lent. Pour expliquer ce phénomène, il faut revenir sur l'origine des termes A , B et C dont chacun a un domaine d'influence qui peut être repéré sur le graphe (fig I. 6).

Les trois coefficients numériques expérimentaux A , B et C sont reliés à divers paramètres physico-chimiques, à la colonne et aux conditions opératoires. Si on choisit d'exprimer H en **cm**, A sera en **cm**, B en **cm²/s** et C en **s** (la vitesse étant en **cm/s**). La courbe représentative de cette fonction est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum (H_{\min}) pour :

$$\bar{u}_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{B}{C}} \quad 1.32$$

A, terme de remplissage $A = 2 \lambda d_p$

Le terme A est en relation avec le profil d'écoulement de la phase mobile à travers la phase stationnaire. La taille des particules (de diamètre d_p), leur répartition dimensionnelle et la régularité du remplissage (paramètre λ) sont à l'origine de chemins préférentiels qui peuvent conduire à des échanges imparfaits entre les deux phases. C'est le facteur de diffusion d'Eddy, ou diffusion turbulente, considéré comme peu important en chromatographie liquide et absent par nature pour les colonnes capillaires WCOT en CPG (équation de Golay sans terme A).

B, terme de diffusion dans la phase mobile $B = 2\gamma D_G$

Le second terme B , qui peut être exprimé à partir de D_G , coefficient de diffusion de l'analyte dans la phase mobile et γ , facteur de tortuosité, est à considérer surtout si la

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

phase mobile est un gaz. La diffusion longitudinale dans la colonne est, en effet, rapide. C'est une conséquence de l'entropie qui nous rappelle qu'un système évolue spontanément vers un plus grand désordre, telle la goutte d'encre qui diffuse dans le verre d'eau où elle vient de tomber. En conséquence, si le débit est trop faible, les produits en cours de séparation se mélangent à nouveau plus vite qu'ils ne migrent. On retiendra à ce propos qu'on ne doit jamais interrompre provisoirement une chromatographie en cours, au risque de perdre toute efficacité.

C, terme de transfert de masse $C = C_G + C_L$

Le terme **C**, dû à la résistance au transfert de masse du soluté entre les deux phases, devient prépondérant lorsque le passage est trop rapide pour que l'équilibre soit atteint. Des turbulences locales au sein de la phase mobile et des gradients de concentration ont pour conséquence de retarder la mise en équilibre ($C_S \rightleftharpoons C_M$). La diffusion entre les deux phases n'est pas instantanée, si bien que le soluté sera entraîné hors équilibre. Il n'existe pas de formule simple rendant compte des différents facteurs intégrés dans le paramètre **C**. Le terme **C_G** dépend du coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile gazeuse, alors que le paramètre **C_L** dépend du coefficient de diffusion dans la phase stationnaire liquide.

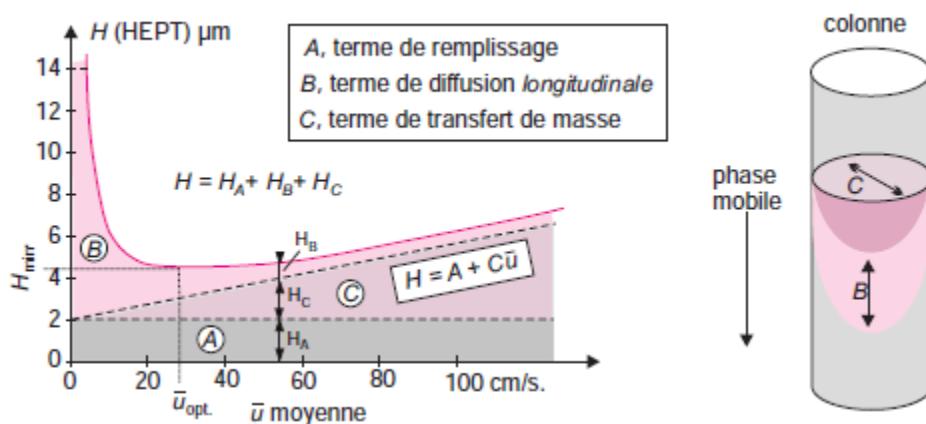


Figure I.6 : Courbe de Van Deemter en chromatographie gazeuse.

avec indication des domaines propres à **A**, **B** et **C**. Il existe également une équation semblable à celle de Van Deemter qui fait intervenir cette fois la température :

$$H = A + B/T + C \cdot T$$

Dans la pratique on accède aux valeurs des coefficients **A**, **B**, **C**, en faisant plusieurs mesures d'efficacité pour un même composé chromatographié à des débits différents, puisque débit et vitesse linéaire moyenne sont reliés. On calcule ensuite l'équation de l'hyperbole qui satisfait au mieux les valeurs expérimentales, de préférence par la méthode de régression linéaire multiple.

XV .Optimisation d'une analyse chromatographique

La chromatographie analytique est essentiellement utilisée en analyse quantitative. À cette fin, il faut pouvoir déterminer les aires des pics des espèces à doser, donc les séparer. Pour y parvenir on fait de plus en plus souvent appel à des logiciels d'optimisation basés sur la connaissance du processus chromatographique. C'est l'étape de l'optimisation de l'analyse qui met à profit les connaissances de l'analyste et les ressources de l'appareil pour simuler les résultats à attendre des modifications de la composition de la phase mobile et d'autres paramètres physico-chimiques tels la température ou le pH dans le cas de substances ionisables .En chromatographie en phase gazeuse, les séparations peuvent être si complexes qu'on ne peut déterminer par avance s'il est préférable de baisser ou d'élever la température. Le choix de la colonne, de sa longueur, de son diamètre, de la phase stationnaire, du rapport de phase ainsi que des paramètres de séparation (température et débit), sont autant de facteurs qui interagissent les uns sur les autres.

La résolution et le temps d'élution sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante du ou des composés intéressants en un minimum de temps. Dans certains cas, il ne faut toutefois pas oublier le temps nécessaire à la colonne pour revenir aux conditions initiales avant d'effectuer l'analyse suivante. La chromatographie correspond en effet à un type d'analyse lente. Si la résolution est très bonne, l'optimisation aura encore sa raison d'être pour gagner du temps en utilisant une colonne plus courte ,sachant que la résolution est affectée d'un facteur faisant intervenir la racine carrée de la longueur de la colonne (le paramètre N de la formule 1.29 et la fig I.6).

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

Quand on modifie le débit dans une séparation avec gradient on observe des changements importants sur le chromatogramme. La sélectivité entre pics est perturbée, comme le sont bien sûr les temps de rétention. La fig I.7 illustre par un exemple l'optimisation d'une séparation, en chromatographie liquide, d'un mélange d'hydrocarbures aromatiques par modification de la composition de la phase mobile. On remarquera que cette optimisation s'accompagne d'une augmentation importante du temps d'analyse pour « boucler le cycle ». Si on ne s'intéresse qu'à certains des composés présents, on peut faire appel à un détecteur sélectif qui ne verra, à la limite, qu'eux seuls. Dans d'autres cas, par contre, on s'attache à séparer le plus grand nombre possible de composés du mélange initial.

Suivant les types de chromatographie, l'optimisation est plus ou moins rapide. En chromatographie en phase gazeuse elle est plus facile qu'en chromatographie liquide où intervient la composition de la phase mobile : des logiciels ont été spécialement créés pour aider

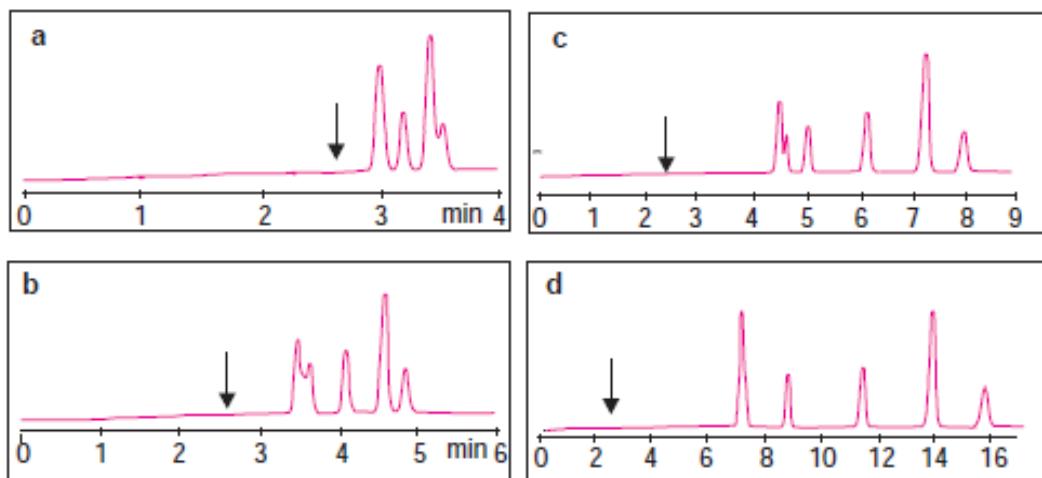


Figure.I. 7 :Chromatogrammes d'une séparation.

La phase mobile est un mélange binaire eau/acétonitrile : a) 50/50 ; b) 55/45 ; c) 60/40 ; d) 6/35. La flèche indique le temps mort t_m (min), (selon J.W. Dolan, *LC-GC Int*, 1994,7(6), 333).

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

Au meilleur choix de la composition de la phase mobile. Moyennant certaines hypothèses (pics gaussiens ou non), on peut calculer avec assez de précision les aires des pics mal résolus.

Le chromatographiste est toujours prisonnier d'un triangle dont les sommets correspondent à la résolution, à la vitesse et à la capacité, trois paramètres qui s'opposent (fig I.8). Une chromatographie analytique optimisée utilise à plein le potentiel du paramètre le plus efficace : la sélectivité. Dans ce triangle elle se situe donc près du sommet résolution.

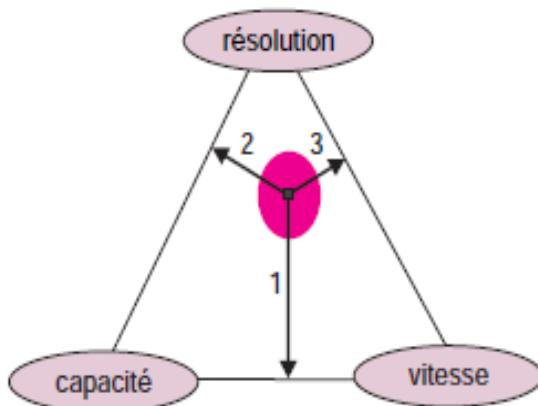


Figure I.8 : Le triangle des chromatographistes.

La zone ombrée indique le domaine qui correspond à la chromatographie analytique.

Celle-ci tire profit des 5 paramètres : K , N , k , α et R .

XVI. Les diverses techniques chromatographiques

Les techniques chromatographiques peuvent être réparties suivant plusieurs critères : en fonction de la nature des deux phases en présence, ou du procédé utilisé, ou du phénomène physico-chimique responsable du coefficient de distribution K vu précédemment (fig I.2).

Le classement suivi ci-après est établi à partir de la nature physique des phases (fig I.9).

Chapitre I : Chromatographie et notions fondamentales

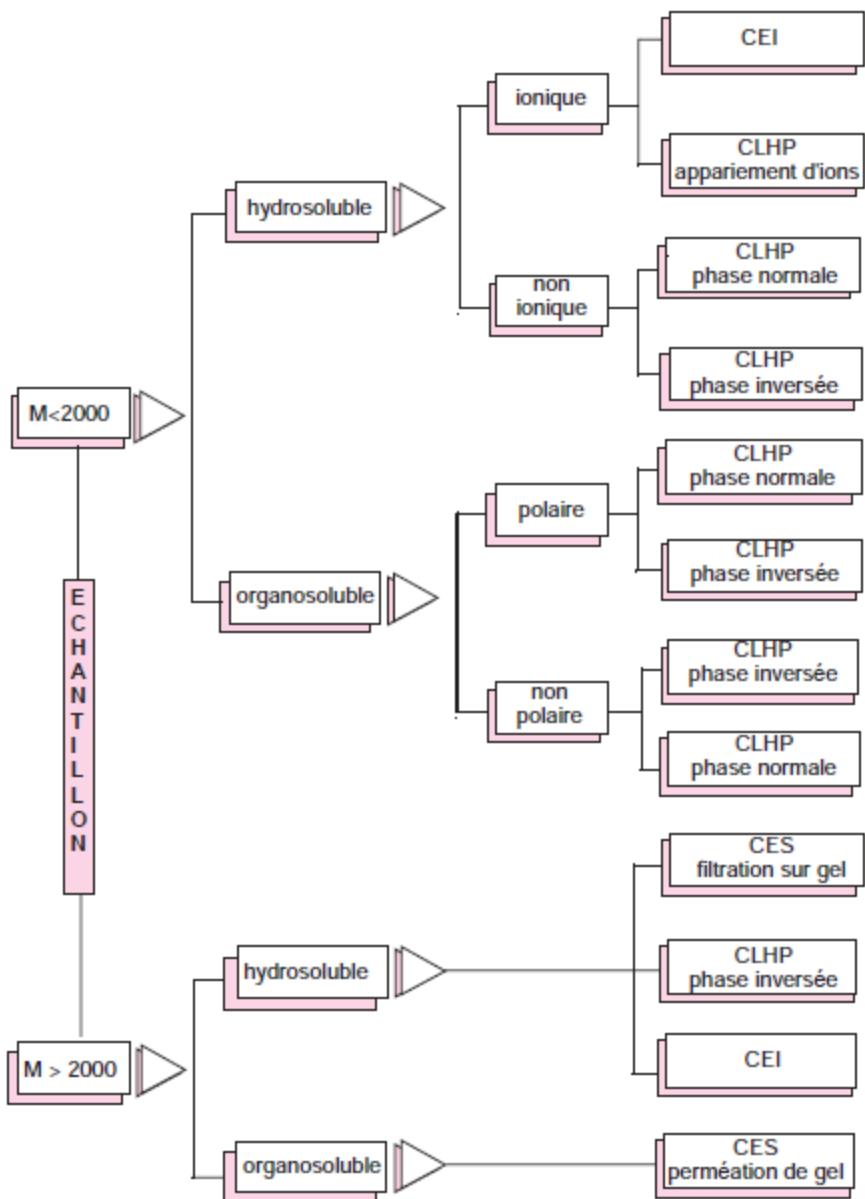


Figure.I.9 : Guide de sélection se rapportant aux différentes techniques chromatographiques utilisant une phase mobile liquide.

On choisira en fonction de la séparation à effectuer, la technique la mieux adaptée.

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

I.Généralités

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles de plus de 60 ans.

Les CPG sont des chromatographies analytiques qui se caractérisent par :

- La phase mobile est un gaz.
- La phase stationnaire peut être :
 - un solide adsorbant, on parle alors de CPG d'adsorption ou CPG gaz-solide. L'adsorbant le plus utilisé est la silice (adsorbant très polaire).
 - un liquide imprégnant totalement la surface d'un support devenu inerte, on parle alors de CPG gaz-liquide ou CPG de partage (terme impropre mais très utilisé). La phase stationnaire liquide doit être non volatile dans les conditions de chromatographie pour ne pas s'épuiser au fil des analyses. Ce type de support est en train de disparaître.
 - un motif chimique déterminé greffé par liaison covalente sur un support devenu inerte (support silice greffé d'un motif organique par exemple), on parle de CPG sur phase greffée. Cette technologie permet une variété de phases stationnaires infinie (toute la gamme des polarités) et une résistance des phases stationnaires très élevée (pas de phénomène d'épuisement de la phase stationnaire par volatilisation).

Les gaz utilisés comme phase mobile sont le dihydrogène ou l'hélium ou le diazote ou le dioxyde de carbone. La fonction du gaz phase mobile est d'être le vecteur d'entraînement à travers la colonne des molécules analytes lorsqu'ils se trouvent à l'état gazeux en état de non rétention par la phase stationnaire.

La phase mobile se comporte ainsi en gaz vecteur « inerte » (c'est à dire qu'elle n'occasionne aucune interaction avec les analytes à séparer)

II.Principe

Le mélange à éluer est injecté à l'aide d'une seringue. Une fois vaporisés par l'injecteur, les composés sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur (le plus souvent H_e ou N₂). Suivant l'affinité avec la phase stationnaire, les composés sont séparés avant d'être détectés en sortie de colonne. Les appareils de CPG sont fréquemment couplés avec un spectromètre de masse pour l'identification des composés au fur et à mesure de leur élution.

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

III.Appareillage et matériaux

Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée (fig.II.1). La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande répétabilité des temps de rétention.

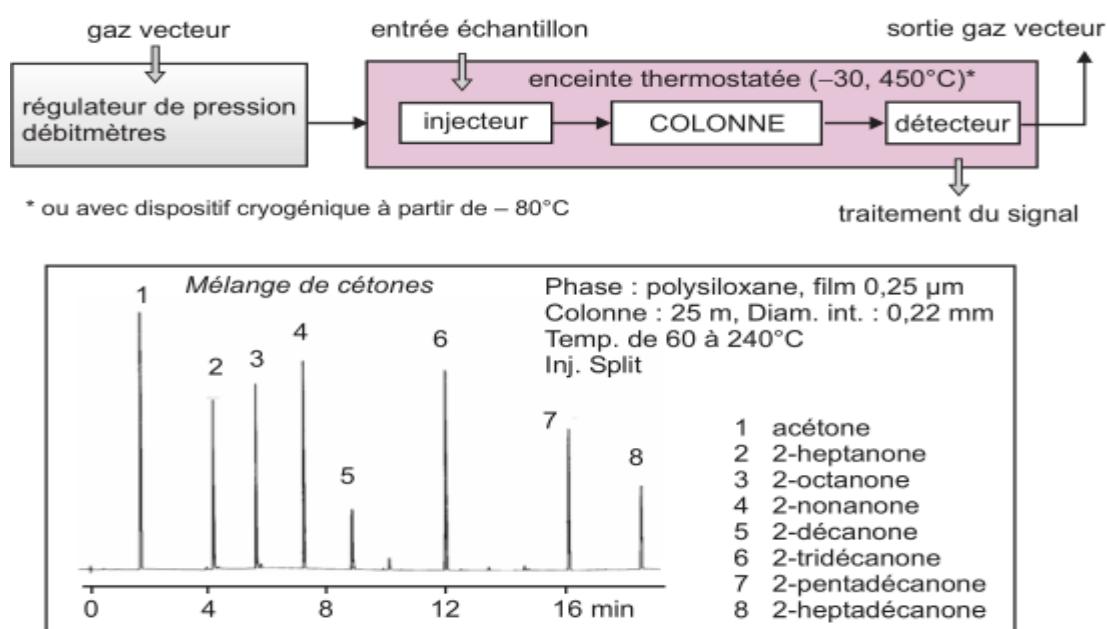


Figure.II. 1: Schéma simplifié du chromatographe en phase gazeuse

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire. Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre. Certains modèles de chromatographes ont une alimentation autonome ainsi qu'une taille réduite pour faciliter l'emploi en milieu extérieur, sur le terrain.

III.1. Phase mobile

La phase mobile entraînant les composés dans la colonne est un gaz de préférence chimiquement inerte. Les principaux sont l'hélium, l'argon, l'azote et le dioxyde de carbone. Ils sont livrés dans des bonbonnes surmontées d'un régulateur de pression. Ces gaz doivent être de pureté analytique, car les impuretés sont responsables des bruits de fond sur le chromatogramme. Le choix du gaz vecteur dépend principalement du type de détecteur de l'appareil Il n'y a pas d'interaction entre le soluté et la phase mobile en CPG.

III.1.1. Influence de la nature et de la vitesse du gaz vecteur

La phase mobile est un gaz de faible viscosité, trois gaz sont exclusivement employés, l'azote, l'hydrogène et l'hélium.

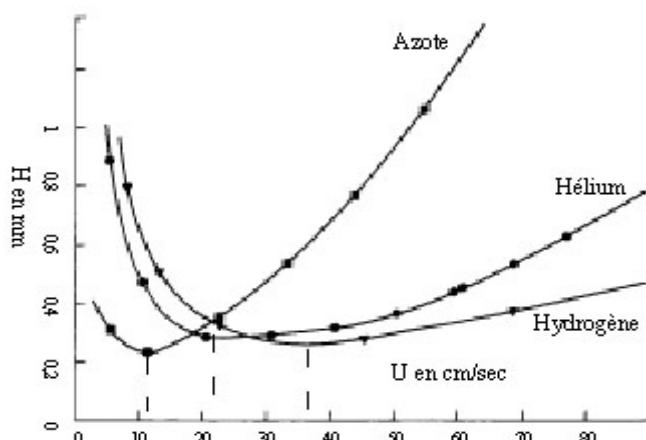


Figure .II.2 : Courbes de Van Deemter pour l'azote, l'hélium et l'hydrogène

Les courbes de Van Deemter, $\mathbf{H} = \mathbf{f}(\mathbf{u})$ de la figure II.2 montre que la vitesse optimale de l'hydrogène est plus de 3 fois plus grande que celle de l'azote. Les analyses employant l'hydrogène pourront donc être effectuées 3 fois plus rapidement que celles utilisant l'azote (à efficacité constante). Malheureusement l'hydrogène est un gaz dangereux présentant des risques d'explosion. Pour ces raisons de sécurité, c'est l'hélium qui en général utilisé.

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

III.2.Injecteurs

L'injecteur est la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe. Il a deux autres fonctions : vaporiser et entraîner en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur.

L'injection des échantillons se fait à l'aide d'une seringue graduée en microlitres qui est introduite dans la chambre à travers une rondelle en caoutchouc. À cause de la température élevée dans le compartiment, les composés passent instantanément à l'état vapeur et sont poussés par le gaz vecteur vers la colonne chromatographique.

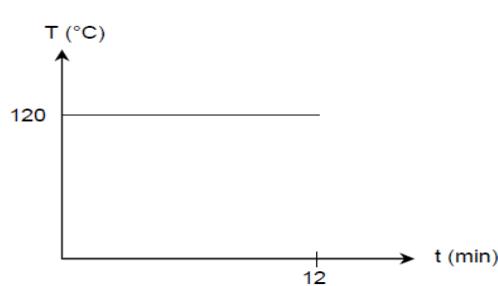
Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes auxquels ils sont réunis. La qualité des séparations dépend de cette phase de l'analyse

III.3.Four principal

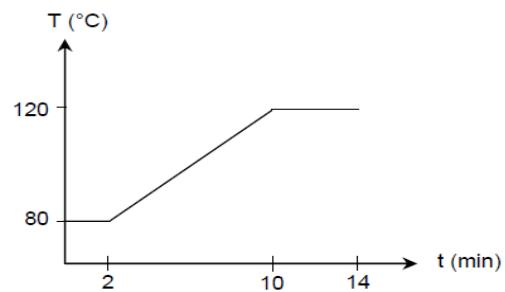
Le four principal est un compartiment, placé entre la chambre d'injection et le détecteur, qui contient la colonne chromatographique. Il est muni d'éléments chauffants pouvant contrôler la température du four avec une très grande précision.

Des contrôles permettent également de travailler à température programmée pour la séparation de mélanges de composés ayant des capacités de rétention très différentes sur la phase stationnaire.

Exemples de graphique :



Température isotherme



Température programmée

III.4. Colonne

On distingue trois types de colonnes :

a) Colonne remplie (à garnissage)

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

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

b)Colonnes capillaires :

les colonnes se présentent sous forme d'un capillaire dont la surface interne porte un fin film de phase stationnaire. Le diamètre interne est de 0,1 a 0,6 mm ; l'épaisseur de film de phase stationnaire est de 0,2 a 0,5 µm ; la longueur dépasse 10 m, atteint généralement 50 m . Elles sont revêtues d'une couche de polymère ou d'un film d'aluminium et sont enroulées sur un support métallique cylindrique léger, en forme de cage. Il n'y a alors pas de remplissage: la phase stationnaire ou l'adsorbant est déposée ou greffée sur la paroi interne de la colonne (sur la figure II.3). La faible quantité de phase stationnaire permet des analyses rapides mais impose l'injection d'une quantité très faible d'échantillon <1µg.

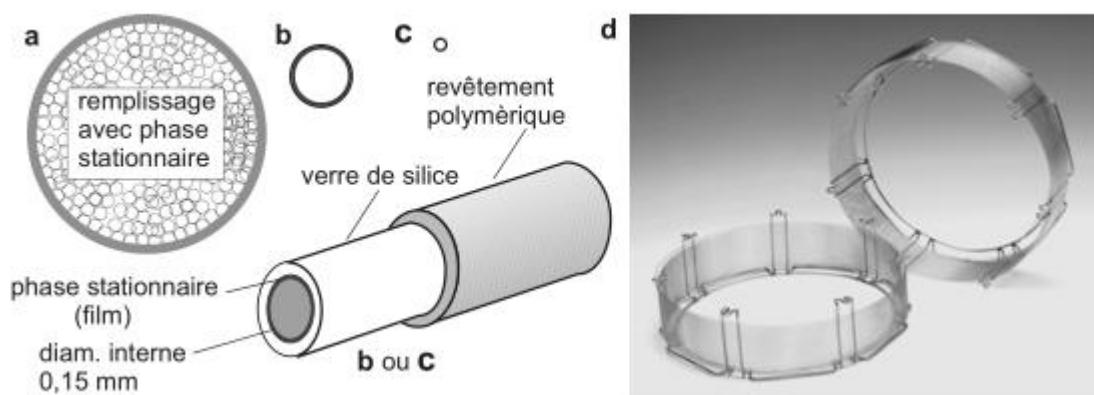


Figure.I.3:Colonnes de CPG.

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

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

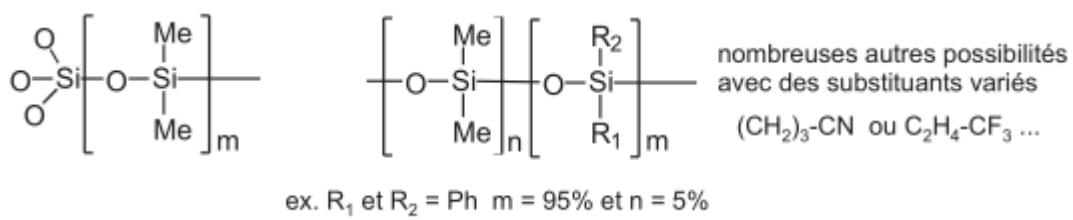
III.5.Phases stationnaires

Les phases actuelles correspondent à deux principaux types de composés : les polysiloxanes et les polyéthylèneglycols, chaque catégorie pouvant faire l'objet de modifications structurales mineures. On peut y ajouter les phases particulières à base de cyclodextrines pour l'étude des composés optiquement actifs. Toutes ces phases sont utilisables entre deux températures, l'une minimale au-dessous de laquelle les équilibres de concentration sont trop lents à se faire, l'autre qui définit la limite supérieure d'utilisation sans dégradation, qui dépend de la nature et de l'épaisseur du film.

Polysiloxane

Les polysiloxanes (également connus sous le nom d'huiles et gommes silicones), polymères polaires) correspondent à la répétition d'un motif de base comportant deux chaînes carbonées par atome de silicium :

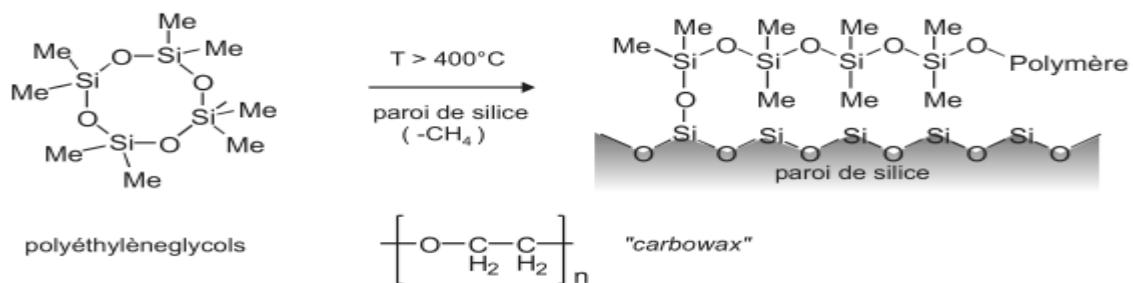
polysiloxanes greffés (exemples)



Polyéthylèneglycols (PEG)

Les représentants les plus connus de cette famille sont les Carbowax®, polymères polaires (M = 1 500 à 20 000 – pour le Carbowax 20M) qui peuvent être utilisés en mode déposé, imprégné ou greffé (40 < T < 240/260 °C, selon le type de colonne).

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse



Phases stationnaires solides

Ces phases sont constituées par des matériaux adsorbants divers : silice ou alumine désactivées par des sels minéraux, tamis moléculaires 5 Å, verres ou polymères poreux, carbone graphité (ex. Chromosorb ® 100, Porapak ®).

III.6. DéTECTEURS

On peut disposer :

- d'une analyse par spectrométrie de masse couplée à la sortie de colonne. On peut ainsi identifier chimiquement les analytes élues. Les équipements sont aujourd'hui très populaires car à des prix relativement accessibles et d'emploi assez simple. Il n'est pas possible d'expliquer en quelques lignes le couplage CPG-spectrométrie de masse et ce polycopié renvoie le lecteur - ce sujet - à des ouvrages spécialisés.
 - de détecteurs simples et quasi universels comme le catharomètre, le détecteur à ionisation de flamme (FID), le détecteur à capture d'électrons. Ces détecteurs « signalent » la sortie des analytes de la colonne mais n'en révèlent aucune propriété chimique.

III.6.1. Catharometre (détecteur a conductivité thermique) (très peu utilise)

Deux propriétés fondent le principe de ce détecteur :

- la température prise par un fil métallique chauffe électriquement dépend de la conductivité thermique du gaz qui l'entoure ;
 - la résistance électrique d'un conducteur varie avec la température.

III.6. 2. Le détecteur à ionisation de flamme (FID) (très utilisé)

Dans une flamme dihydrogène/dioxygène, la combustion de tout composé organique conduit à du CO₂

et a des sous produits ionisés. Un FID mesure les ions de combustion sous forme d'un courant électrique grâce à la polarisation du brûleur. Ainsi, chaque analyte donne un

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

pic d'élution ou la relation surface de pic = coefficient X quantité d'analyte est applicable.

Remarque :

- H₂O (pas de combustion évidemment), CS₂ et HCOOH ne sont pas détectés ;
- L'ensemble de détection est inclus dans un bloc règle en température (en général 250°C).

Le FID est un détecteur plus sensible que le catharomètre.

III.6. 3. Détecteur a capture d'électrons

Dans un détecteur a capture d'électrons, une source radioactive ionisante β (on utilise du tritium ou du ⁶³Ni) émet des électrons libres β dans une chambre d'ionisation et les électrons réagissent avec les molécules d'analytes qui atteignent la chambre.

III.6. 4. Autres détecteurs

D'autres détecteurs ont été mis au point, mais ils sont spécifiques, c'est à dire qu'ils ont une très grande sensibilité pour des catégories de produits. Par exemple, le détecteur à capture d'électron est utilisé pour les dérivés halogénés, nitrés et les produits présentant des groupements électronégatifs.

Tableau II.1 : Les différentes types des détecteurs

Type du détecteur (abréviation anglaise)	Sélectivité, produits détectés	Sensibilité
Ionisation à flamme (FID)	La plupart des produits organiques	10 ⁻¹⁰ g
Conductibilité thermique (TCD)	Universel	10 ⁻⁸ g
Capture d'électrons (ECD)	Produits halogénés, organométalliques	10 ⁻¹³ g
Thermo-ionisation (TID)	Produits azotés ou phosphorés	10 ⁻¹¹ g
Photo-ionisation (PID)	Produits oxygénés, soufrés, organométalliques...	10 ⁻¹² g
Photométrique (FPD)	Soufrés, phosphorés, organométalliques...	10 ⁻¹⁰ g
Spectromètre de masse (GC-MS)	Universel	10 ⁻¹⁰ g 10 ⁻¹⁶ g

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

III.6. 5.Enregistreurs

Relié au chromatographe, l'enregistreur reçoit les impulsions électriques venant du détecteur et les transmet sur un papier déroulant à une vitesse donnée sous forme de pics. On obtient un chromatogramme et c'est sur celui-ci que sont données toutes les informations nécessaires à l'analyse qualitative et quantitative.

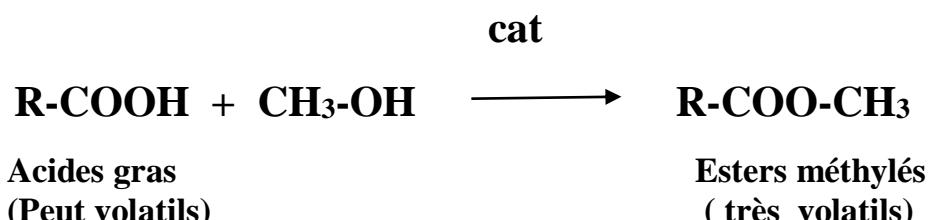
Actuellement, l'informatique tend à supplanter l'enregistreur, grâce aux logiciels d'applications (ex : Millenium). Ces logiciels sont capables, non seulement de conserver les signaux du détecteur dans un fichier de données, mais également d'en faire l'analyse qualitative (temps de rétention) et quantitative (calcul de surface de pic, courbe d'étalonnage, etc.).

IV. Technique expérimentale

Les principales étapes d'une analyse en chromatographie en phase gazeuse sont :

a) Préparation des échantillons Comme les composés injectés dans un chromatographe à gaz doivent être volatils dans les conditions expérimentales choisies, très peu d'aliments peuvent être injectés directement dans l'appareil. Les composés qu'on veut analyser doivent la plupart du temps être soumis à une purification, afin d'éliminer de l'échantillon les composés non volatils (minéraux, protéines, etc.) qui détérioreraient rapidement la colonne chromatographique, si injectés. La technique privilégiée pour une purification préliminaire est l'extraction avec un solvant organique, comme le dichlorométhane.

Les composés liquides ou solides à bas point de fusion sont habituellement injectés en solution dans un solvant qui ne posera pas d'interférence avec les composés sur le chromatogramme (le pic du solvant sort habituellement le premier). Quant aux solides à très faible volatilité, on utilise la technique de formation de dérivés, qui consiste à transformer le composé en un dérivé chimique dont la volatilité est plus grande. La transformation des acides gras en leurs esters méthyles en est un exemple classique :



- b) Ajustement des paramètres (débit de gaz, températures, etc.) pour la séparation optimale des composés du mélange inconnu.
- c) Injection des échantillons inconnus et des standards.
- d) Calculs pour l'analyse qualitative.
- e) Calculs pour l'analyse quantitative.
- f) Interprétation des résultats.

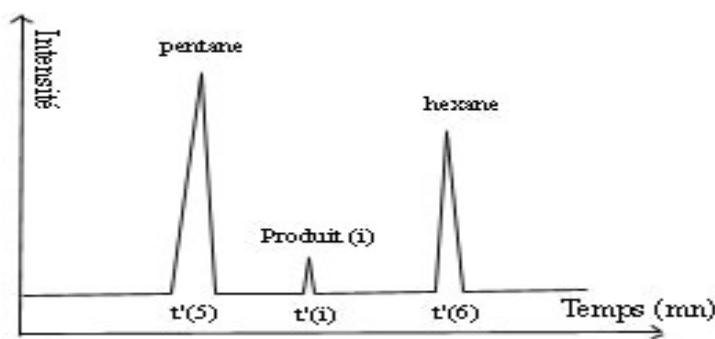
V. Analyse qualitative

V.1. Méthode par exaltation des pics

La chromatographie en phase gazeuse peut permettre l'identification d'un produit dans un mélange complexe. A cette fin on utilise le temps de rétention (t_r). Dans un mélange complexe on injecte un produit pur, cela permet de déterminer le temps de rétention de ce produit en comparant le chromatogramme obtenu avec celui du mélange seul. Cette méthode est utilisée en répression des fraudes (produits alimentaires...), on contrôle la présence du produit par une autre injection sur une autre colonne avec une phase stationnaire différente.

V.2. Méthode des indices de rétention

Les indices de rétention ont été définis par Kowats en 1958. A chaque produit (i) est associé un indice de rétention $I(i)$, cet indice déduit des formules (II.1 et II.2) est basé sur un système d'étalonnage par des hydrocarbures linéaires.



Les indices $I(i)$ se calculent de 2 manières différentes suivant le fonctionnement en température du chromatographe.

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

En mode isotherme, on injecte sur la colonne à une température et à une pression d'entrée données, les alcanes linéaires de formule C_nH_{2n+2} avec $n \geq 5$. On repère les temps de rétention réduits de ces alcanes $t'_r(n)$ et $t'_r(n+1)$ et celui du produit considéré $t'_r(i)$. Si un soluté est élué entre les deux alcanes (n) et (n+1), son indice de rétention I_i est donné par la formule suivante:

$$I_i = 100 \cdot \left(\frac{\log t'_r(i) - \log t'_r(n)}{\log t'_r(n+1) - \log t'_r(n)} \right) + 100 \cdot n \quad 2.1$$

Dans la formule 2.1, on peut employer indifféremment des logarithmes népériens ou des logarithmes décimaux. En mode programmation de température la formule est différente et utilise des temps de rétention "normaux" $t_r(i)$

$$I_i = 100 \cdot \left(\frac{t_r(i) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right) + 100 \cdot n \quad 2.2$$

Il résulte des formules. 2.1 et 2.2 que les alcanes linéaires ont des indices multiples de 100, $I(\text{pentane}) = 500$, $I(\text{hexane}) = 600\dots$

Ces indices de rétention se sont avérés remarquablement reproductibles

- Pour une phase stationnaire donnée, quelque soit le % d'imprégnation pour les colonnes remplies ou l'épaisseur du film pour les colonnes capillaires.
- Ils sont relativement indépendants de la température.

Cette bonne reproductibilité a été évaluée à + ou - 0,5%, ceci permet de comparer et d'utiliser des résultats venant de laboratoires différents. Il existe donc des tables répertoriant les indices de rétention de nombreux produits chimiques. "La bonne pratique du laboratoire de chromatographie" dit que un produit inconnu peut être identifié si l'on obtient une bonne coïncidence pour deux phases stationnaires différentes entre les indices de rétention de la littérature et les indices expérimentaux du produit.

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

VI. Les méthodes d'analyse quantitative

La CPG quantitative se base sur la comparaison de la hauteur ou de l'aire du pic de l'analyte avec celle d'un ou de plusieurs étalons. Si les conditions sont soigneusement contrôlées, ces deux paramètres varient linéairement avec la concentration.

On utilise la triangulation manuelle (multiplier la hauteur du pic par sa largeur à mi-hauteur) et l'intégration automatique, pour mesurer les aires des pics et déterminer pour chaque soluté, le coefficient de proportionnalité K_A . Il existe essentiellement quatre méthodes de quantification :

a) La normalisation

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

$$m_i = K_i S_i$$

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

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

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

$$\% (m_i) = 100 \cdot \frac{S_i}{\sum S_i} \quad 2.3$$

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

b) La méthode des ajouts

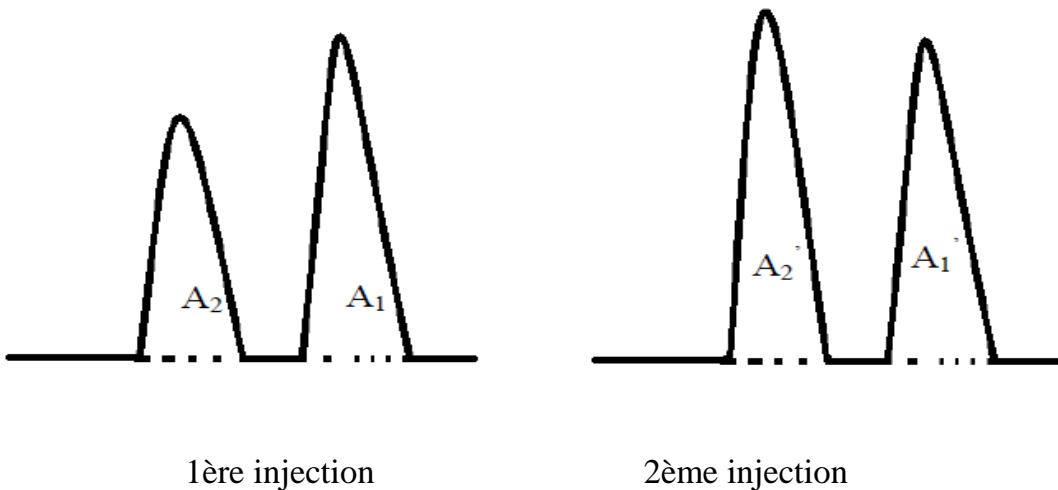
Cette méthode est utilisée dans le cas où la masse d'un constituant est en faible concentration dans le mélange. Pour cela on concentre le composé en question pour avoir une meilleure détection. On prend d'abord le chromatogramme du mélange de solutés à étudier.

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

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

On pèse ensuite exactement une masse **M** de ce mélange voisine de 1g par exemple et qui contient les masses mi des constituants. Puis on y rajoute une masse **m₀** du composé n°2, connue exactement, voisine de 300 mg environ. Le chromatogramme du nouveau mélange donne deux aires **A_{1'}** et **A_{2'}**. On obtient pour le pourcentage en masse du composé n° 2.

$$\% \text{ en masse} = \frac{m_0 \cdot 100}{M \left(\frac{A_1 \cdot A_2}{A'_1 \cdot A'_2} - 1 \right)} \quad 2.4$$



c) Etalonnage externe

➤ La méthode la plus directe d'analyse quantitative par CPG consiste à préparer une série de solutions étalons dont la composition est proche de la solution inconnue. Soit à doser un composé A dans un mélange. Après injection on peut écrire:

$$m_A = K_A S_A$$

➤ Préparer une gamme étalon : plusieurs solutions de concentration en A connue. Injecter les solutions de la gamme étalon. Déterminer la surface de chaque pic des différentes solutions.

➤ Tracer la courbe $m_A = f(S_A)$ la fonction obtenu doit être une droite qui passe par l'origine. Cette méthode permet de déterminer la masse ou la concentration du composé dosé. Son inconvénient majeur est le volume d'injection qui doit être

Chapitre II :La chromatographie en phase gazeuse

constant dans la détermination de la courbe d'étalonnage et lors de l'injection de la solution à doser.

d) Etalonnage interne

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

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

m_A^E de surface S_A^E

m_{EI}^E de surface S_{EI}^E

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

m_A^X de surface S_A^X

m_{EI}^X de surface S_{EI}^X

Pour la solution X (analysée)

$$m_A^X = K_A \cdot S_A^X \quad \text{et} \quad m_{EI}^X = K_{EI} \cdot S_{EI}^X \quad \Rightarrow \quad \frac{m_A^X}{m_{EI}^X} = \frac{K_A}{K_{EI}} \cdot \frac{S_A^X}{S_{EI}^X} \quad 2.5$$

Pour la solution étalon

$$m_A^E = K_A \cdot S_A^E \quad \text{et} \quad m_{EI}^E = K_{EI} \cdot S_{EI}^E \quad \Rightarrow \quad \frac{m_A^E}{m_{EI}^E} = \frac{K_A}{K_{EI}} \cdot \frac{S_A^E}{S_{EI}^E} \quad 2.6$$

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

En faisant le rapport membre à membre il vient:

$$\frac{\frac{m_A^x}{m_{EI}^x}}{\frac{m_A^E}{m_{EI}^E}} = \frac{\frac{K_A}{K_{EI}}}{\frac{S_A^x}{S_{EI}^x}} \Rightarrow \frac{m_A^x}{m_{EI}^x} = \frac{m_A^E}{m_{EI}^E} \cdot \frac{S_A^x}{S_{EI}^x} \cdot \frac{S_{EI}^E}{S_A^E} \quad 2.7$$

et enfin :

$$m_A^x = \frac{m_A^E}{m_{EI}^E} \cdot \frac{S_A^x}{S_{EI}^x} \cdot \frac{S_{EI}^E}{S_A^E} \cdot m_{EI}^x \quad 2.8$$

VII. Les applications

Les applications sont multiples et la liste ci-dessous est loin d'être exhaustive :

- analyses des produits pétroliers et des carburants
- détermination de la composition d'huiles essentielles, de parfums
- contrôle dans l'industrie pharmaceutiques des médicaments
- analyse des pesticides et insecticides
- recherches et synthèses organiques
- Toxicologie et recherche de drogues

Exercice d'application

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

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

Chapitre III : La chromatographie liquide haute performance

Chapitre III : La chromatographie liquide haute performance

I. Introduction

La chromatographie liquide haute performance est très utilisée dans tous les domaines de la chimie analytique. Son succès est du au fait qu'il est possible de modifier la résolution en jouant sur la composition de la phase mobile. Elle utilise des colonnes remplies d'une phase stationnaire constituée de particules sphériques de très petites dimensions de diamètre couramment compris entre 2 et 5 µm ce qui conduit à de grandes efficacité et résolution. L'inconvénient est que plus les particules sont petites et plus il est difficile de faire s'écouler le solvant, on doit donc utiliser des pompes spéciales qui poussent le solvant sous des pressions très élevées. A l'origine le P de H.P.L.C correspondait donc au mot Pression. La grande efficacité de la technique font que le P désigne actuellement le mot Performance

II.Principe :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

III.Appareillage

La chromatographie liquide à haute pression s'effectue avec un appareil commercial, dont les principales composantes sont vendues en modules séparés, ou incorporées dans le chromatographie, tel qu'illustre dans le schéma suivant :

Chapitre III : La chromatographie liquide à haute performance

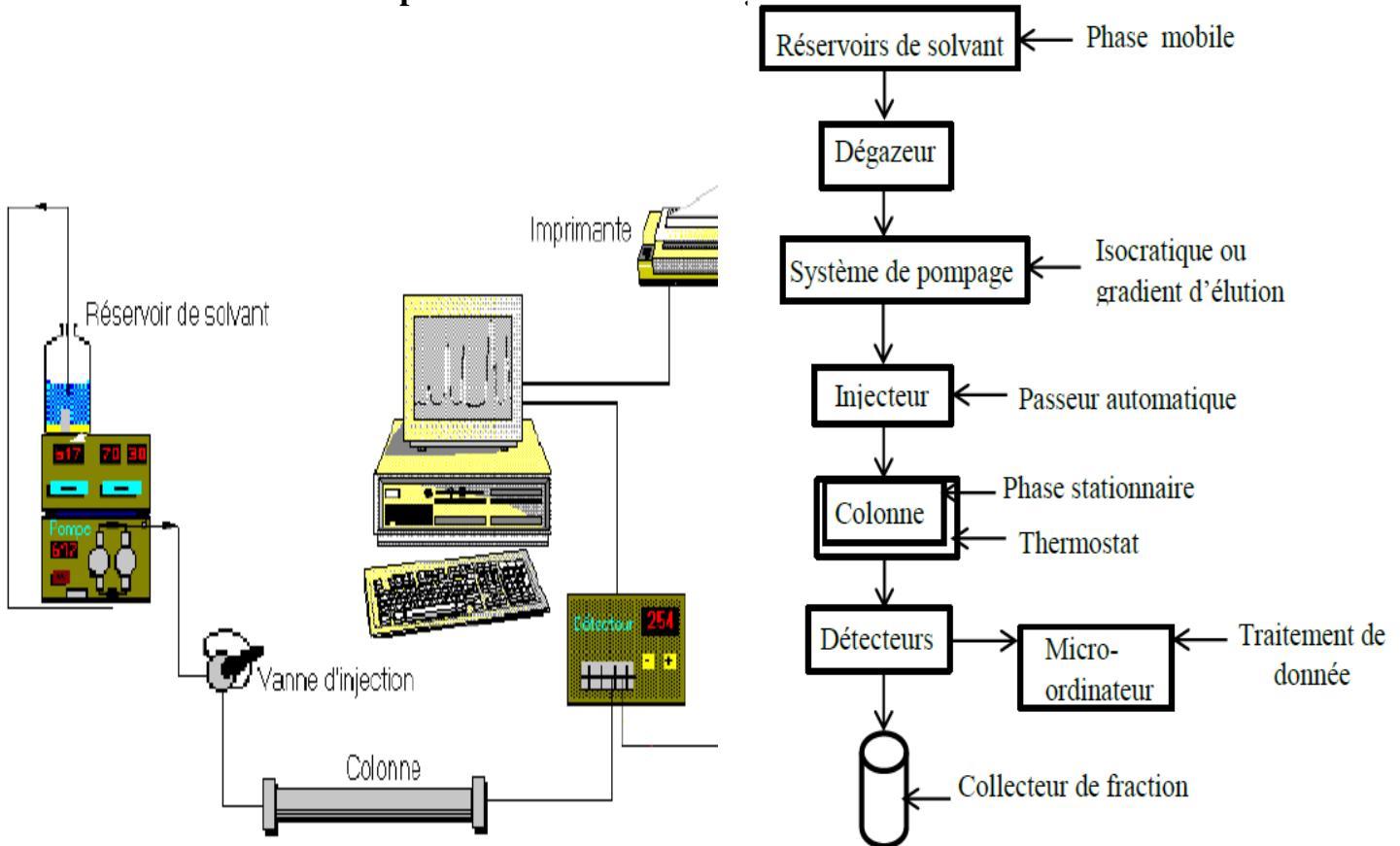


Figure.III.1 : Les composants d'un chromatographe liquide à haute performance

La phase mobile est pompée à partir d'une bouteille et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante. Le signal du détecteur est amplifié et enregistré.

III.1. Réservoir de solvants

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

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

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

Chapitre III : La chromatographie liquide haute performance

III.2.Pompe

Le rôle de la pompe en HPLC est de pousser l'éluant à travers la colonne à une pression élevée et à un débit constant. Elle doit être inerte à la corrosion des solvants utilisés, offrir un bon choix de débits et être conçue pour réduire les pulsations au minimum. Les pompes utilisées en HPLC sont des pompes à piston avec lesquelles les débits sont constants, la pression peut atteindre environ 500 bars, tel qu'illustré dans le schéma suivant :

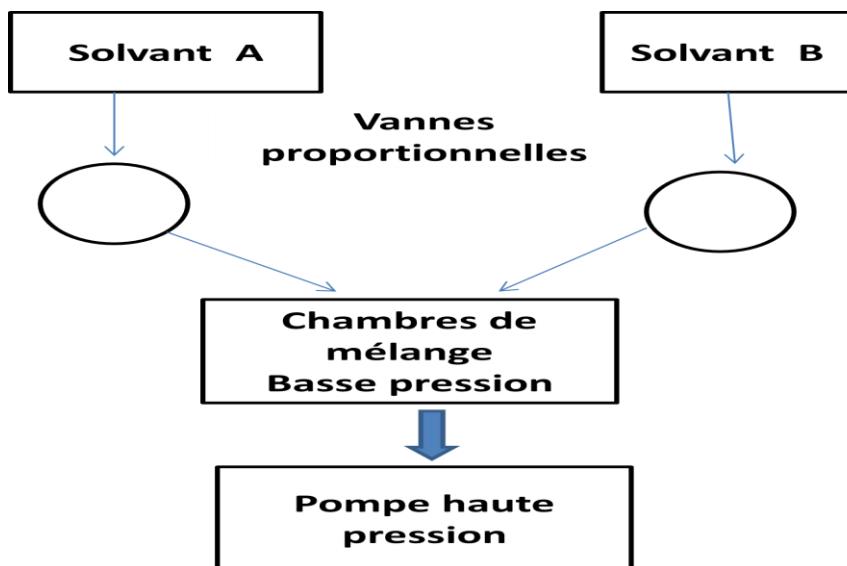


Figure.III.2 : Schéma d'une pompe en HPLC

Dans tous les cas on complète le dispositif avec divers éléments de régulation de la pression et du débit en particulier pour amortir les pulsations

Il existe deux modes de fonctionnement :

- Le mode isocratique pour lequel la composition de la phase mobile est fixe.
- Le mode gradient de solvant pour lequel on fait varier la composition du solvant en cours d'analyse en vue d'améliorer les séparations et surtout de raccourcir les temps d'analyse.

III.3 .Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 µL...). Cette boucle permet

Chapitre III : La chromatographie liquide haute performance

d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne. Vanne à boucle d'échantillonnage Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject). Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.

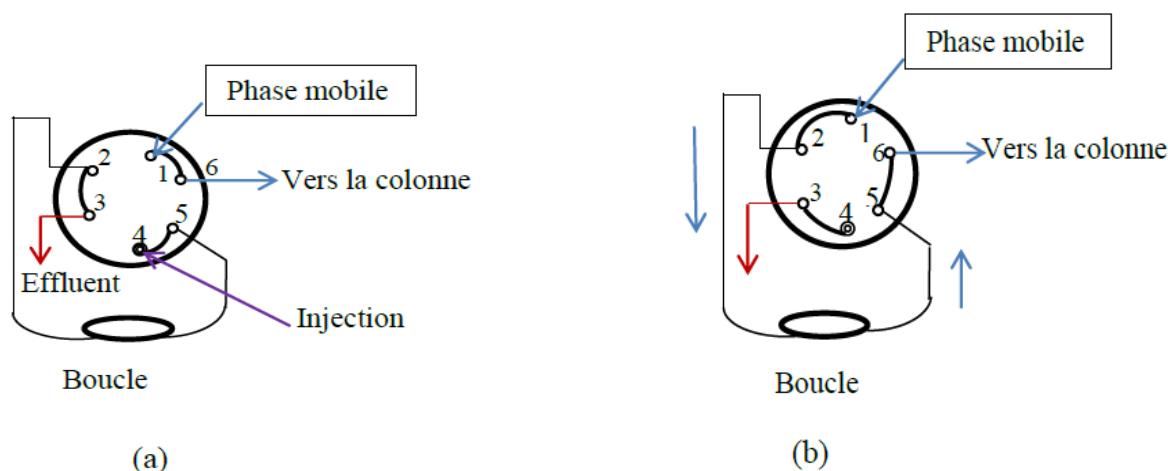


Figure. III.3 : Injecteur à boucle

(a) Remplissage de la boucle (b) Injection dans la boucle

III.4. Colonnes

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 5 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire (en silice, silice greffée ou particules polymériques), dont le diamètre des particules varie de 3 à 10 µm. Des compagnies se spécialisent dans la vente de colonnes pour HPLC.

Pour éviter l'obstruction et la détérioration des colonnes par les contaminants, on place habituellement une colonne de garde plus petite et moins dispendieuse au sommet de la colonne principale. Les colonnes de garde doivent être changées régulièrement.

Chapitre III : La chromatographie liquide haute performance

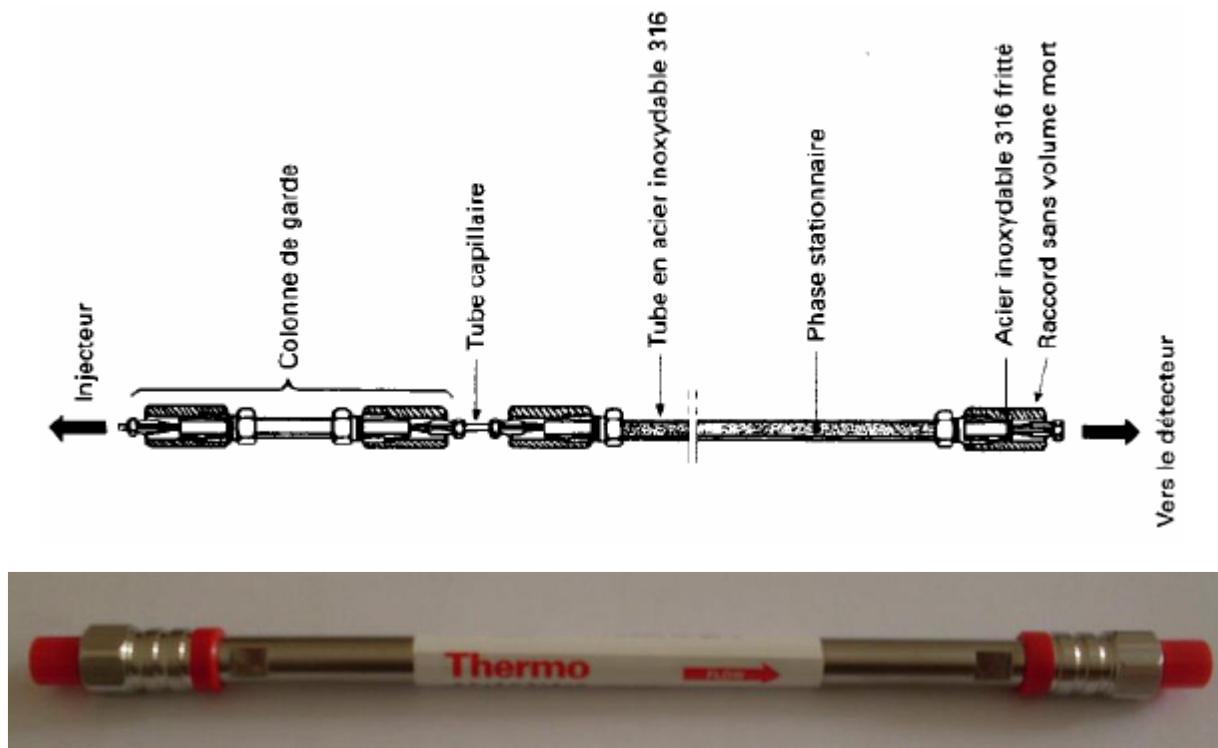


Figure.III. 4 : Colonne HPLC

III.5. DéTECTEURS

Le détecteur est placé à la sortie de la colonne chromatographique et doit être capable de détecter les composés qui sortent de la colonne. Le signal est converti en impulsion électrique qui est transmise à l'enregistreur, les détecteurs utilisés en chromatographie liquide à haute pression doivent posséder certaines qualités, dont les principales sont :

- une grande sensibilité
- une réponse linéaire sur une gamme de concentration élevée
- une capacité à détecter le plus de produits possible.

Les principaux détecteurs utilisés en HPLC sont :

Chapitre III : La chromatographie liquide haute performance

a) DéTECTEUR à absorbance dans l'U.V. et le visible

Le détecteur mesure l'absorbance du liquide qui sort de la colonne, à une longueur d'onde déterminée par le filtre utilisé. Son principal inconvénient est qu'il ne détecte que les composés qui ont une absorbance appréciable à la longueur utilisée.

b) DéTECTEUR à indice de réfraction

Le détecteur mesure l'indice de réfraction du liquide sortant de la colonne. C'est un détecteur universel puisque l'indice de réfraction de l'éluant est modifié lorsqu'un composé, quel qu'il soit, sort de la colonne. Il donne une réponse similaire pour les composés de la même famille (ex. : sucres), mais son principal inconvénient est sa faible sensibilité.

c) DéTECTEUR électrochimique

Cette méthode de détection ne s'adresse qu'à la détection de molécule douée de propriétés oxydoréduction. Son principe repose sur la mesure du courant qui circule dans une cellule d'électrolyse lors de l'oxydation ou de la réduction du soluté contenu dans la phase mobile.

d) 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).

III.6. Intégrateur - 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.

La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

* la largeur attendue des pics

* le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic.

Chapitre III : La chromatographie liquide haute performance

IV. Technique expérimentale

Les principales étapes d'une analyse en chromatographie liquide à haute pression sont similaires à celles de la chromatographie en phase gazeuse :

a) Préparation des échantillons

Les produits doivent habituellement être soumis à une purification préliminaire pour éliminer du mélange les produits indésirables. Les extraits obtenus sont filtrés sur une membrane jetable de type *Luer* de 0,5 µm ou moins, avant d'être injectés.

b) Ajustement des paramètres (débit d'éluant et pression, nature de l'éluant, etc.) pour la séparation optimale des composés du mélange inconnu.

c) Injection des échantillons inconnus et des standards.

d) Calculs pour l'analyse qualitative et quantitative.

e) Interprétation des résultats.

V. Résultats et interprétation

Comme en chromatographie en phase gazeuse, les résultats apparaissent sous forme de pics sur le chromatogramme. On utilise donc les mêmes méthodes pour effectuer l'analyse qualitative et quantitative des composés.

Exercice d'application

Les appareils actuels de HPLC peuvent utiliser des colonnes de 300 µm de diamètre interne pour lesquelles le débit optimum conseillé est de 4 µL/min.

1. Montrer par un calcul simple que ce débit conduit pratiquement à la même vitesse linéaire de la phase mobile que pour une colonne de même type mais d'un diamètre de 4,6 mm pour laquelle le débit conseillé est de 1 mL/min.

2. La séparation d'un échantillon comportant 16 HPA (hydrocarbures polyaromatiques) a été effectuée sur une colonne de type C18 ($L = 25$ cm, $d = 300$ µm). Le débit de la phase mobile (acétonitrile/eau) est de 4 µL/min. L'un de ces HPA a un temps de rétention de 48 min.

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

Chapitre IV :Chromatographie sur couche mince

Chapitre IV :Chromatographie sur couche mince

I.Introduction

Bien que découverte en 1938, ce n'est qu'en 1958 que fut popularisée la chromatographie sur couche mince, telle que nous la connaissons actuellement. Cette technique a rapidement supplanté la chromatographie sur papier, car elle est plus rapide et est utilisée autant pour les composés polaires que non polaires.

II. Principe

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.

III. Appareillage

Pour réaliser ce type d'analyse, il nous faut :

III.1.une cuve chromatographique

Un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

III.2. la phase stationnaire :

Une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant, fixée sur une plaque de verre, de plastique ou d'aluminium, à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris), l'amidon ou un polymère organique. Il est important de préciser que l'on emploie pas le même type de phase stationnaire pour tout les produits. Par exemple, la silice étant légèrement acide, les produits sensibles (acétals par exemple) pourraient se décomposer. On préfère alors l'emploi d'alumine neutre.

Chapitre IV : Chromatographie sur couche mince

Le choix de la plaque peut avoir son importance. Ainsi on n'utilisera pas une plaque de verre avec un solvant un acide fluorhydrique ; ou une plaque d'aluminium en solution basique. Certaines plaques sont traitées par une substance fluorescente qui permet la révélation aux UV.

III.3. L'échantillon

Environ un microlitre de solution diluée (de 2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.

III.4. L'éluant (phase mobile)

Le choix du solvant peu être délicat, même pour les expérimentateurs confirmés et il faut le plus souvent faire des essais de séparation avant de se lancer vraiment dans l'analyse chromatographique. On retiendra tout de même qu'un solvant polaire entraînera facilement les substances polaires et peu les substances apolaires.

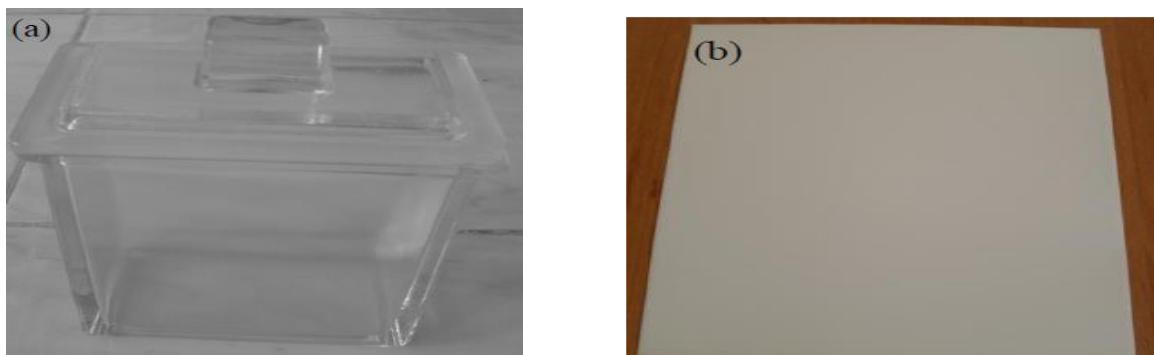


Figure IV.1 : (a) Cuve chromatographique (b) Plaque CCM (c) Schéma d'un montage CCM

IV. Conduite de la chromatographie

IV.1. Dépôt de l'échantillon.

L'échantillon est mis en solution dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant. On trace sur la plaque à 1 cm du bord inférieur un très fin trait au crayon de papier qui servira à repérer les dépôts ; on veillera à ne surtout pas abîmer la surface de la plaque (ce qui fausserait l'analyse). La solution à analysée est alors déposée en un point de cette ligne.

Il est important que le diamètre de la tache produite au moment du dépôt soit faible. Il ne doit pas dépasser 3 mm. Si trop peu de produit a été déposé, après avoir séché la plaque, on pourra recommencer le dépôt jusqu'à ce qu'on estime la quantité de produit suffisante.

L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité du tube sur la couche d'adsorbant en prenant soin de ne pas la détériorer. Pour vérifier la présence d'un composé dans un mélange, on fera un dépôt du produit pur à côté du mélange. Ces témoins permettront de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à analyser.

IV.2. Développement.

Il s'agit en fait de faire migrer les composés déposés.

Pour cela, on place dans la cuve un peu de solvant (sur une hauteur d'environ 0.5 cm) puis on introduit verticalement la plaque. L'éluant ne doit pas être en contact avec la tache de produit. Pendant toute la durée de l'élution, la cuve restera fermée et ne devra pas être déplacée. Une fois le solvant à environ 1 cm du bord supérieur de la plaque, on la sort et on marque le front du solvant au crayon. Puis on laisse sécher la plaque.

IV.3.La révélation !

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches seront ensuite entourées au crayon.

Quelques méthodes de révélation :

- a) *la plaque contient un indicateur fluorescent* : on soumet la plaque à un rayonnement UV et les composés sont révélés sous forme de taches sombres.

Chapitre IV : Chromatographie sur couche mince

- b) *les UV (254 nm)* : en exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés (systèmes conjugués ou aromatiques) apparaissent sous forme de taches brillantes.
- c) *l'iode* : on plonge la plaque dans un bocal contenant un fond d'iode broyé. Les composés apparaissent sous forme de taches brunâtres.
- d) *le révélateur photomolybdique* : c'est un révélateur universel obtenu en dissolvant 3 g d'acide phosphomolybdique dans 100 ml d'éthanol. A manipuler avec précaution.
- e) *le révélateur au p-anisaldéhyde* : révélateur universel obtenu en dissolvant 4.5 g de para-anisaldéhyde, 5 ml d'acide acétique à 99 % et 5 ml d'acide sulfurique concentré dans 85.5 ml d'éthanol à 95 %.
- f) *le révélateur de Dragendorff* : spécifique des amines.

Solution A : solution de nitrate de bismuth (1.7 g), d'acide acétique (20 ml) dans 80 ml d'eau.

Solution B : dissoudre 72 g d'iodure de potassium dans 180 ml d'eau.

On mélange 1.5 ml de A avec 2 ml d'acide acétique, 5 ml d'eau et 1.5 ml de B

- g) *l'atomisation* : on pulvérise un réactif uniformément sur la plaque.

Le nitrate d'argent pour les halogénoalcanes, la 2.4-DNPH pour les carbonyles et la ninhydrine pour les acides aminés.

ATTENTION : lors de la révélation aux UV, le port de lunette de protection adaptée est obligatoire...

IV. 4. Le rapport frontal R_f

Il s'agit du rapport : distance parcourue par le soluté / distance parcourue par le solvant.

Ainsi, un soluté très soluble dans la phase stationnaire aura un R_f faible ; alors qu'un composé très soluble dans la phase mobile, verra son R_f proche de 1.

Le rapport frontal d'un produit donné dépend de nombreux paramètres : nature du revêtement de la plaque CCM (silice ou alumine), concentration de l'échantillon, nature des solvants d'élution... C'est pourquoi il n'existe malheureusement pas de table de rapports frontaux pour tous les composés organiques.

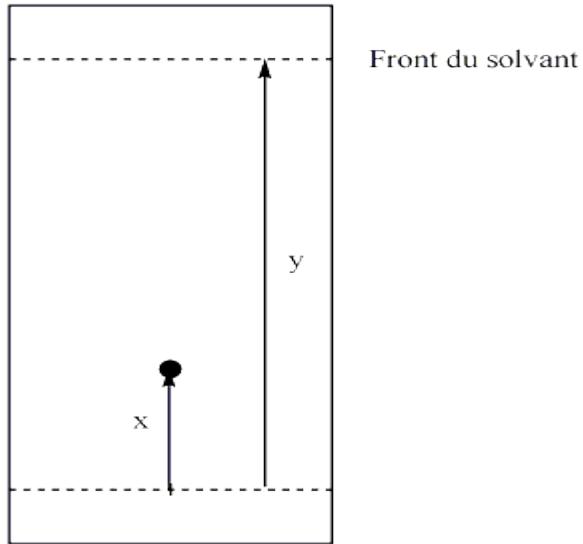


Figure IV.2 : Plaque CCM

$$R_f = x/y \quad 4.1$$

V. Efficacité d'une plaque CCM

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

$$N = 16(x^2/w^2) \quad \text{et} \quad H = x/N \quad 4.2$$

La résolution est exprimée par la relation:

$$R = 2(x_2 - x_1)/(w_2 + w_1) \quad 4.3$$

w est le diamètre de spot

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

$$K' = (1/R_f) - 1 \quad 4.4$$

VI. Application de la CCM

VI.1. Application de la CCM au suivi d'une réaction

L'ensemble des méthodes d'analyses (RMN, IR, LCMS – chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse - ...) permettent d'assurer le suivi d'une réaction chimique. C'est-à-dire déterminer :

- A quel moment les réactifs de départs ont été totalement consommés,

Chapitre IV : Chromatographie sur couche mince

- A partir de quel moment la réaction semble ne plus avancer
- Le nombre de produits formés.

La CCM permet également cela, et à bien moindre coût puisque qu'il suffit d'un petit prélèvement du milieu réactionnel, d'un échantillon des réactifs et d'un solvant d'élution.

Pour assurer le suivi, on opère généralement comme suit :

- un dépôt par réactif de départ
- un dépôt mélangé (réactifs de départ + milieu réactionnel)
- un dépôt du milieu réactionnel.

Après élution et révélation, on obtient dans le cas où la réaction chimique est terminée le type de plaque suivante :

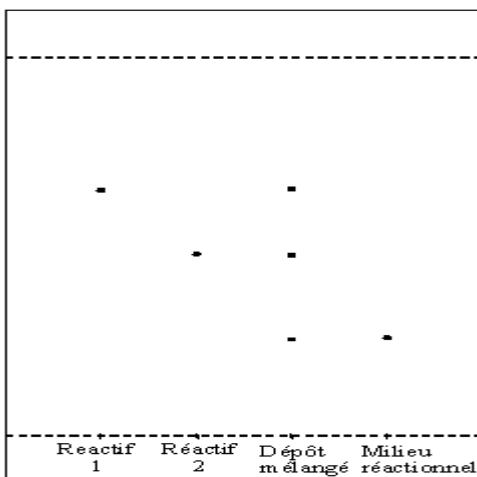


Figure IV.3 : Plaque CCM

On remarque que les deux produits de départs ont totalement réagi pour donner un unique produit.

VI.2. Application de la CCM à la purification

La CCM va enfin permettre la purification d'un composé. La CCM va alors pouvoir être employée :

- comme étude préliminaire à une purification par chromatographie liquide flash
- comme moyen de purification à l'aide de plaque spéciale.

Chapitre IV :Chromatographie sur couche mince

Dans le cadre d'une étude préliminaire, la CCM va permettre de sélectionner le solvant ou le mélange de solvant à employer pour permettre une purification efficace d'un produit. En effet, dans le cadre de la chromatographie flash, on essaie de choisir un solvant permettant au composé à purifier d'avoir un rapport frontal inférieur à 0,3.

Les composés avec un rapport supérieur à 0,3 auront tendance à être entraînés par le front de solvant. En modifiant la polarité du solvant, on se rapprochera de ce rapport fatidique pour le composé à purifier.

Enfin, il est possible de purifier les composés directement par CCM. On utilise pour cela des plaques en verre de dimension 20x20 cm avec une importante couche d'absorbant. Le produit à purifier est dissout dans un solvant et déposé en ligne droite à environ 1.5 cm du bord inférieur de la plaque. La plaque est ensuite éluée puis séchée. On révèle la plaque sous UV (ce qui permet de repérer où se trouve le produit qui nous intéresse) puis l'on gratte la couche de silice correspondante. Il ne reste plus qu'à extraire le composé de la silice avec un solvant que l'on évaporera pour récupérer notre produit pur.

Les exercices d'application

Exercice .1

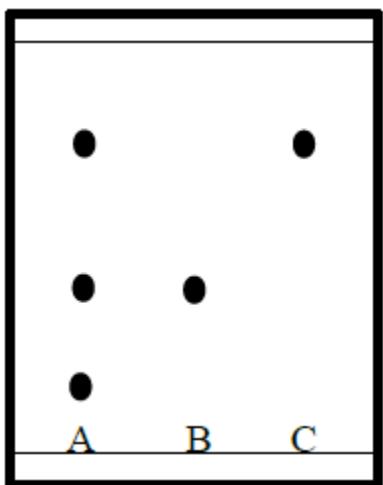
Un échantillon contenant deux composés A et B est séparé par CCM. Au bout de 15 min de développement, le front du solvant est à 8,3 cm du départ, le composé A à 7,5cm et le composé B à 2,3 cm. Calculer le Rf des deux composés.

Exercice .2

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

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

Chapitre IV : Chromatographie sur couche mince



Exercice .3

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

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

Sachant que : $x_A = 31 \text{ mm}$ et $w_A = 1,5 \text{ mm}$

$x_B = 26 \text{ mm}$ et $w_B = 2,2 \text{ mm}$

Exercice .4

On a réalisé la chromatographie de deux échantillons et d'une référence. L'exploitation du chromatogramme a fourni les résultats suivants :

- Front du solvant $H = 8,0 \text{ cm}$ - échantillon
 - A : deux taches situées à 3,0 cm et 4,0 cm de la ligne de base
 - échantillon B une tache située à 5,0 cm de la ligne de base
 - référence le menthol M : $R_f = 0,5$
- La chromatographie a-t-elle mis en évidence des espèces chimiques pures.
 - Les échantillons A et B renferme-t-il du menthol ?

Références

Bounias,M. L'Analyse Biochimique Quantitative par Nanochromatographie en Couche Mince. Masson, Paris ,1983.

Burgot. G, Burgot.J.L.Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications, méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales, Tec et Doc, 2002.

De Graeve. J, Berthou. F, Prost. M. Methodes Chromatographiques Couplées a La Spectrometrie de Masse ,Masson, Paris,1986.

Fried. B, Sherma. J.(Eds), Handbook of Thin-Layer Chromatography, Marcel Dekker, New York,1996.

Gardais.J.F, Gorin.P, Prévot.A, Serpinet, Tranchant.J et al. Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse ,3ème éd, Masson,Paris, 1982.

Kirkland.J.J, Ed, Moderne Practice of Liquide Chromatography,Wiley-interscience ,New York ,1971.

Krebs .K.G . in Thin Layer Chromatography, 2nd ed. Springer Verlag. E.STAHL, Ed, New York ,1969.

Mahuzier. G, Hamon. M. Abrégé de Chimie Analytique,Tome 2,2ème édition,Masson, Paris , 1990.

Mongold .H.K. in Thin Layer Chromatography, 2nd ed. Springer Verlag. E.STAHL, Ed , New York ,1969.

Petitjean. P, Henin. O, Ellias. S, Gruau. G. Application de l'électrophorèse capillaire au dosage des anions et des cations majeurs en solution dans les eaux douces naturelles, cahiers techniques de géosciences, Rennes N°2 ,2001.

Rosset.R, Caude.M, Jardy.A. Chromatographies en Phases Liquide et Supercritique, Masson, Paris,1991.

Références

- Rouessac. F, Rouessac. A. Analyse Chimique, 6ème édition, Masson, Paris,2004.
- Skoog .D.A, West. D.M, Holler .F.J, Crouch.S.R et al .Chimie Analytique, 8ème edition , De Boeck,Bruxelles ,2013.
- Skoog. D. A, Holler. F. J, Nieman. T. A. Principes d'Analyse Instrumentale. De Boeck Supérieur,Paris, 2003.
- Tranchant. J, Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse, Masson ,Paris, 1994.