

CHROMATOGRAPHIE

1. HISTORIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE

En 1906 un botaniste russe, Tswett, a séparé des pigments végétaux colorés sur une colonne remplie de carbonate de calcium pulvérulent, les pigments étaient entraînés avec de l'éther de pétrole (mélange pentanes et d'hexanes). Il a observé sur la colonne la formation de bandes de couleur différente (vert, orange, jaune..). Il a donné à cette technique le nom de chromatographie (écriture des couleurs). Il a défini également les termes : chromatogramme, élution, rétention.

Cette technique fut quasi-abandonnée jusqu'en 1930, où Edgar Lederer a purifié par la méthode de Tswett la lutéine du jaune d'œuf.

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

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

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

En 1979, première séparation chirale par HPLC.

2. TERMINOLOGIE GENERALE DE LA CHROMATOGRAPHIE.

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

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

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

4. Support: Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire.

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

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

7. 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 chromatographie de partage (CP) et de la chromatographie sur couche mince (CCM).

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

9. Chromatographie d'éluion: celle dans laquelle la phase mobile parcourt en permanence la phase stationnaire afin que les solutés introduits à une extrémité de celle-ci sortent à l'extrémité opposée. Dans cette méthode, la phase mobile est inerte vis-à-vis de la phase stationnaire.

10. Chromatographie de déplacement: procédé dans lequel la phase mobile a plus d'affinité que le soluté pour la phase stationnaire, donc le pousse devant elle.

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

12. Coefficient de partage: rapport des concentrations respectives du soluté dans la phase stationnaire et la phase mobile, au cours de l'analyse.

13. Chromatogramme: trace sur un papier enregistreur des réponses successives du détecteur, au cours de l'éluion des solutés hors des colonnes.

14. Fluide : Se dit d'un corps dont les molécules ont peu d'adhésion et peuvent glisser librement les unes sur les autres (liquides) ou se déplacer indépendamment les unes des autres (gaz), de façon que le corps prenne la forme du vase qui le contient.

Un fluide doit donc être déformable ; c'est-à-dire qu'il n'a pas de forme propre.

L'état fluide englobe donc principalement deux états physiques :

L'état gazeux

L'état liquide.

3. DEFINITION DE LA CHROMATOGRAPHIE

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile).

L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase Stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide de différentes interactions. L'échantillon est adsorbé puis désorbé sur la phase stationnaire, ou est plus ou moins soluble dans la phase mobile.

C'est également une méthode analytique qui a pour objectif d'identifier et quantifier les composés d'un mélange homogène.

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

4. CLASSIFICATION

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 procédé opératoire.
- Classification selon le phénomène chromatographique (mis en œuvre).

4.1. Classification selon la nature physique des phases

Dans ce classement:

- la phase mobile est un fluide qui peut être soit liquide soit gazeux;
- la phase stationnaire peut-être soit un solide finement, soit un liquide immobilisé sur une phase fixe. La combinaison de ces

Différentes possibilités permet donc de distinguer quatre types de chromatographie:

- La chromatographie liquide-liquide (CLL).

La chromatographie liquide-solide (CLS).

- La chromatographie gaz-liquide (CGL).
- La chromatographie gaz-solide (CGS).
- La chromatographie supercritique (CSF).

La CSF représente un cas intermédiaire entre CL et CG, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

4.2. Classification selon le procédé opératoire

Selon l'immobilisation de la phase stationnaire on distingue:

- **La chromatographie sur colonne:**

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

- **La chromatographie sur papier:**

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

- **La chromatographie sur couche mince (CCM):**

La phase stationnaire est dans ce cas retenue sur une surface plane (verre, matière plastique ou feuille d'aluminium)

qui est recouverte d'une mince couche de 0,2 à 0,3 mm d'épaisseur de gel de silice, de cellulose, d'alumine ou même de grains de résines échangeuses d'ions.

4.3. Classification selon le phénomène chromatographique (mis en œuvre) :

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son **interaction** avec les molécules à séparer. On distingue ainsi:

- **La chromatographie d'adsorption:** le paramètre physico-chimique concernées et le coefficient d'adsorption. Par extension, On peut rajouter **la chromatographie d'affinité**, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille) de composé(s).
- **La chromatographie de partage:** La séparation repose sur le coefficient de partage du soluté entre les deux phases.
- **La chromatographie par échange d'ions:**

La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique.

- **La chromatographie d'exclusion (chromatographie de perméation ou de filtration sur gel):**

Le coefficient de distribution prend le nom de coefficient de diffusion.

4.3.1. Chromatographie d'adsorption

Principe :

Cette chromatographie liquide-solide est basée sur la (répartition des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et 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.

A-L'adsorption : L'adsorption est la fixation des molécules dissoutes par la phase solide. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée : liaison dipôle-ion, ou dipôle-dipôle ou liaison de Van der Waals.

B-Les adsorbants : Ce sont des solides très finement divisés (l'adsorption est un phénomène de surface c'est-à-dire que l'adsorbant doit présenter la plus grande surface utile possible); les adsorbants sont sous forme de granules calibrés. La séparation est meilleure, mais plus lente si les grains sont fins.

La qualité d'un adsorbant dépend de sa surface, pureté, de son homogénéité et de sa teneur en eau.

Plus un adsorbant est actif plus il retient fortement les composés polaires. La séparation se fait par ordre croissant de leurs forces d'interaction avec les composés polaires.

Les adsorbants possibles (du moins polaires au plus polaires) : papier, cellulose, amidon , carbonate de sodium, gel de silice, alumine et charbon activé.

Les adsorbants à faible capacité d'adsorption comme, le talc ou le carbonate de sodium.

Les adsorbants forts comme le gel de silice.

Certains adsorbants présentent une forte polarité électrique comme le gel de silice ou l'alumine ; d'autres ont une faible polarité comme le charbon actif.

C-Solvants :

Le solvant ne doit pas réagir chimiquement avec l'adsorbant ni le soluté .Il est rare qu'un même solvant puisse permettre l'adsorption et l'élution.

Des solvants différents sont choisis en fonction des solutés à séparer . Quand l'adsorbant est polaire, le solvant doit être le moins polaire possible.

L'élution est commencée avec des solvants peu polaires puis continue avec des solvants de polarité croissante.

Pour un système chromatographique donné, le pouvoir éluant dépend de polarité du solvant. Plus un éluant est polaire, plus il entrainera facilement une substance polaire, tandis-que, un solvant non polaire possèdera un mauvais pouvoir d'élution pour les molécules polaires, mais entrainera facilement une molécule apolaire. L'éluant peut être un solvant pur soit un mélange de solvants de polarité voisine de celle des solutés (2 à 4 solvants peuvent être utilisés).

La chromatographie d'adsorption est appliquée selon différentes techniques :

***sur couche mince** : le gel adsorbant (cellulose, silice) est coulé sur une plaque (verre, Aluminium, plastique), mélangé à un liant (plâtre)

***sur papier** : en chromatographie ascendante ou radiale ; dans cette technique le papier constitue la phase fixe ;

***sur colonne** : ouverte à pression ambiante, en flash chromatographie, à moyenne pression, en HPLC.

4.3.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette technique est basée essentiellement sur les phénomènes d'adsorption : la PM est constitué soit d'un seul solvant ou d'un mélange de solvant qui progresse tout le long de la phase stationnaire fixée sur plaque en verre ou en plastique ou en aluminium.

Une fois l'échantillon a été déposé sur la PS leurs solutés migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Il s'agit là d'une technique d'analyse, très utile et simple à mettre en œuvre et moins coûteuse.

On l'utilise en général pour suivre l'avancement d'une réaction, pour connaître la composition d'une fraction séparée sur colonne ou visualiser la pureté d'un produit.

4.3.1.1.1 Principe

La chromatographie sur couche mince repose sur les phénomènes d'adsorption et d'interactions.

On place un composé sur un support solide (appelé phase stationnaire) et l'on applique alors un solvant (phase mobile) qui, par capillarité, va 'monter' et se déplacer sur la phase stationnaire.

La phase mobile, en montant dans la phase stationnaire, va entraîner le composé que l'on avait déposé, et ce à une hauteur variant en fonction du composé et du solvant.

En effet, le composé va développer des interactions non seulement avec le solvant (phase mobile) mais également avec le support (phase stationnaire).

Ainsi le composé montera haut (on parle de migration) s'il a peu d'interactions avec le support ou bien s'il a une forte affinité pour le solvant.

La question est alors sur toutes les lèvres... Qu'elles sont ces interactions ?

Il s'agit ici d'interactions électrostatiques. Les composés sont soit polaires soit apolaires.

La phase stationnaire est ici polaire (silice, alumine).

Puisque ce sont les interactions qui sont responsables de la hauteur de migration, un composé polaire sur un support polaire se sentira comme chez lui et migrera

moins haut qu'un composé apolaire, qui lui ne sera pas du tout à son aise sur ce support .

Le solvant entre lui aussi en compte puisqu'il va faire migrer le composé ; on classe donc les solvants en fonction de leur pouvoir éluant.

Prenons comme exemple une phase stationnaire polaire, un composé polaire et un solvant polaire. Le solvant polaire possède un pouvoir éluant élevé, fortement adsorbé, il déplace le composé. En revanche, un solvant apolaire possèdera un mauvais pouvoir éluant, mais entraînera un soluté apolaire.

Il existe ainsi des tables classant les différents solvants en fonction de leur fore éluotropique (pouvoir éluant)

4.3.1.1.2. Matériel

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

– *une cuve chromatographique* : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

– *la phase stationnaire* : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant, 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 tous 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.

Le choix de la plaque peut avoir son importance... Ainsi on n'utilisera pas une plaque de verre avec comme 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.

– *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.

– *l'éluant (phase mobile)* : un solvant pur ou un mélange.

Le choix du solvant peut-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.

On peut s'aider du tableau suivant :

Solvant	ϵ^0	p'
Acide acétique glacial	> 0.73	6.2
Eau	> 0.73	10.2
Méthanol	0.73	6.6
Méthanol (40 %) + acétonitrile (60 %)	0.67	/
Méthanol (20 %) + éther diéthylique (80 %)	0.65	/
Propanol 2	0.63	4.3
Pyridine	0.55	5.3
Butanol 2	0.54	3
Acétonitrile	0.5	6.2
Acétate d'éthyle	0.45	4.3
Acétone	0.43	5.4
Méthyléthylcétone	0.39	4.5
Tétrahydrofurane (THF)	0.35	4.2
Chloroforme	0.31	4.4
Terbutylméthyléther	0.29	/
Ether diéthylique anhydre	0.29	2.9
Benzène	0.27	3.9
Toluène	0.22	2.4
Tétrachlorure de carbone	0.14	1.6
Cyclohexane	0.03	0
Pentane	0	0
n-Hexane	0	0.06
n-Heptane	0	0.02

ϵ^0 = force éluotrope
 p' = indice de polarité

4.3.1.1.3. Mode opératoire de la chromatographie

A)-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 analyser 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 la quantité déposée est insuffisante, il est préférable après le séchage de la plaque, d'effectuer de dépôts répétés jusqu'à ce qu'on estime la quantité de l'échantillon est 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 (standard) à côté du mélange. Ces témoins permettront de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à analyser.

B)- 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

C) - 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 :

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

- *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.

- *l'iode* : on plonge la plaque dans un bocal contenant un fond d'iode broyé. Les composés apparaissent sous forme de taches brunâtres.

- *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.

- *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 %.

- *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

- *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.

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

E)- Le rapport frontal R_f .

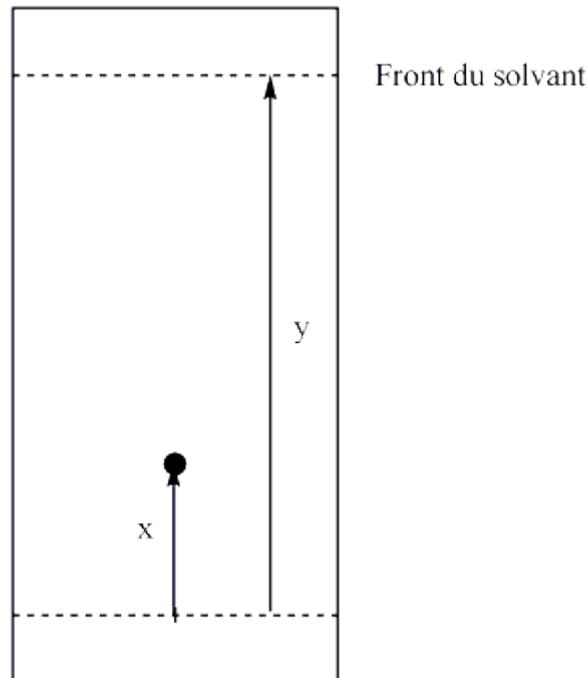
Il s'agit ici de réaliser un rapide calcul pour caractériser les composés.

- La séparation des composants, entraînés par la phase mobile résulte de leur différence de solubilité entre les deux phases.

- Chaque constituant du mélange se déplace avec sa propre vitesse derrière le front du solvant.

- Une fois la migration terminée, on détermine pour chaque constituant, la vitesse de déplacement ou le rapport frontal R_f .

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté (milieu de la tache)}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$



$$R_f = x/y$$

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.

4.3.1.1.4 Application de la CCM à la purification

La CCM permet 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.

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.

4.3.1.2. Chromatographie sur colonne:

Alors que les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, la chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative; elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes. elle permet de purifier 50 mg à environ 20 g en laboratoire, et jusqu'à 1 kg en industrie.

Elle présente cependant plusieurs inconvénients:

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

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

4.3.1.2.1 Description et principe:

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

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille.

4.3.1.2.2 Facteurs dont dépend la séparation:

Quatre facteurs interviennent:

- l'adsorbant
- l'éluant
- la dimension de la colonne
- la vitesse d'élution

A) Adsorbant:

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

Le gel de silice est également fréquemment utilisé pour la séparation de composés qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être traités par l'alumine.

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

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

B) Eluant:

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

C)-Dimension de la colonne:

Les colonnes spécialement conçues pour cet usage ont à leur base une plaque de verre fritté ou de porcelaine qui permet l'écoulement libre de l'éluant tout en empêchant le passage de l'adsorbant. On peut aussi utiliser une burette, au fond de laquelle on place un tampon de laine de verre et du sable.

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

D)-Vitesse d'élution:

Elle doit être la plus constante possible. Il faut qu'elle soit suffisamment lente pour que le soluté soit au plus près de l'équilibre entre les phases liquide et

adsorbée. Elle ne doit pas être trop lente car sinon les substances diffusent dans le solvant et on obtient des bandes de plus en plus larges et une séparation médiocre.

4.3.1.2.3. Remplissage de la colonne:

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

A)-Remplissage par voie humide:

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

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

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

B)-Remplissage par voie sèche:

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

4.3.1.2.4 Dépôt des produits à analyser:

Ils doivent former une zone cylindrique étroite dans le haut de la colonne.

Un liquide est déposé tel quel. Un solide sera dissous dans le minimum du moins polaire des deux solvants.

On ajuste d'abord le niveau de solvant pour qu'il soit juste au-dessus de celui de l'adsorbant. A l'aide d'une pipette, on coule l'échantillon au sommet de la colonne de façon uniforme sur toute la surface de la colonne sans la déformer. Si nécessaire, on ajuste à nouveau, comme précédemment, le niveau de liquide de la colonne :

l'échantillon est ainsi adsorbé uniformément au sommet de la colonne. On peut placer un verre fritté ou une rondelle de papier filtre au-dessus de l'adsorbant pour prévenir une remise en suspension de l'adsorbant.

4.3.1.2.5 Elution:

On peut alimenter la colonne en continu à l'aide d'une ampoule de coulée ou bien ajouter manuellement l'éluant. Dans tous les cas, la surface de l'adsorbant ne doit jamais être au contact de l'air.

En quelques minutes, une colonne laissée à sec se détériore: des fissures apparaissent dans la phase fixe et toute élution ultérieure se transforme en ruissellement.

Pour la plupart des opérations, une vitesse de 5 à 50 gouttes à la minute convient (la limite inférieure correspond aux séparations difficiles).

Lorsque l'analyse des fractions est terminée, on réunit celles qui correspondent à des produits identiques, en prenant soin d'éliminer celles qui correspondent à des recouvrements de zones. Les substances obtenues de cette façon sont généralement d'une très grande pureté.

4.3.1.3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ :

4.3.1.3.1-Principe :

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser.

Trois types d'affinités sont utilisés :

- affinité enzyme-substrat
- affinité ligand-récepteur
- affinité antigène-anticorps

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

4.3.1.3.2-Etapes de la chromatographie d'affinité :

Les étapes de cette chromatographie consistent en trois étapes qui sont illustrées dans le schéma ci- dessous :

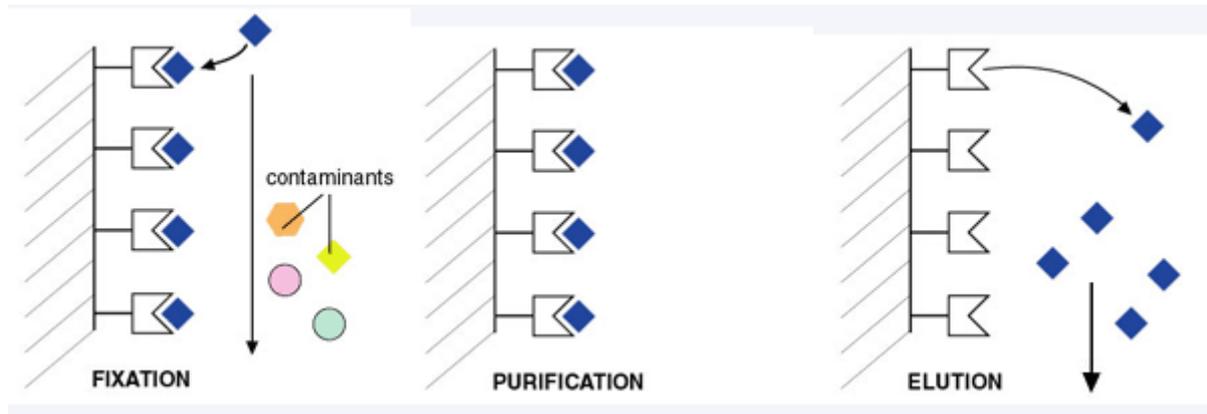


Figure 1 : Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

A) - Etape de FIXATION : Le mélange de molécules contenant le composé à purifié est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.

B) - Etape de PURIFICATION : En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.

C) - Etape d'ELUTION : La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluât.

Souvent, l'un des deux partenaires de l'interaction au moins est une protéine (P), l'autre sera qualifié de ligand (L) de cette protéine :

4.3.1.3.3. La phase stationnaire (le gel d'affinité) : elle est constituée d'un effecteur fixé par covalence à un support (carboxyméthylcellulose, Séphadex, gel de polyacrylamide) par l'intermédiaire d'un bras de fixation ("spacer" en anglais).

Exemples de dérivés de la carboxyméthylcellulose ou CM-cellulose : La CM-aminohexylique : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle.

- O - CH₂ - CO - NH - (CH₂)₆ - NH₂ (spacer long)

La CM-hydrazide : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle.

- O - CH₂ - CO - NH - NH₂ (spacer court)

La CM- aminohexylique (ou aminododécylique) succinylée : permet la fixation d'un effecteur à fonction -NH₂ réactive.

- O - CH₂ - CO - NH - (CH₂)_n - NH - CO - CH₂ - CH₂ - COOH (n = 6 ou 12, spacer long)

La longueur du bras est choisie de manière à limiter les contraintes stériques.

4.3.1.3.5. Effecteurs :

Affinité enzyme-substrat : substrats, analogues, inhibiteurs réversibles, effecteurs allostériques, coenzymes.

Affinité ligand-récepteur : haptènes, antigènes, anticorps.

Affinité antigène-anticorps : hormones, peptides, analogues peptidiques.

Elution : elle peut être réalisée de différentes façons :

Tampon de pH différent de celui ayant permis la charge : changement de l'état d'ionisation de la protéine : désorption

Tampon de force ionique différente de celle ayant permis la charge : changement de conformation de la protéine.

Compétition avec un ligand libre.

4.3.2 Chromatographie de partage

La chromatographie de partage convient très bien à la séparation de molécules très polaires de masses moléculaires inférieures à 3000 et aux homologues d'une même série, mal séparés par chromatographie d'adsorption.

Les facteurs la régissant sont ceux intéressant aussi bien la chromatographie par adsorption que la séparation par extraction liquide-liquide, soit :

- la nature du support,
- la nature de la phase liquide stationnaire,
- la nature de l'éluant (phase mobile),
- la vitesse de passage du solvant
- la température

• la chromatographie de partage est la technique de chromatographie liquide, la plus utilisée

la technique fonctionne par partage de solutés entre deux phases non miscibles

- la silice perd ses propriétés adsorbantes par saturation des sites d'adsorption (support inerte)
- ce mécanisme est surtout utile pour la séparation de molécules très polaires de masses molaires inférieures à 3000 (composés non-ioniques)
- la phase stationnaire liquide est immobilisée par adsorption (possibilité de dissolution / perte dans la phase mobile) ou formation de liaisons covalentes.
- les solides (supports) ont de très grandes surfaces (e.g. terre de diatomées, gel de silice, billes de silice poreuses, cellulose)
- les éluants doivent être immiscibles à la phase stationnaire et compatibles avec les détecteurs

Il y a 2 types de chromatographie de partage:

- Chromatographie de partage sur phase inversée.
- Chromatographie de partage sur phase normale (classique)

	Phase inversée	Phase normale (classique)
Phase stationnaire	non-polaire <i>e.g.</i> - silice greffée par une chaîne alkyle ou phényle	polaire <i>e.g.</i> - C_2H_4CN - $C_3H_6NH_2$ - $C_3H_6N(CH_3)_2$ - diol
Phase mobile	polaire <i>e.g.</i> - eau - méthanol - acétonitrile - tétrahydrofurane	non-polaire <i>e.g.</i> - n-hexane - chloroforme - éther

4.3.2.1 Composants de la chromatographie de partage :

4.3.2.1.1 Supports

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

Ce sont des solides très finement divisés qui présentent une très grande surface afin de retenir, sous un petit volume, une grande quantité de phase stationnaire. Il est nécessaire que leur rétention soit énergique et qu'ils ne réagissent pas avec le soluté. Leurs propriétés d'adsorption doivent être totalement masquées. Les phases stationnaires décrites en chromatographie d'adsorption peuvent être utilisées comme support sous forme poreuse ou pelliculaire (couche superficielle poreuse).

4.3.2.1.2. La phase stationnaire :

En chromatographie liquide classique, les phases stationnaires sont des solvants polaires dans lesquels vont pouvoir se solubiliser les composés polaires à séparer. Le choix de cette phase reste toutefois très empirique, le nombre de possibilités étant relativement grand (systèmes simples ou systèmes à solvants multiples : ternaires, quaternaires). Il peut s'agir d'eau, de méthanol ou d'éthanol, éthers renfermant des groupements hydroxyles ou nitriles (très polaires) : glycols, polyéthylène glycols, β , β oxidipropionitrile (CN – CH₂– CH₂– O – CH₂CH₂– CN), etc.

A) La phase stationnaire greffée

La chromatographie liquide-liquide a ses limites. Puisque la phase mobile solubilise faiblement la phase stationnaire, il faut la pré-saturer. De plus, les forces de friction dues aux colonnes étroites provoquent une perte de phase stationnaire par entraînement mécanique (important en HPLC). Pour surmonter ces inconvénients, la phase stationnaire est chimiquement liée (greffées). C'est ainsi, par exemple, que le groupement silanol des supports est « silanisé » puis on y fixe des groupements (R) de polarité variable. Les remplissages ayant ainsi des « silicones » (-SiO-R) chimiquement greffés sur leur surface, donnent à la colonne une efficacité et une stabilité excellentes.

4.3.2.1.3. La phase mobile

L'éluant doit être immiscible à la phase stationnaire. Actuellement cette immiscibilité ne peut encore être découverte qu'empiriquement. De plus, en raison de l'inévitable miscibilité partielle, le solvant doit être pré-saturé avec la phase stationnaire avant de pénétrer dans la colonne. En d'autres termes, le solvant et la phase stationnaire doivent être en équilibre thermodynamique avant leur rencontre dans la colonne. On doit aussi tenir compte de la compatibilité des solvants avec les détecteurs utilisés. La polarité de la phase mobile a une grande influence sur le coefficient de partage des solutés. On obtient alors des temps de rétention convenables en ajoutant à un solvant donné, de petites quantités d'un modificateur polaire.

On entend par l'inversion de phase, la modification de la nature du support de la phase stationnaire liquide afin de pouvoir y « fixer » un solvant apolaire. Pour cela, on utilise la terre de diatomées (celite), support polaire, que l'on « silanise », c'est-à-dire que l'on traite par des dérivés organosiliciés tels que le diméthylchlorosilane. Ce traitement permet donc d'adsorber une solution stationnaire moins polaire que le solvant constituant la phase mobile. En effet, ce procédé permet d'utiliser comme éluant l'eau, les alcools, les acides ou d'autres solvants mobiles très polaires qui, normalement, déplaceraient le solvant moins polaire adsorbé sur le support.

Rappel:

Polarité des solvants:

hydrocarbures < éthers < esters < cétones < aldéhydes < amides < amines < alcools < H₂O. inverse et normale(classique).

Il existe deux types de chromatographie de partage inversée et normale(classique).

A)-Chromatographie de partage sur phase inversée

- environ 80% des séparations chromatographiques en phases liquides sont effectuées par partage sur des phases inversées

- la chromatographie de partage sur phase inversée utilise une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire

B)-Chromatographie de partage sur phase normale

-Comme pour les silices apolaires, le motif polaire est greffé sur la silice au moyen d'une réaction de silanisation.

- L'échange est basé sur des interactions type dipôle-dipôle, liaisons hydrogène, etc.

- Les molécules polaires interagissent avec le support dans un solvant apolaire. De même, plus qu'un composé présente un fort caractère polaire, plus il sera retenu.

On utilise des mélanges de solvants: apolaire et un solvant plus polaire tel que CHCl₃, THF, EtOH, etc.

4.3..2.2.CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER :**4.3.2.2.1 Principe :**

La chromatographie sur papier est une méthode de séparation dont le principe repose surtout sur des phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau ; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même, absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. Comme en chromatographie sur couche mince, l'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier et le solvant qui se déplace par

capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité. Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement.

Lorsque l'eau est un des solvants de la phase mobile, le ou les solvants organiques doivent y être assez solubles. C'est pourquoi, des produits comme l'acide éthanoïque, le propanol, le phénol, ou la pyridine sont les solvants les plus fréquemment mélangés avec l'eau pour développer un chromatogramme.

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels. Ses plus grands inconvénients par rapport à la chromatographie sur couche mince sont :

- une durée de développement beaucoup plus longue
- une séparation généralement moins bonne.

4.3.2.2.2 Papier

On peut employer du papier filtre ordinaire, mais il est préférable de se procurer du papier conçu pour cet usage, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques physiques sont uniformes.

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

4.3.3 Chromatographie d'exclusion :

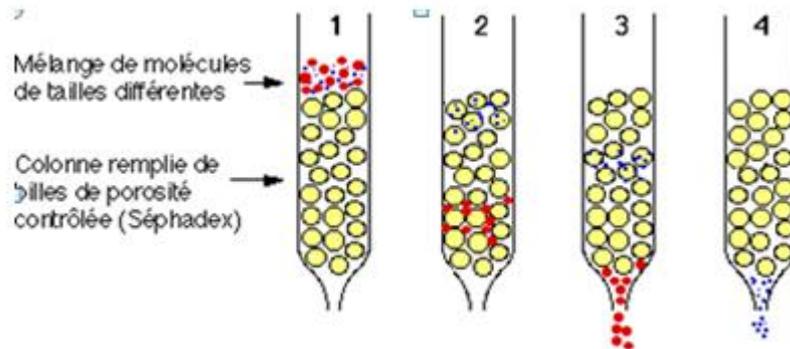
Plusieurs appellations différentes sont employées pour la chromatographie d'exclusion sur gel : « chromatographie par filtration sur gel », « par perméation de gel », « chromatographie d'exclusion ou « chromatographie par filtration sur tamis moléculaires ». Contrairement aux autres méthodes chromatographiques, celle-ci est pratiquement indépendante de la nature du solvant. Le principe est donc simple : la séparation des molécules de tailles différentes est basée sur leur possibilité de pénétrer ou de ne pas pénétrer à l'intérieur de la phase stationnaire.

Le matériel servant de base est un gel, c'est-à-dire un milieu d'aspect homogène formé en fait de deux phases :

- une phase dispersante qui est le solvant,
- une phase dispersée qui est la substance solide constituant le substrat du gel, composé de petites particules très régulières et bien calibrées.

C'est une méthode chromatographique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur poids moléculaire et de leur forme. La phase stationnaire

est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine de celle de certaines molécules à séparer. Les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et donc éluées en premier. Les petites molécules et les molécules de taille moyenne sont éluées plus tardivement, elles pénètrent dans les pores du gel, leur migration est donc retardée (Figure cidessous).



La chromatographie d'exclusion stérique est généralement utilisée pour déterminer le poids moléculaire des composés d'un échantillon par l'utilisation de substances standards

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

-Le diamètre des pores (la porosité):

Il est fixé par le degré de réticulation du gel qui correspond à la proportion de substrat dans l'ensemble de la phase stationnaire. Il détermine le pouvoir de séparation (séparation microporeuse ou macroporeuse).

-L'inertie chimique:

Le gel ne doit pas réagir avec la phase dispersante. Il se dégrade si le pH est inférieur à 2 et supérieur à 8. Donc il doit être inerte chimiquement vis-à-vis des composés de l'échantillon et de la phase mobile.

-La stabilité physico-chimique:

Le gel doit être résistant à la température et à la pression de l'expérience.

-La taille et la forme des particules (la granulométrie):

Les particules du gel sont petites de granulométrie de 40 à 300 μm en chromatographie classique et de 20 à 80 μm en haute performance.

-La forme:

La forme sphérique assure un écoulement uniforme de la phase mobile.

-La nature:

Les gels peuvent être en dextran, en polyacrylamide ou en agarose.

-La consistance:

Elle varie selon la nature et le degré de réticulation des gels. On distingue:

-Les xérogels:

Sont des gels semi-rigides qui ne gardent pas leur forme initiale lorsque la phase dispersante est éliminée.

-Les aerogels:

Sont des gels rigides intéressants lorsqu'on travaille avec des débits élevés ou sous forte pression.

Les différentes étapes de la chromatographie d'exclusion regroupent:

-Le choix du gel: Il dépend du poids moléculaire des composés à séparer .

-Le choix de la phase mobile: Le pH et la force ionique de la phase mobile dépendent de la nature des composés de l'échantillon. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire.

-La préparation du gel: Il existe des gels prêts à l'emploi et des gels qui nécessitent un gonflement par l'eau.

-Le remplissage de la colonne avec la phase stationnaire.

-L'équilibration de la colonne: C'est le lavage de la colonne avec la phase mobile (3 fois).

-L'injection de l'échantillon.

-L'élution: Elle se fait avec la phase mobile qui se déplace le long de la phase stationnaire avec un débit bien déterminé selon le poids moléculaire des composés de l'échantillon.

-La collection des fractions et l'analyse du chromatogramme.

Les différents types de gel et leur capacité de rétention.

Applications de la chromatographie d'exclusion stérique

Le domaine d'application de ce type de chromatographie est celui de la séparation des macromolécules de masses molaires élevées.

-Séparation de petites molécules et de macromolécules: Comme l'élimination des ions d'une solution de macromolécules (exemple le facteur VIII antihémophilique) et la purification d'une protéine après marquage à l'iode 131.

-Analyse d'un mélange de macromolécules: C'est la purification de fractions plasmatiques

(immunoglobulines M) pour la préparation de médicaments ou de réactifs de diagnostic.

-Fractionnement de petites molécules: Il regroupe l'analyse de peptides (en analyse alimentaire dans les fromages), l'analyse d'enzymes et l'analyse de colorants dans les produits alimentaires.

-Séparation de cellules: La chromatographie sur gel de dextran permet d'isoler les lymphocytes des monocytes.

-Détermination des poids moléculaires: La meilleure méthode est l'étalonnage direct des colonnes de chromatographie d'exclusion stérique avec des étalons de poids moléculaires connus tels que le cytochrome C (12600), la myoglobine (17500), l'albumine (68000), l'ovalbumine (45000) et la globuline(160000).

4.3.4. Chromatographie échangeuse d'ions

Elle permet la séparation de molécules chargées (La séparation est en fonction de la charge électrique).

La phase stationnaire est un solide ayant des propriétés particulières que l'on appelle un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions électrostatiques (ioniques) avec des composés (protéines) ionisés. Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables ayant la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution).

C'est une séparation des composés basée sur des interactions ioniques réversibles entre une phase stationnaire appelée échangeur d'ion, des contre ions échangeables ou mobiles et un soluté ou protéine chargé.

Groupement négatif lié par covalence au support ou matrice.

4.3.4.1) Les échangeurs d'ions

Ce sont des solides plus au moins poreux, gélifiables le plus souvent, se présentant sous forme granulée. Ils constituent un réseau de macromolécules insolubles. Il existe deux grands groupes de résines utilisées dans ce type de chromatographie.

A)-Les résines échangeuses de cations dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature anionique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

- Résines cationiques fortes: Résines sulfoniques (très fortement ionisées quel que soit le pH).
- Résines cationiques intermédiaires: Résines phosphoriques.
- Résines cationiques faibles: Résines carboxyliques (non ionisées en milieu acide

- Résines cationiques très faibles: Résines phénoliques

(Ionisées en milieu basique uniquement).

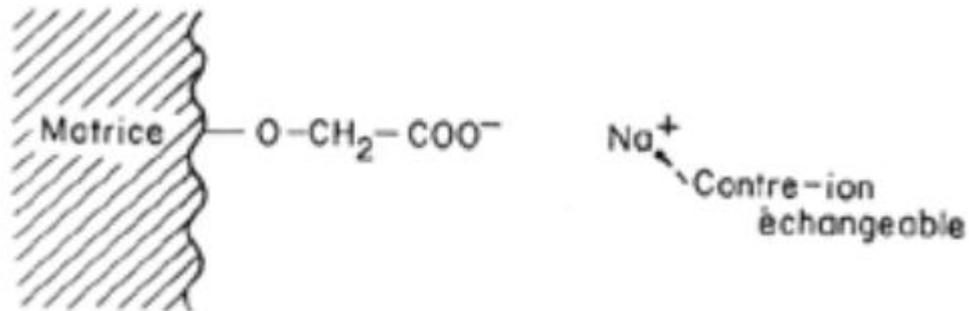
B)-Les résines échangeuses d'anions dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature cationique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

- Résines anioniques fortes (résines à amine quaternaire).

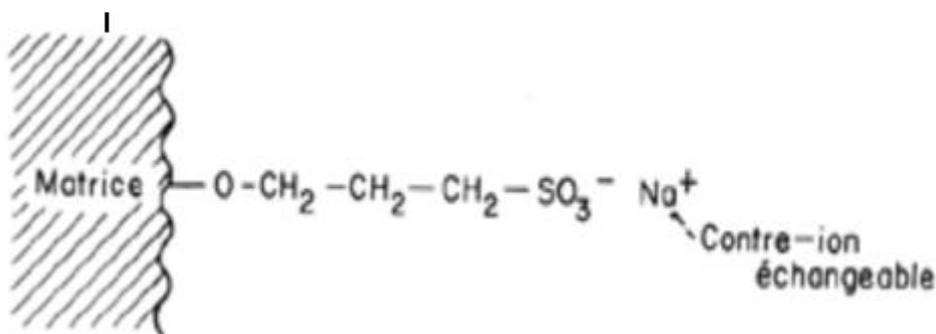
- Résines anioniques faibles (résine à amine secondaire).

Les échangeurs cationiques sont:

Le CM-polyoside (carboxyméthyle): c'est un échangeur faible.

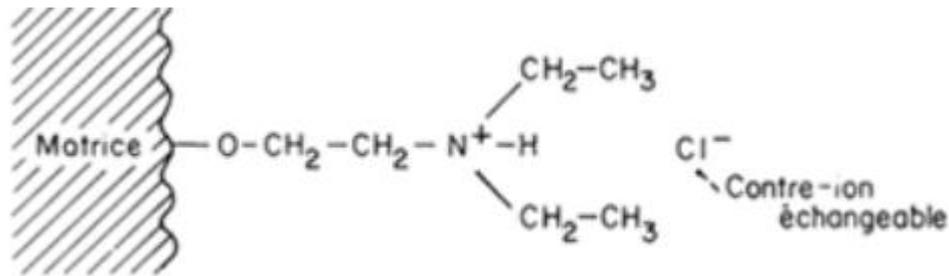


- Le SP-polyoside (sulfopropyle): C'est un échangeur fort.

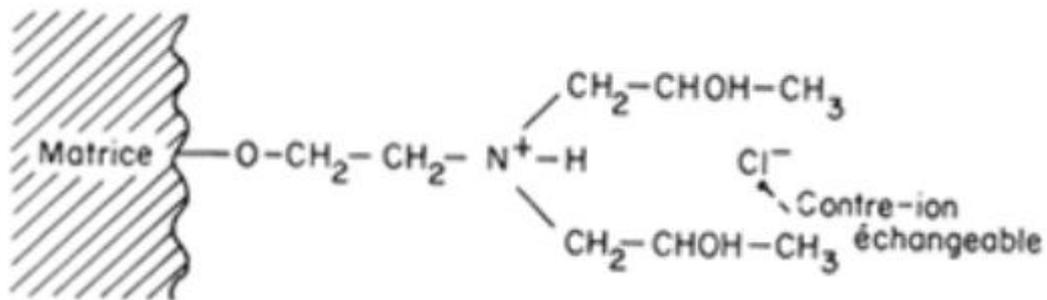


Echangeurs anioniques sont :

- Le DEAE-polyoside (diéthylaminoéthyle): C'est un échangeur faible.



Le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle): C'est un échangeur fort.



4.3.4.2. Mode opératoire

Il consiste à:

- Choisir le gel.
- Choisir la phase mobile.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne (fixation des contres ions).
- Injecter l'échantillon (l'étape de fixation ou adsorption des protéines).
- Effectuer l'élution (étape de désorption par la Fi ou pH).
- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel.

Donc, la colonne est remplie, sans irrégularité, puis équilibrée (l'effluent doit avoir la même composition que l'éluant). Lorsque le dépôt de l'échantillon est fait, on procède à une élution soit en modifiant le pH, soit en modifiant la force ionique de l'éluant. On peut opérer avec un gradient continu ou un gradient discontinu.

Le pH influe sur la charge nette de la protéine (caractère amphotère):

- Si le pH du milieu est supérieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée négativement: Pour l'éluer, il faut diminuer le pH. Les protéines seront chargées positivement et elles décrocheront de la résine.
- Si le pH du milieu est inférieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée positivement: Pour l'éluer, il faut augmenter le pH. Les protéines seront chargées négativement, elles décrocheront de la résine.

La force ionique exerce un effet de compétition entre la protéine fixée et des autres ions (déplacement des ions fixés «les protéines» par un autre ion qui est fortement chargé et de concentration plus élevée (exp. Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+ ...)).

4.3.4.3 Applications de la chromatographie d'échange ionique :

La chromatographie échangeuse d'ions est utilisée au laboratoire, depuis la préparation de l'eau déminéralisée jusqu'à l'analyse de traces ioniques dans un échantillon. Elle s'applique à l'analyse et à la séparation de sels minéraux, d'acides aminés, de peptides, de protéines, de nucléotides, d'acides nucléiques, de lipides et de glucides ionisés.

4.3.5. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide de Haute performance (HPLC) est devenue une séparation et une méthode analytique très versatiles et puissantes au cours des années. C'est une forme avancée de la chromatographie liquide (LC).

Au lieu d'introduire le solvant en fléau et de lui permettre de s'égoutter vers le bas sous l'influence de la gravité, dans la HPLC l'échantillon est obligatoirement par la **colonne** sous des hautes pressions de presque 400 atmosphères, ayant pour résultat une séparation plus rapide et plus efficace.

Cette technique est également chromatographie liquide à haute pression appelée.

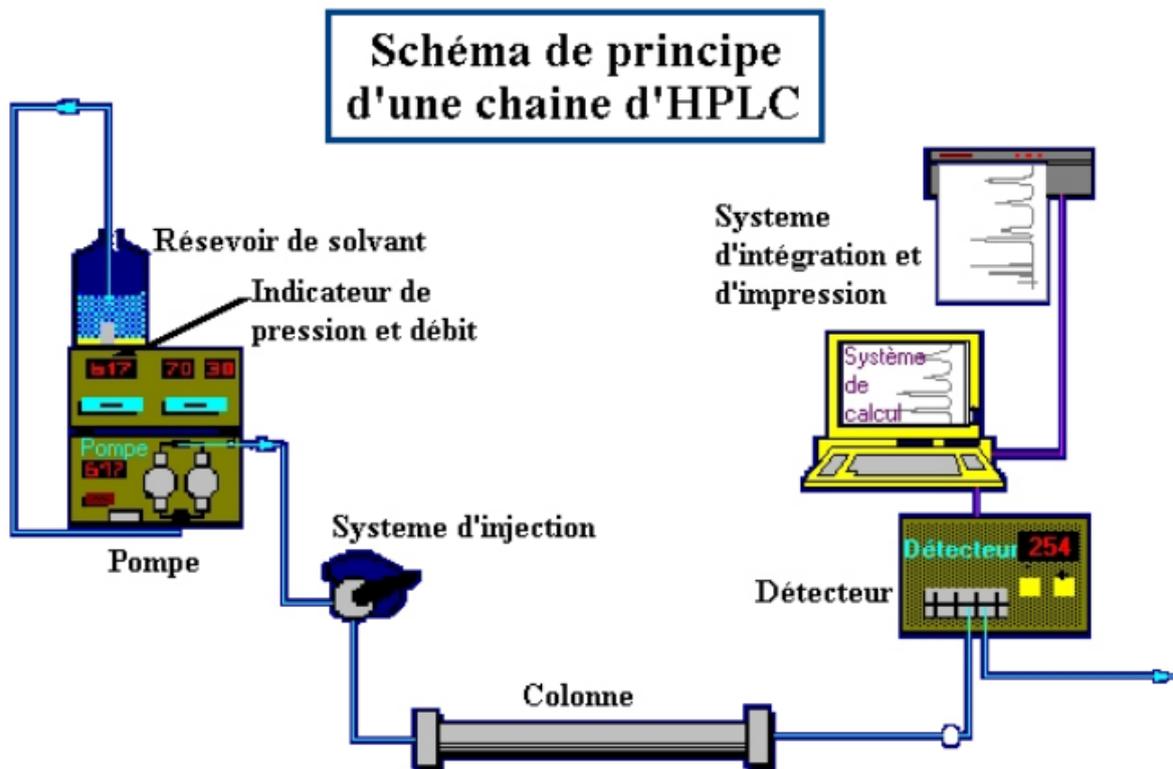
4.3.5.1. Principe de la HPLC

La HPLC suit le même principe fondamental que la chromatographie. Les différents composants dans l'échantillon ont des affinités variables au matériel adsorbant. Ceci entraîne une différence dans le débit pour chaque composant

qui mène à leur séparation pendant qu'ils sortent de la colonne. La seule différence est que la vitesse et la sensibilité de la HPLC est beaucoup plus élevée que celle du LC dû à l'application d'une haute pression.

L'importance de pression appliquée dépend de plusieurs facteurs tels que la longueur et le diamètre de la colonne, le débit, la taille des particules pendant la phase stationnaire, et la composition en phase mobile.

4.3.5.2. Eléments de la HPLC (schéma) :



Réservoir de la phase mobile (solvant)

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium.

Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son

débit, et la stabilité du flux. Actuellement les paramètres d'une pompe sont

* débit : 0,01 à 10 mL/min

* stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)

* pression maximale > 350 bars

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'élution).

. 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 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.

Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10µm. Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires. HPLC Principe et appareillage

5.5. Détecteurs

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes

physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Généralement, on compare le signal

obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule.

Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

- réfractomètre différentiel
- électrochimique
- fluorimétrie... ainsi que différents types de couplage :
- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse
- Résonance Magnétique Nucléaire.

Intégrateur

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic.

4.3.5.3. Les Applications de la HPLC :

La HPLC est très utilisée dans les applications suivantes :

Analyse qualitative - Séparation de produit chimique thermiquement instable et de composés biologiques, par exemple, médicaments (aspirin et ibuprofène), sels (chlorure de sodium), protéines (blanc d'oeuf ou sang), produits chimiques organiques (polystyrène et polyéthylène), phytothérapies et extraits de centrale.

Analyse quantitative - Pour déterminer la concentration d'un composé dans un échantillon en mesurant la hauteur et la zone de la crête chromatographique.

Préparation des substances pures pour clinique et des études toxicologiques et dans la synthèse organique. Analyse de Trace - c'est l'analyse des composés actuels dans des concentrations très faibles dans un échantillon. C'est très utile dans pharmacie, la toxicologie, ambiants, et des études biologiques.

4.3.6 Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

4.3.6.1. Généralités

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).

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

Les gaz utilisés comme phase mobile sont le dihydrogène ou l'hélium ou le diazote ou le dioxyde de carbone.

4.3.6.2. Principe de fonctionnement

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

Ensuite, une fois rendus volatils, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le gaz porteur (ou gaz vecteur) à travers la colonne et se séparer les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. La phase stationnaire peut être un liquide non (ou peu) volatil (chromatographie gaz-liquide) ou un solide adsorbant (chromatographie gaz-solide). Dans les deux cas, la phase stationnaire va provoquer un phénomène de rétention chromatographique avec les différents composés (appelés solutés). Plus le composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne. La grandeur expérimentale brute est appelée temps de rétention. C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du signal maximum du soluté au détecteur. Pour favoriser le transport de tous les composés à travers la colonne (élution), il faut déterminer la bonne température du four. En général, la température doit être légèrement supérieure à la température d'ébullition des composés (de manière que les composés ne sortent pas trop tôt, ce qui aurait pour conséquence d'avoir leurs pics confondus avec celui du temps mort). On peut travailler en isotherme, c'est-à-dire avec une température fixe durant toute l'analyse ou avec un programme de température qui varie.

À la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel qui est appelé détecteur. Cet élément évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux. Le détecteur envoie un signal électronique vers un enregistreur (sorte d'imprimante) qui dessinera les courbes de chaque pic en fonction de leur intensité (courbe de type Gaussienne).

L'ensemble des pics est appelé chromatogramme. Actuellement et de plus en plus, les logiciels remplacent avantageusement les enregistreurs papiers pour l'interprétation des signaux envoyés par les détecteurs.

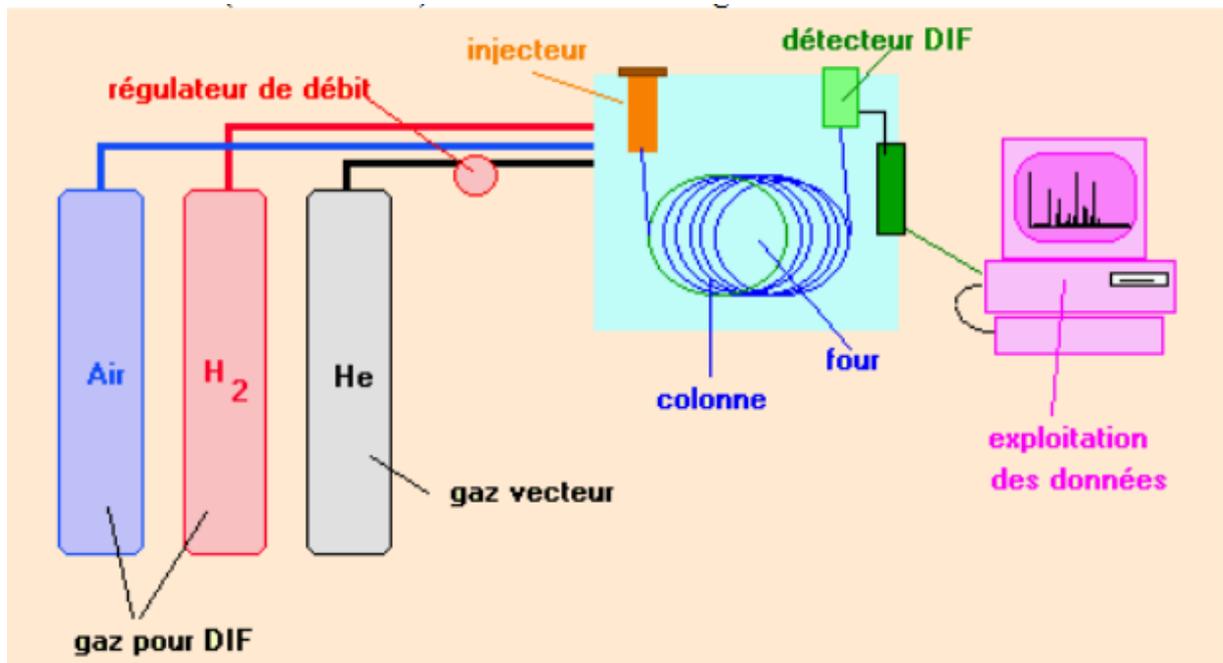


Figure 1 : schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à ionisation de flamme