

Les Techniques Chromatographiques

Pr. S. KILANI-MORAKCHI

- Méthode d'analyse qualitative et quantitative
- Séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases

Stationnaire

Mobile

la séparation des composants entraînés par la phase mobile est basée sur:

Adsorption= tendance d'une molécule à se lier sur un solide finement divisé

Solubilité= tendance d'une molécule à se dissoudre dans un liquide

Volatilité= tendance d'une molécule à passer à l'état de vapeur

Nature des phases

Phase stationnaire: peut être solide ou liquide
(immobilisée sur une phase fixe)

Phase mobile: Un gaz (phase mobile est appelée gaz vecteur ou gaz porteur)

Un liquide (phase mobile est appelée éluant)

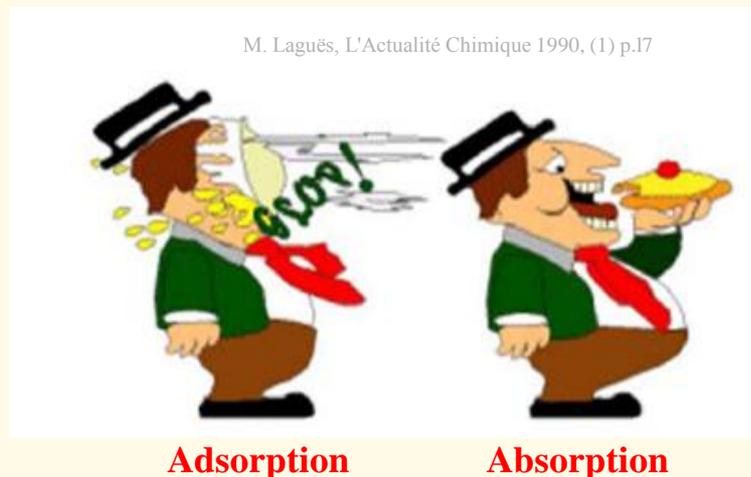
Nature des phénomènes

- **Chromatographie d'adsorption**
- **Chromatographie de partage**
- **Chromatographie par échange d'ions**
- **Chromatographie d'exclusion**

Chromatographie d'adsorption

La phase stationnaire est un solide doué de propriétés adsorbantes

L'adsorption est un phénomène d'interface à la différence de l'absorption



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

Séparations sont basées sur le principe de **polarité** c'est à dire l'existence de dipôles.

Par extension on pourrait y rattacher la **chromatographie d'affinité** où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis à vis d'un composé ou d'une famille de composés

Adsorbants possibles (du moins polaire au plus polaire):

Papier, cellulose, amidon, carbonate de sodium, gel de silice, alumine, charbon activé.

Polarité: caractéristique décrivant la répartition des charges négatives et positives dans un dipôle.

La polarité d'une liaison est due à la différence d'**électronégativité** entre les éléments chimique qui la composent.

Electronégativité: C'est la tendance qu'a un élément à attirer le doublet de liaison vers lui dans sa liaison avec un autre élément.

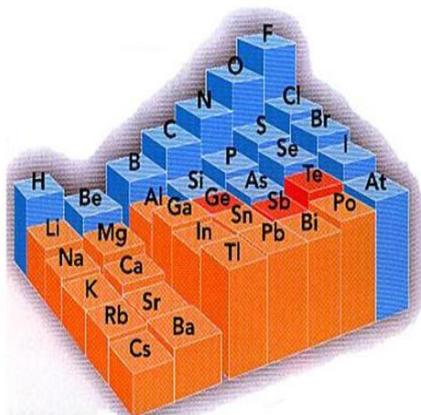
Une liaison est dite polaire, si la différence entre les électronégativités des deux atomes n'est pas nulle

Classification des techniques chromatographiques

► ► L'électronégativité des éléments augmente de gauche à droite dans une même ligne et de bas en haut dans une colonne du tableau périodique.

H 2,1							He 0
Li 1,0	Be 1,5	B 2,0	C 2,5	N 3,0	O 3,5	F 4,0	Ne 0
Na 0,9	Mg 1,2	Al 1,5	Si 1,8	P 2,1	S 2,5	Cl 3,0	Ar 0

Echelle d'électronégativité de PAULING pour quelques éléments chimiques



L'atome de chlore est plus électronégatif que l'atome d'hydrogène, il attire vers lui les deux électrons de la liaison. Apparition d'un dipôle, grandeur vectorielle dirigée de $\delta+$ vers $\delta-$ (δ : excédent de charge)



Chromatographie de partage

La phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile

Séparations sont basées sur la **solubilité** dans un solvant liquide.

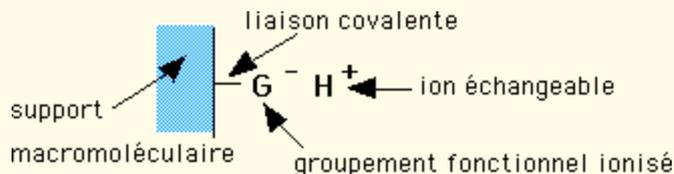
Fait intervenir un **coefficient de partage**: On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents. Les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que ceux qui le sont moins.

Chromatographie par échange d'ions

Phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés

Séparations sont basées sur la **charge électrique**.

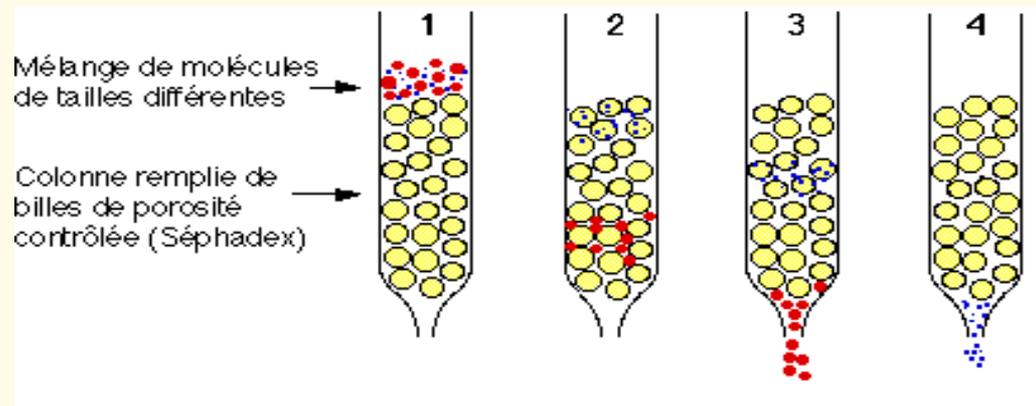
la phase stationnaire comporte des groupements ionisés (+ ou -) fixes; des ions mobiles de charge opposée assurent l'électroneutralité. Les ions retenus au voisinage des charges fixes sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile.



- les échangeurs de cations portent des groupements chargés (-)
- les échangeurs d'anions portent des groupements chargés (+)

Chromatographie d'exclusion

La phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur **taille** et de leur **forme**; on parle aussi de chromatographie de filtration sur gel



Les grosses molécules, celles dont le diamètre est supérieur à celui des pores, sont exclues et éluées les premières; les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses, leur migration est freinée en diffusant dans le gel

Les solutés sont élués dans l'ordre inverse de leurs masses molaires

procédé opératoire

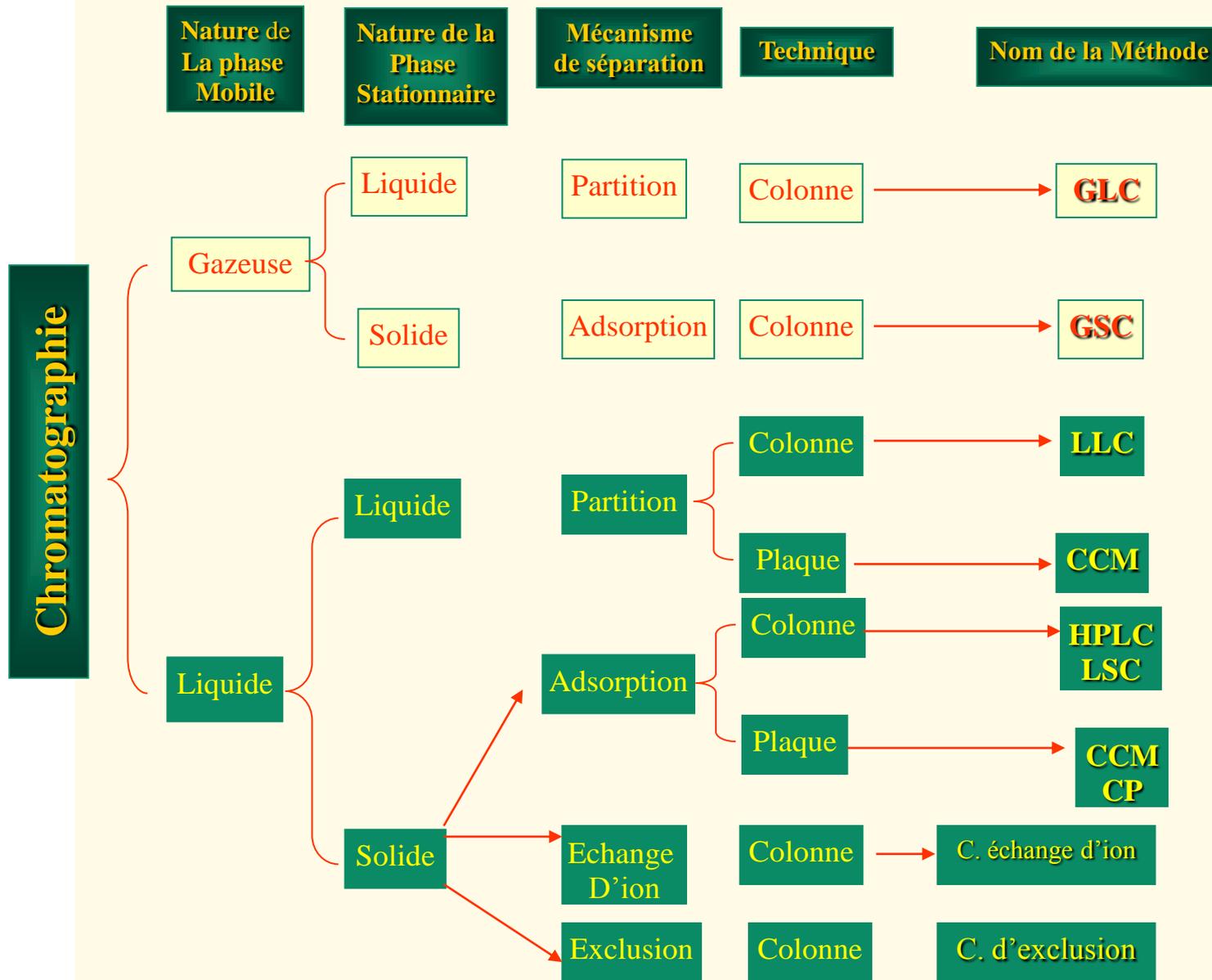
Selon le conditionnement de la phase stationnaire :

- la chromatographie sur **colonne**
- la chromatographie sur **papier**
- la chromatographie sur **couche mince**

Selon les modalités de migration de la phase mobile:

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

Classification



Chromatographie en phase gazeuse

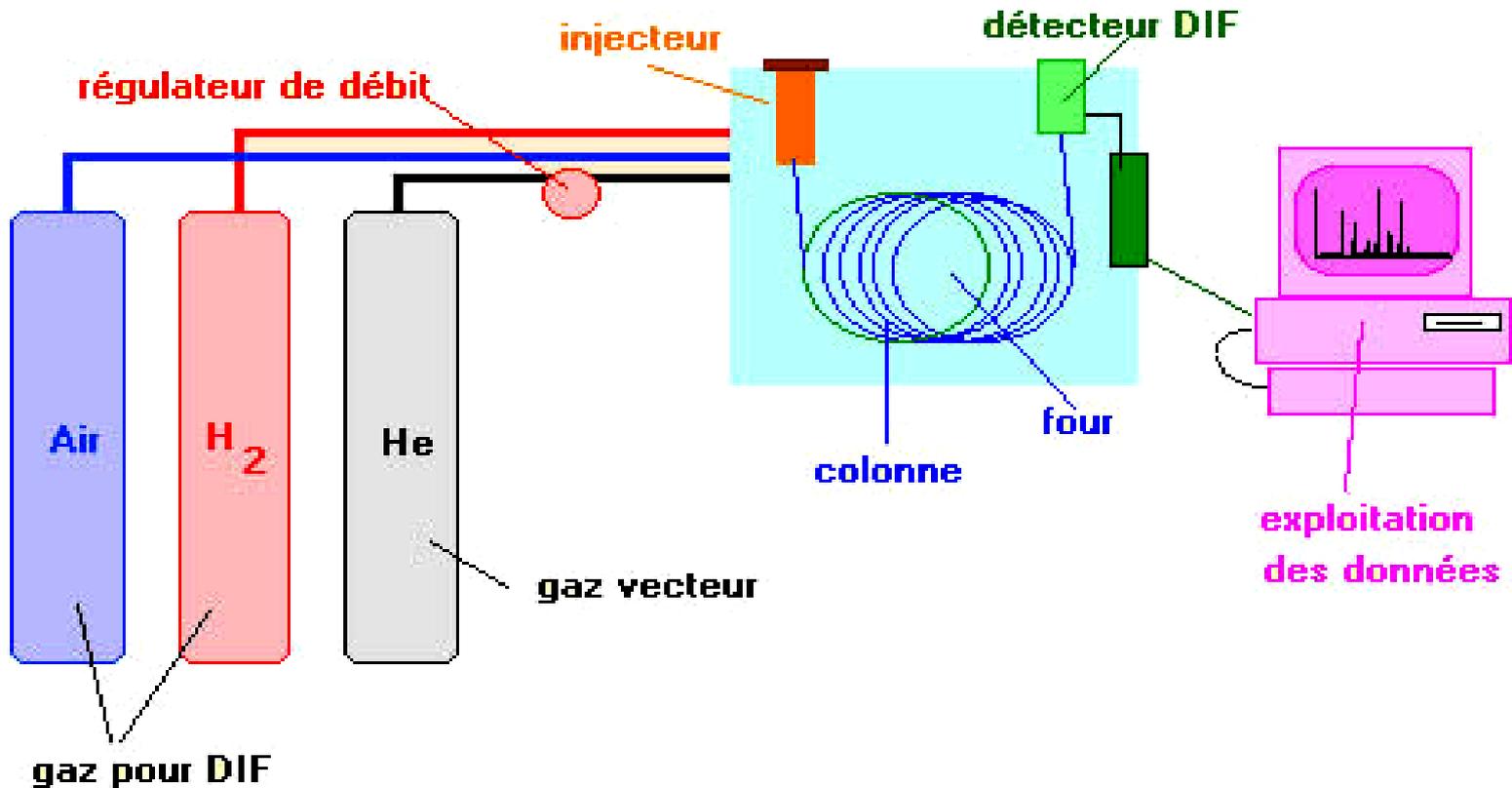
- Moyen d'analyse **qualitative** et **quantitative** des gaz et liquides volatils
- Applicable pour des petites quantités et des constituants de mélange complexe.
- L'échantillon (vapeur ou gaz) est adsorbé sélectivement par une phase stationnaire et il est entraîné à débit constant par une phase mobile.
- Cette chromatographie se réalise à une température qui permet le maintien des composés dans cet état sans provoquer leur modification ou leur destruction.

- La séparation des différents constituants est due aux différences d'affinité des divers constituants pour la phase stationnaire

Principales applications :

- Analyse pétrochimique
- Industrie des arômes, des parfums
- Environnement: contrôle pollution (eaux, sols, atmosphère)
- Industrie pharmaceutique
- Police scientifique
- Recherche scientifique

Chromatographie en phase gazeuse: Appareillage



Un chromatographe est constitué en première approximation de trois organes essentiels :

l'injecteur, le détecteur, la colonne



L'appareil



CP 9000, Varian

L'injecteur

- Permet d'introduire un liquide qui doit être vaporisé instantanément avant d'être transféré dans la colonne. Sa température doit être supérieure d'environ 20°C à la température du produit le moins volatil.
- Le gaz vecteur, de préférence préchauffé, entre dans une chambre chauffée, obturée par une pastille d'élastomère, le *septum*, qui assure l'étanchéité. **Changer le septum périodiquement (assure l'étanchéité en tête de colonne)**
- A l'aide d'une seringue hypodermique de petite capacité, on pique au travers du septum, afin que l'extrémité de l'aiguille arrive au-dessous du niveau de l'arrivée du gaz porteur, puis on pousse le piston pour réaliser l'injection. **Faibles volumes injectés 0,5 à 2µl.**
- Il ne faut pas oublier de nettoyer la seringue d'injection avec un solvant volatil après chaque injection, puis de la sécher convenablement.

Exemple d'injecteur



➡ Injecteur Split-Splitless

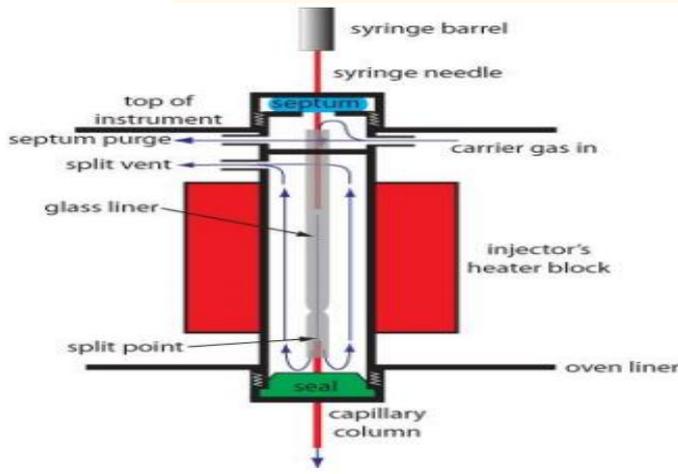
➡ Chauffé à haute température : 270°C.

➡ Permet l'introduction de l'échantillon à analyser.

L'échantillon est vaporisé instantanément et est entraîné vers la colonne grâce au gaz vecteur.

Une grande partie de l'échantillon injecté est éliminée par une vanne de fuite.

Injecteur Split (injection d'une partie de l'échantillon)/Splitless (injection de la totalité de l'échantillon).

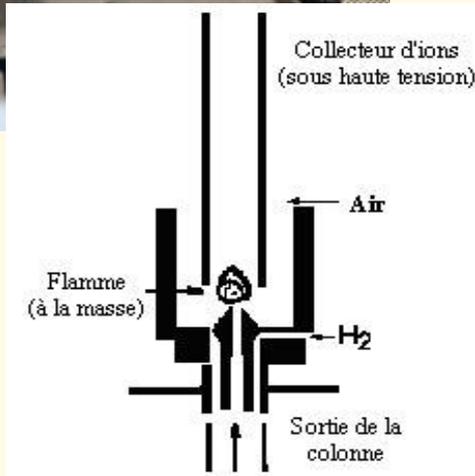
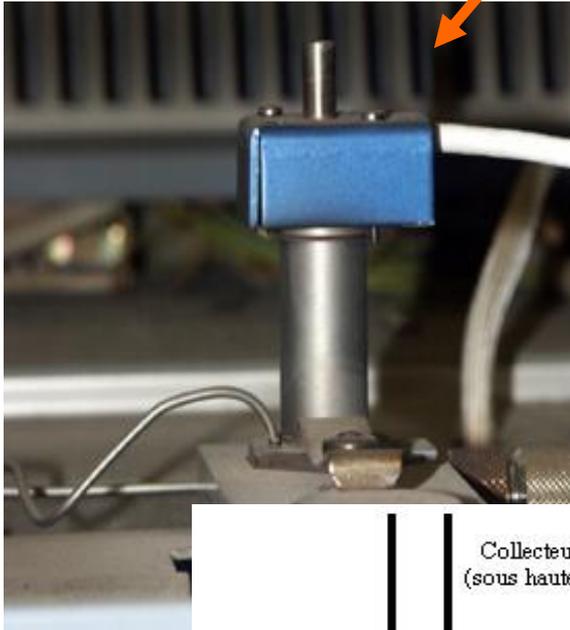


Le détecteur

- Il permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne. La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes

Le détecteur à ionisation de flamme est un détecteur sensible utilisé pour les composés organiques

Le détecteur



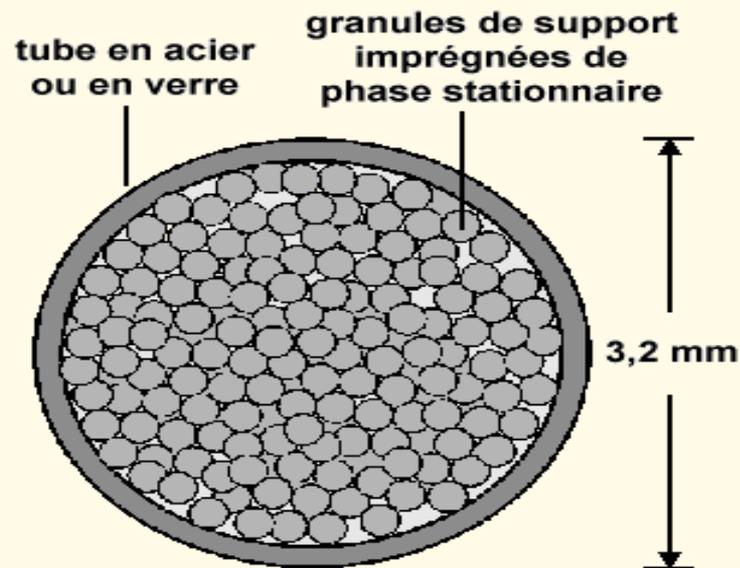
- Détecteur à Ionisation de Flamme (F.I.D): grande sensibilité
- Mise en évidence des différents composés chimiques séparés.
- Chauffé à haute température 280°C.

→ Composés dégradés en ions et en particules chargées qui sont collectés par deux électrodes. Après amplification, le courant qui en résulte est mesuré par un électromètre, ce qui donne un pic sur l'enregistreur.

L'aire du pic reflète la quantité du composé élué.

La colonne

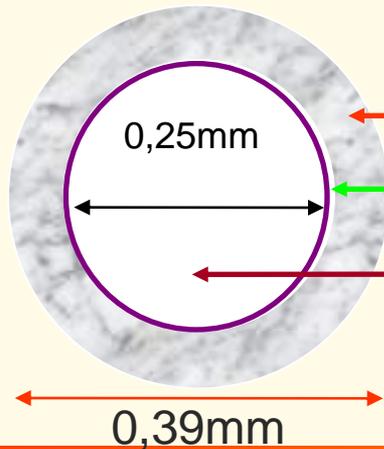
Constituée d'un tube généralement métallique de diamètre intérieur de l'ordre du millimètre. Ce tube contient la phase stationnaire constituée par un liquide adsorbant fixé sur un solide inerte.



On distingue:

- les colonnes à remplissage proprement dit, constituées d'une tubulure en verre, acier ou autre métal (les plus fréquentes sont en acier inoxydables), dont les dimensions varient de 2 à 6 mm pour le diamètre intérieur et de 1 à 10 m pour la longueur. Le support remplissant la colonne est constitué de grains dont les dimensions varient de 60 à 70 μm (ex: silice). La phase stationnaire est un liquide peu volatil, formant environ 10% de la masse du support non imprégné.
- On utilise, actuellement, des *colonnes capillaires*, formées d'un tube de métal, de verre, de silice fondue ou de quartz, dont le diamètre intérieur est de l'ordre de 0,2 à 0,5 mm et la longueur de 50 à 100 m, ou davantage. L'adsorbant y est fixé sous forme d'une fine couche collée à la paroi du tube, ou bien la phase stationnaire est fixée en film mince, sans support, sur cette même paroi. Dans tous les cas, ces colonnes comportent un canal central largement ouvert, offrant peu de pertes de charge à la progression du gaz porteur.

La colonne capillaire



Tube en silice fondue (25 m).
Phase stationnaire (0,12 μ m).

Intérieur de la colonne (passage du gaz vecteur).

Le pouvoir de séparation des colonnes capillaires est beaucoup plus grand que celui des colonnes remplies.

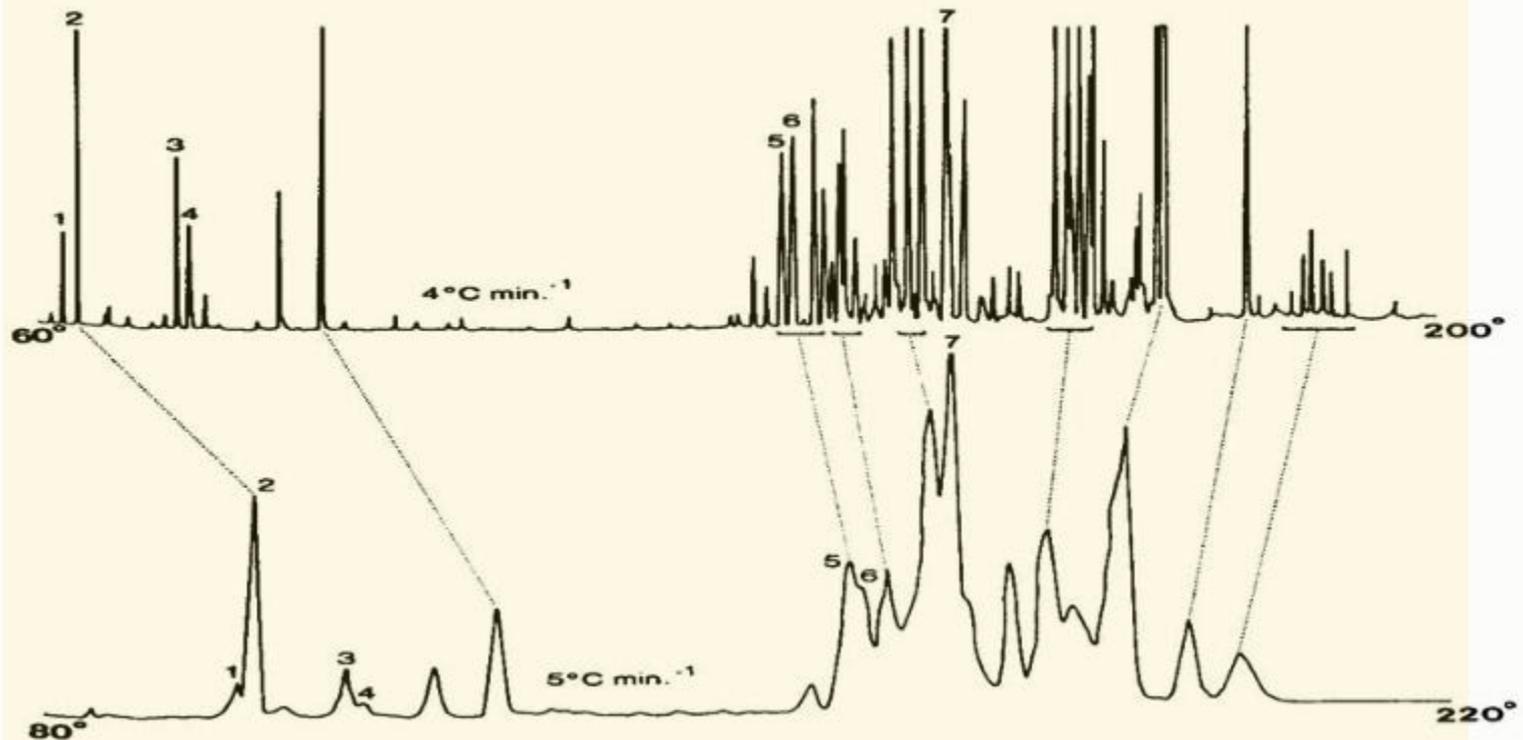
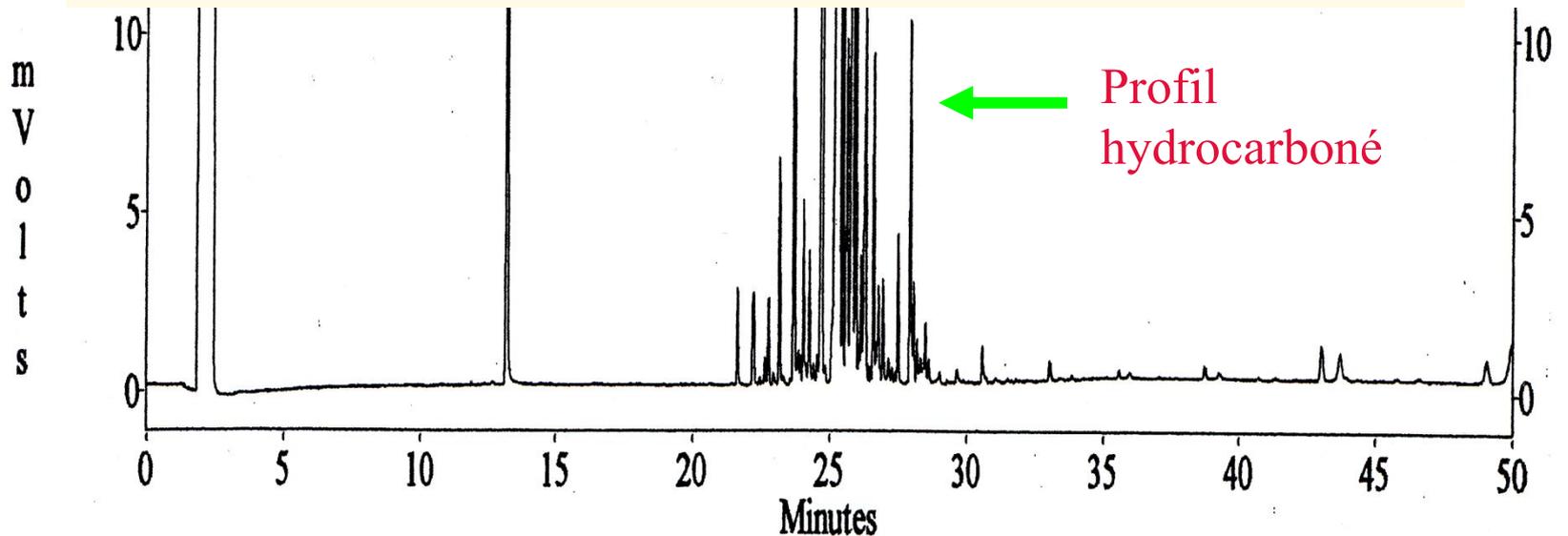


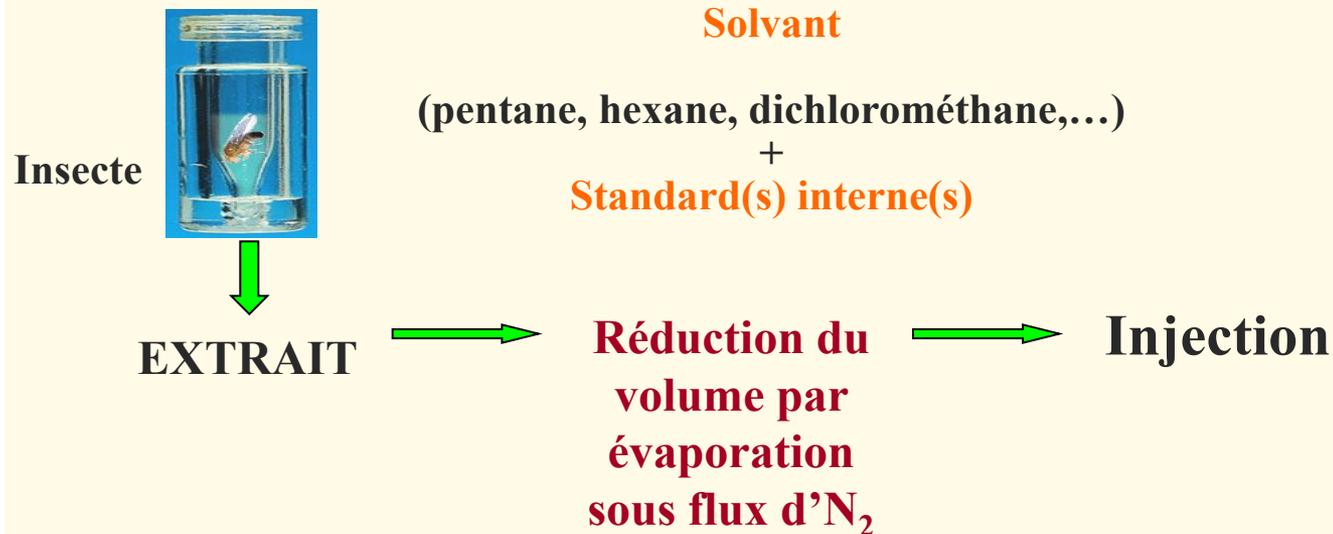
Fig. Chromatogrammes de l'huile « d'iris de marais » obtenus (en haut) sur une colonne capillaire de 50m et (en bas) sur une colonne remplie de 4m.

Le système d'enregistrement



Procédé opératoire

- Introduction du gaz dans le chromatographe selon une pression de 1 à 4 bars. Le gaz doit être pur, inerte et de faible viscosité
- Extraction par solvant:



- La chambre d'injection (T° supérieur de 20 à 30 °C de celle de la colonne) doit provoquer la volatilisation instantanée de l'échantillon introduit et assurer le mélange homogène de la vapeur et du gaz vecteur.
- Le four dans lequel se trouve la colonne est chauffé à la température adéquate et un système de ventilation y assure l'homogénéité de la chaleur (système de programmation en fonction du temps peu exister pour améliorer les séparations).

- Les différents constituants du mélange sont plus ou moins retenus par la phase stationnaire et voyagent à vitesses différentes le long de la colonne à la sortie de laquelle on les détecte séparément (le **temps de rétention** qui correspond au temps écoulé entre l'injection et le sommet du pic dépend de la longueur de la colonne, de la température, nature de la phase stationnaire et du débit du gaz vecteur).
- Le nombre de pics obtenus sur le chromatogramme correspond au nombre de composants présents dans l'échantillon.
- **Coefficient de partage**: rapport des concentrations respectives du soluté dans la phase stationnaire et la phase mobile, au cours de l'analyse. Ce coefficient de partage est un des paramètres qui conditionne la durée de parcours de la colonne par le constituant.

Méthode de l'étalon interne

Cette méthode consiste à ajouter à la solution à doser une substance (absente naturellement) à une concentration connue, toujours la même dans tous les échantillons à doser.

Elle présente l'avantage de s'affranchir des erreurs au niveau du volume injecté qui peut varier légèrement d'une injection à l'autre.

On calcule la concentration des molécules à partir de l'aire du pic correspondant et l'aire du pic de l'étalon interne en fonction de la concentration de l'étalon.

Chromatographie en phase gazeuse: Interprétation

Injector and detector temperatures were 260°C and 280°C

oven temperature was programmed from 140°C to 280°C at 3°C/min

column used was an apolar CP-Sil 5 fused silica capillary column

10 µg octadecane (C18)

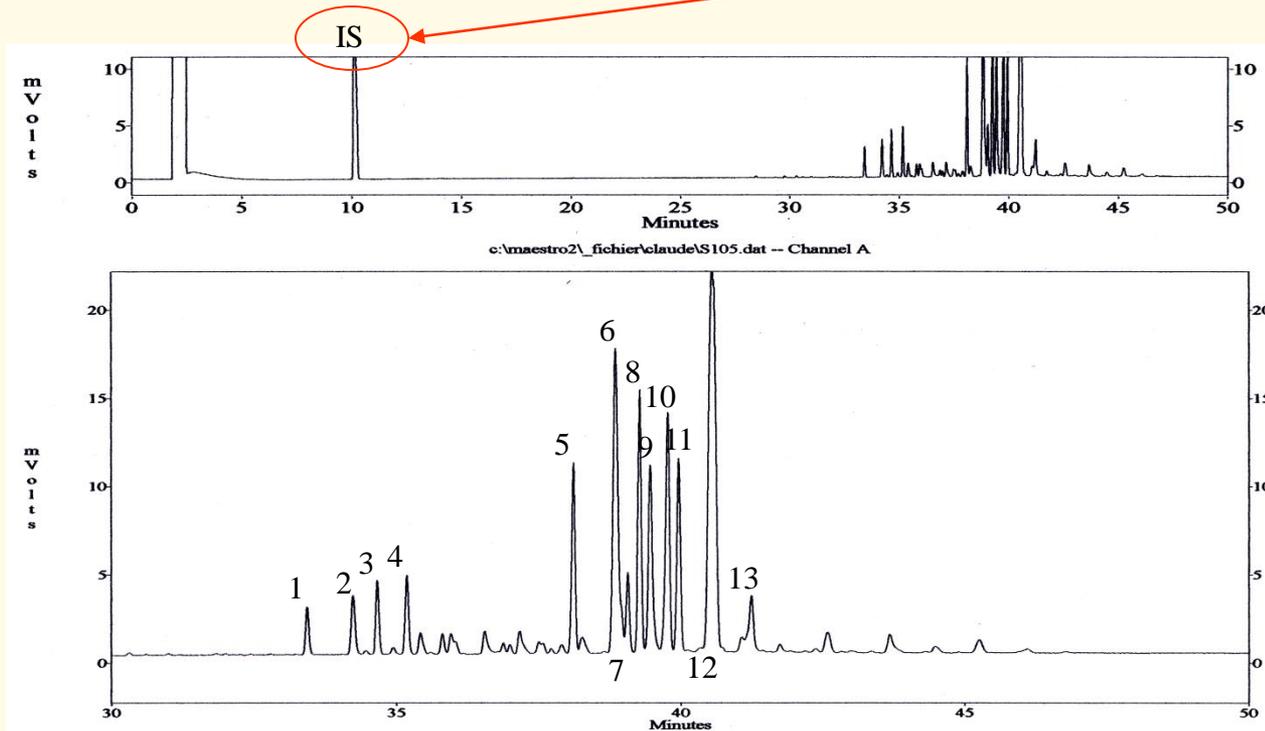
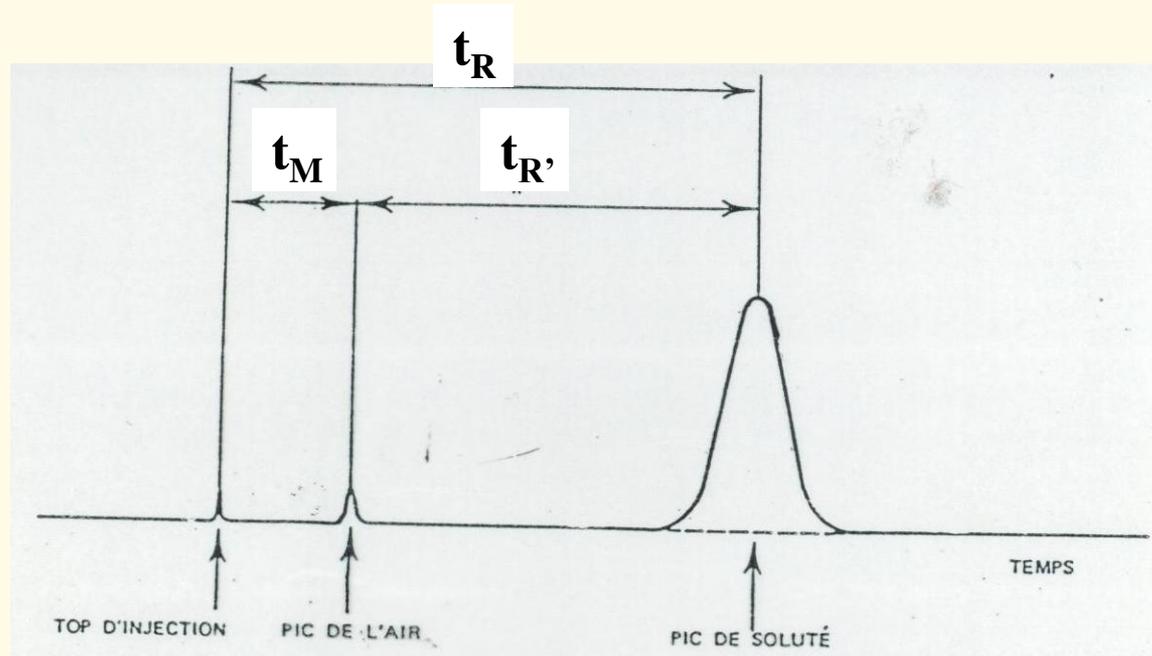


Figure . Typical gas-chromatography profile of an extract of cuticular hydrocarbons of *B. germanica* adult of both sexes. IS, internal standard.

(KILANI-MORAKCHI S., ARIBI N., FARINE J.P., SMAGGHE G., & SOLTANI N. 2009. Halofenozide affects sexual behaviour, cuticular hydrocarbons and reproduction in the female German cockroach *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). *Belgian Journal of Zoology*)

Le chromatogramme



t_M : **Temps mort** : C'est le temps que met un soluté non retenu (l'air par exemple dans le cas de la CPG) à sortir de la colonne.

t_R : **Temps de rétention**

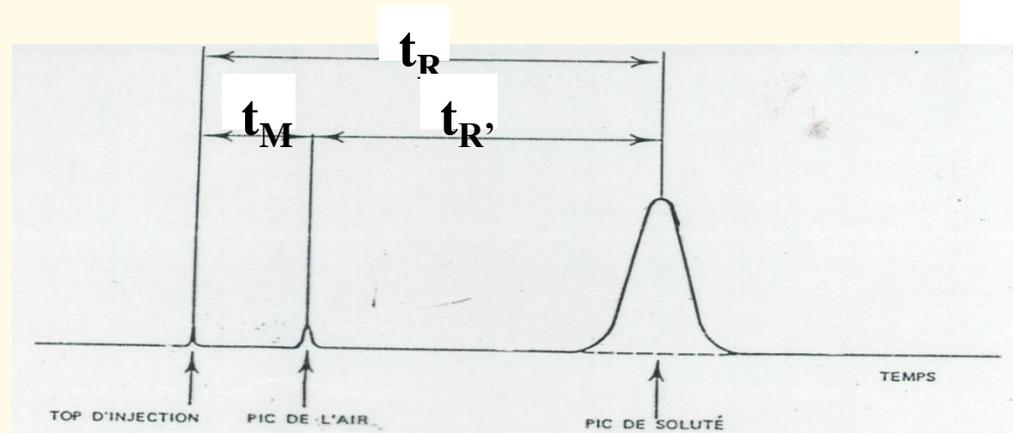
t_R' : **Temps de rétention réduit**

Le chromatogramme

t_M : Temps mort

t_R : Temps de rétention

t'_R : Temps de rétention réduit



t_M (Temps mort) : temps écoulé pour un composé non retenu par la colonne

t_R (Temps de rétention) : temps écoulé entre l'instant de l'injection et le max du pic du composé

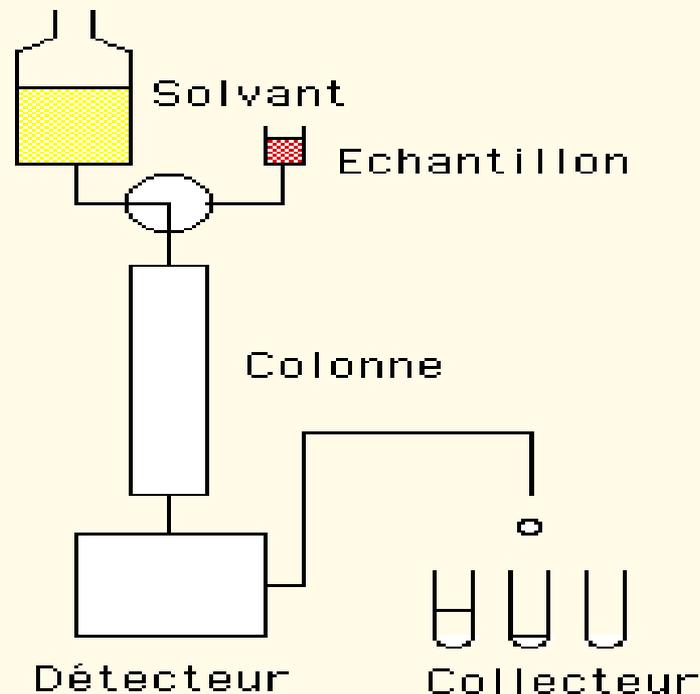
t'_R (Temps de rétention réduit) : temps de rétention affranchit des phénomènes hors phase stationnaire

$$t'_R = t_R - t_M$$

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE (LC - HPLC)

Appareillage simple, constitué d'une colonne de verre remplie de particules de phase stationnaire, le solvant migrant sous le simple effet de la pesanteur. Toutefois, dans de telles conditions, la **résolution obtenue est relativement médiocre.**

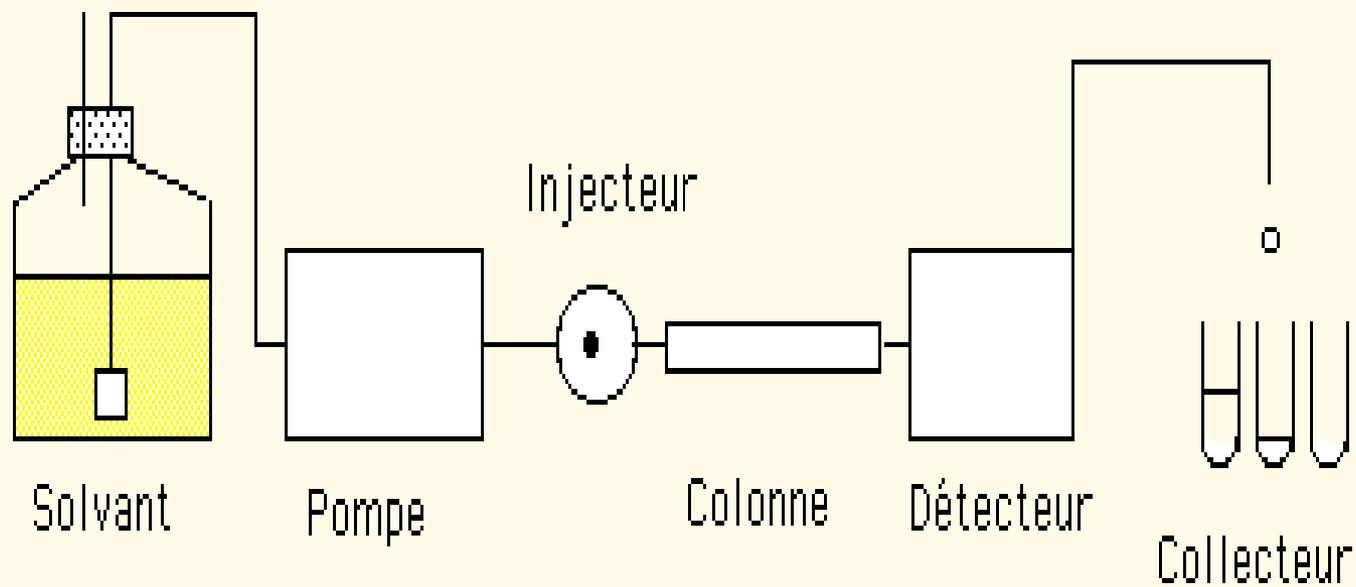


CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE (LC - HPLC)

- particules de très faible taille (3 - 10 μm) qui permettait de réaliser des colonnes très efficaces, mais augmentation considérable de la résistance au passage du solvant (= perte de charge),
- nécessité d'employer des pompes à haute pression pour pousser les solvants (et des tubes résistants pour y mettre les phases stationnaires)
- ainsi naquit la chromatographie liquide à haute performance/pression (C.L.H.P. - ou HPLC en anglais).
- Les méthodes de CLHP diversifiées et répandues dans tous les laboratoires où elles représentent l'outil de séparation chromatographique le plus courant (à l'échelle analytique ou préparative).



CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE (LC - HPLC)



Les pompes

La pompe force la phase mobile à traverser la colonne dont la phase fixe très compacte crée une perte de charge.

On doit donc maintenir une pression extrêmement élevée en amont de l'injecteur pour vaincre cette perte de charge et permettre la traversée de la colonne par l'éluant.

La pression à imposer dépend des facteurs suivants :

- débit de la phase mobile
- viscosité de l'éluant
- taille des grains de la phase stationnaire
- géométrie de la colonne

Les pompes doivent répondre aux exigences suivantes :

- fournir des pressions élevées jusqu'à 400 bars
- débit stable, non pulsé et réglable de 0,1 à 10 mL/min
- résistance à la corrosion quelque soit le solvant utilisé.

Injecteurs

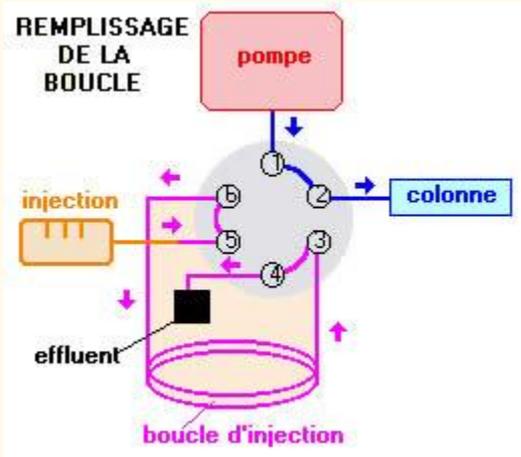
L'injection doit se faire de manière très rapide afin de perturber le moins longtemps possible le régime de circulation du solvant.

On doit injecter rapidement un volume précis sans stopper l'écoulement du solvant a un endroit ou règne une pression très élevée ($P > 100$ bars).

L'injecteur le plus répandu est **l'injecteur à boucle** :

On utilise une vanne haute pression à plusieurs voies qui permet d'isoler la boucle du circuit pour la remplir puis de la remettre dans le circuit pour l'injection, avec inversion du sens de circulation du solvant dans la boucle

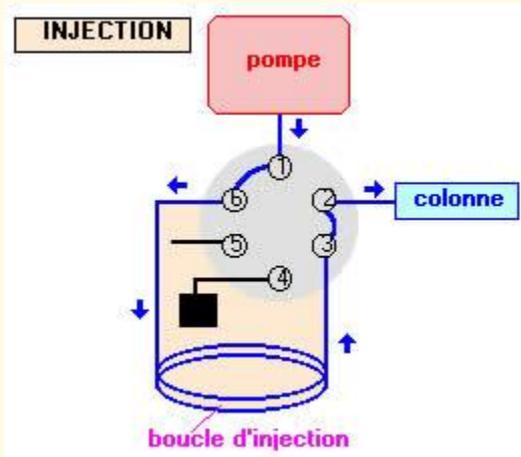
Ce système permet une bonne reproductibilité à condition de remplir entièrement la boucle. Le remplissage de la boucle se fait grâce à une seringue, le volume de la boucle est variable de 1 a 100 ml. la seringue utilisée est de capacité plus grande et le trop plein est évacué.



L'injecteur est constitué d'une vanne haute pression (manuelle ou non) à plusieurs voies dont le fonctionnement se déroule en deux étapes :

1. Remplissage de la boucle dans une vanne à six voies :

le solvant d'éluion circule librement de la pompe (en 1) à la colonne (en 2). L'injection est réalisée (en 6) dans la boucle. Le surplus de solvant est évacué dans l'effluent, communément appelé l'évier (en 4)



2. Injection de l'échantillon dans une vanne à six voies :

On bascule la vanne par action d'un levier et le solvant va alors va balayer la boucle et entraîner l'échantillon dans la colonne.

Thierry Brière



La colonne

C'est la partie active du système, c'est elle qui joue le rôle prépondérant. La colonne est un cylindre calibré généralement en acier inoxydable parfois doublé d'un matériau inerte (verre ou plastique spéciaux). Son diamètre varie de 0,5 à 5 mm et sa longueur de 0,5 à 30 cm.

Les colonnes standard ont une longueur comprise entre 10 et 30 cm avec un diamètre intérieur de 4 à 10 mm. Elles sont remplies de phase stationnaire de granulométrie de 5 à 10 mm

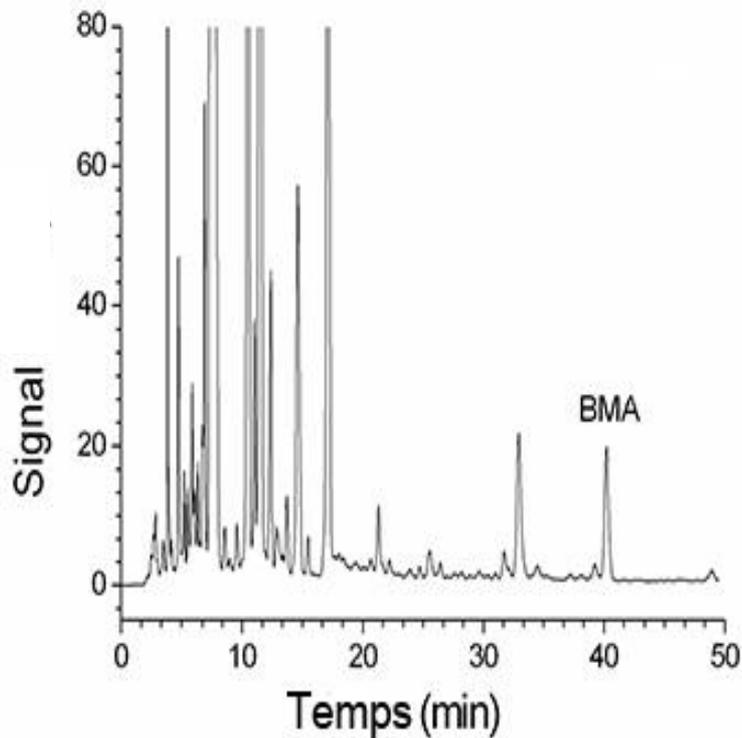
Il existe aussi des micro colonnes de longueur 3 à 7 cm et de diamètre interne de 1 à 5 mm, remplies de phase stationnaire de granulométrie de 3 à 5 mm. Le double intérêt de la rapidité et de l'économie de solvant.

Le détecteur

Le plus courant et le détecteur par **spectroscopie UV-visible**. Il mesure en continu l'absorbance du liquide à une longueur d'onde choisie en fonction de la molécule recherchée ce qui permet de suivre la sortie des différentes molécules de la colonne.

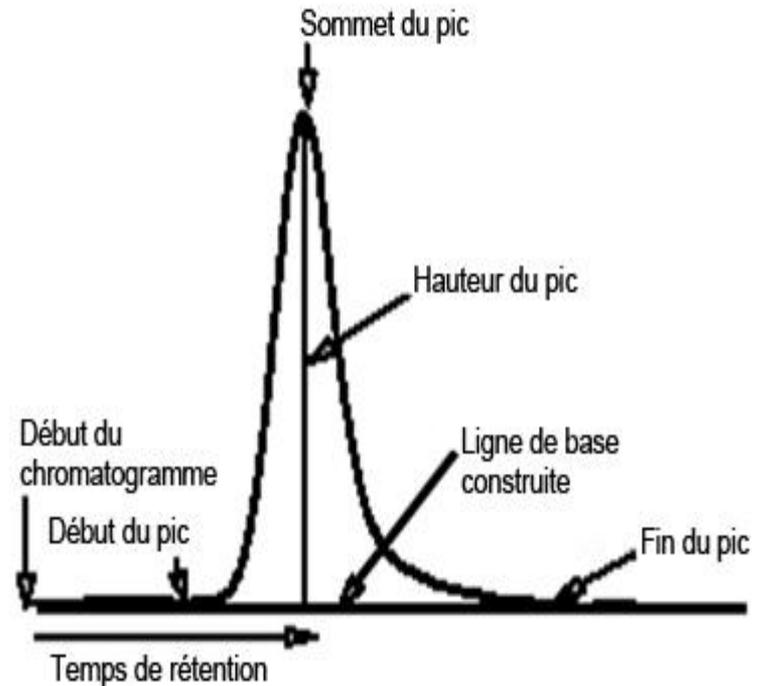
On obtient un tracé correspondant à la variation de l'absorbance de l'éluant en sortie de colonne en fonction du temps.

Chaque pic correspond dans l'idéal à la sortie d'une unique espèce moléculaire qui modifie l'absorbance de l'éluant. Le temps qui s'écoule entre l'injection du mélange dans la colonne et le sommet d'un pic correspond au temps de rétention de la molécule. Ce temps est caractéristique d'une molécule pour un ensemble donné de paramètres (nature et taille de la colonne, nature et débit de l'éluant, pression, température, etc.).



Exemple d'enregistrement en sortie de colonne HPLC

Détection du pic



Exemple d'un pic d'enregistrement en HPLC

Les différentes molécules présentes dans un mélange initial ayant chacune un temps de rétention différent, on obtient une série de pics étalée dans le temps.

Bien entendu, il arrive souvent que les temps de rétention de deux ou plusieurs molécules différentes soient trop proches pour que leurs pics respectifs soient totalement séparés. On a alors un mélange de deux ou plusieurs molécules plus ou moins enrichi pour chacune d'entre elles.

Méthode de l'étalon externe

On doit disposer du produit a doser à l'état pur pour pouvoir déterminer son coefficient de réponse kC .

Pour cela on prépare une gamme de solutions étalons que l'on injecte tour à tour.

Si la gamme des concentrations a été bien choisie, on obtient une droite d'étalonnage passant par l'origine. Si ce n'est pas le cas on modifie la gamme des concentrations utilisée pour se placer au cœur de la zone de réponse linéaire du détecteur. On peut alors par régression linéaire déterminer l'équation de la droite d'étalonnage.

Si les conditions chromatographiques ont été bien choisies on obtient bien une droite passant par l'origine.

Il peut arriver si les pics ne sont pas parfaitement résolus que la droite d'étalonnage ne passe pas parfaitement par l'origine. On pourra alors déterminer le terme b et en tenir compte par la suite.

Il peut arriver aussi que par erreur un des points ne soit pas aligné, on pourra éventuellement supprimer ce point et ne pas en tenir compte.

Il suffit ensuite d'injecter la solution inconnue, à partir de l'aire du pic AX on pourra calculer la concentration correspondante.

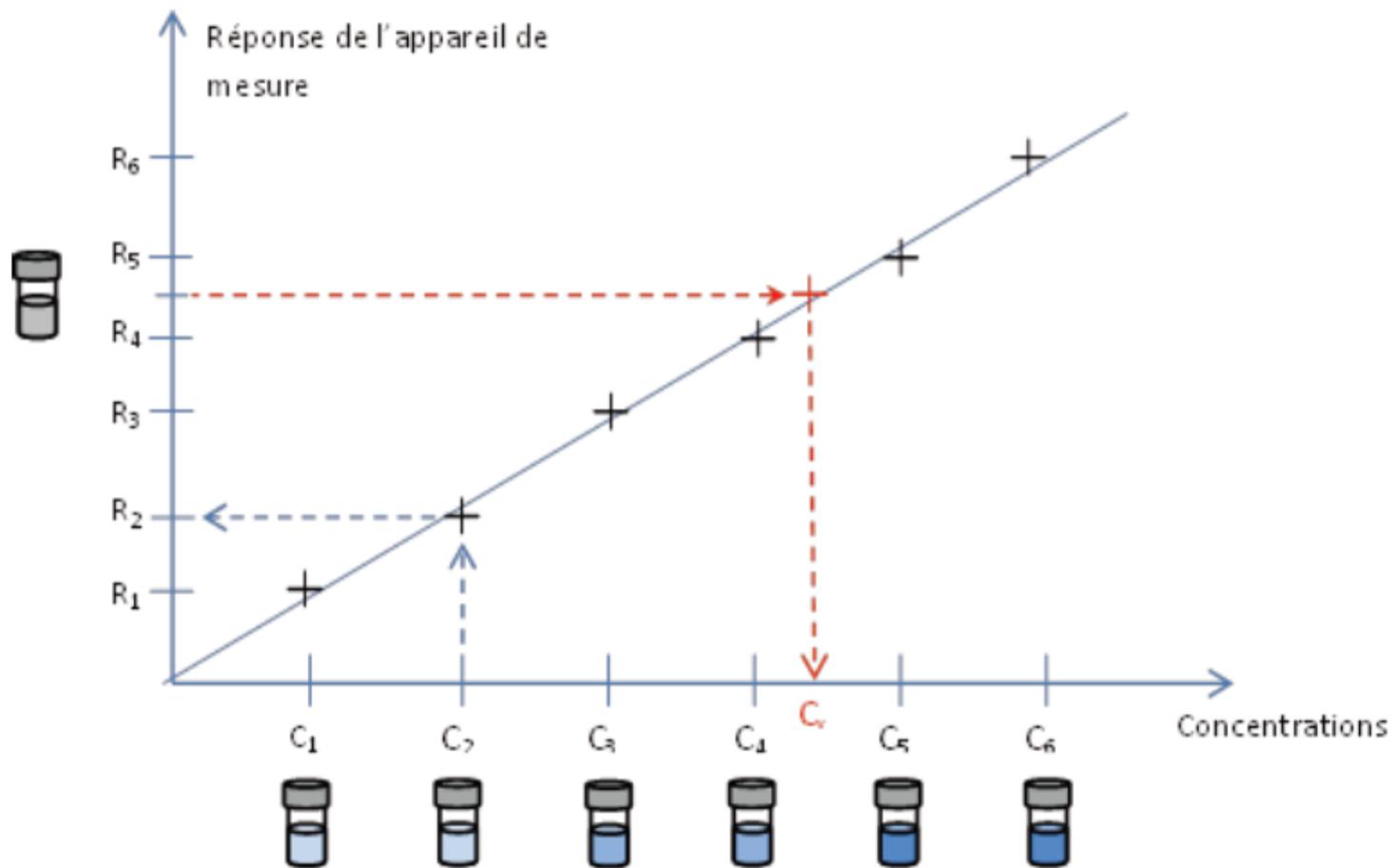


Figure 2 : principe général de l'étalonnage, création de la courbe d'étalonnage à partir de la gamme étalon et détermination de la concentration d'un échantillon à l'aide de cette courbe.

Active Windows
Accédez aux paramètres pou

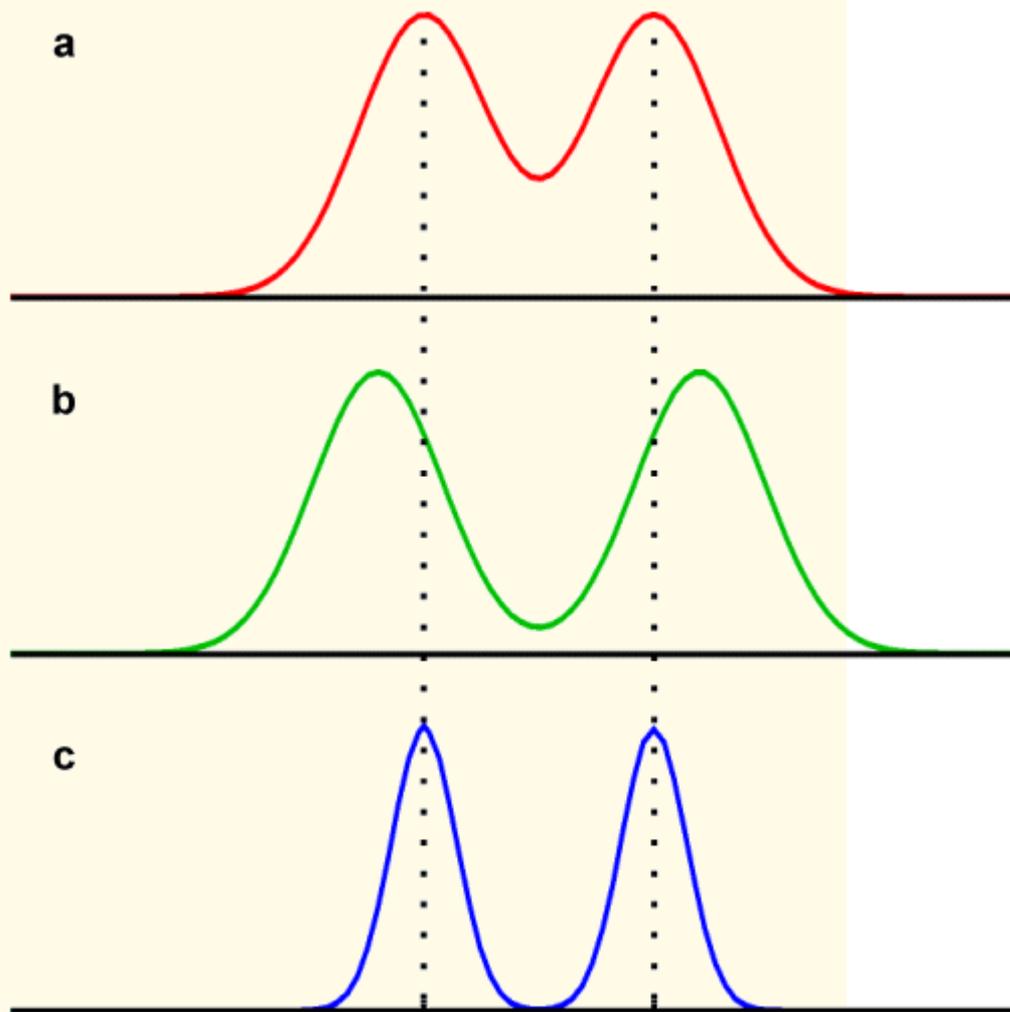
La résolution R

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics:

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

Figure a) les pics se recouvrent;
b) la distance séparant les sommets des pics est plus grande mais les largeurs à la base sont les mêmes qu'en a);
c) la distance séparant les sommets des pics est égale à celle trouvée en a) mais les largeurs à la base sont plus petites qu'en b).



la séparation idéale est réalisée en c

- **Les domaines d'application de l'HPLC sont très variés:**
 - **séparation des ions minéraux,**
 - **des petites molécules organiques**
 - **des macromolécules (protéines, polynucléotides, polymères organiques).**

- **Il existe pour chaque catégorie de substances un ou plusieurs modes chromatographiques appropriés. A chacun de déterminer lequel convient le mieux pour le travail qu'il désire effectuer !**