

Chromatographie : généralités

1. Définitions

La chromatographie est une **méthode physique de séparation des constituants d'un mélange**. Les constituants du mélange sont entraînés au moyen d'une **phase mobile** (liquide ou gaz) le long ou à travers une **phase fixe** (solide ou liquide). La chromatographie est basée sur **les interactions plus ou moins marquées des espèces à séparer à l'égard des phases fixe et mobile**. Chaque substance est soumise à « une interaction de rétention » (affinité de la substance pour la phase fixe) et à « une interaction de mobilité » (entraînement de la substance par la phase mobile). La somme de ces deux interactions dépendant de la nature de chaque espèce ; les différents constituants d'un mélange migrent chacun à une vitesse qui lui est propre, ce qui a pour conséquence leur séparation. La chromatographie a une place très importante dans la pratique du laboratoire et est utilisée couramment dans les cas suivants :

- contrôle de pureté des réactifs et des produits d'une réaction
- suivi d'une réaction par analyse du milieu réactionnel
- isolement et purification des produits d'une réaction.

2. Différents types de chromatographie

La **chromatographie d'adsorption** : la phase stationnaire est un adsorbant et la séparation est basée sur **l'adsorption sélective** des composants du mélange à la surface du solide.

La **chromatographie de partage** : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide inerte et la séparation est basée sur **le partage** des constituants du mélange entre deux phases liquides.

La **chromatographie d'échange d'ions** : la phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine (polymère de synthèse) porteuse de groupements ionisés exerçant des interactions de type électrostatique avec les constituants ioniques du mélange.

La **chromatographie d'exclusion** (ou tamisage moléculaire ou perméation de gel) : la phase stationnaire est un solide poreux, les grosses particules sont exclues de la phase fixe alors que les petites sont retenues (incluses) et cheminent à travers les pores du solide constituant la phase stationnaire.

La **chromatographie d'affinité** : la phase stationnaire est un support moléculaire, chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une bio-affinité pour un constituant du mélange.

Cette liste n'est pas exhaustive et il est rare de pouvoir associer une méthode chromatographique à un seul phénomène, comme l'adsorption ou le partage. Le plus souvent, la méthode choisie dépend de la nature des substances à séparer et fait intervenir plusieurs phénomènes.

Nous pratiquerons au laboratoire :

- la CCM,
- la chromatographie sur colonne (flash ou pas),
- la CPG,
- la CLHP non ionique,
- la CLHP ionique.

3. Facteurs intervenant dans la chromatographie d'adsorption

a- Adsorbants. Les adsorbants sont des solides très divisés (l'adsorption étant un phénomène de surface, il faut que l'adsorbant présente la plus grande surface utile possible) : 1 g d'alumine pour chromatographie représente une surface de l'ordre de 100 m². La qualité d'un adsorbant dépend de sa pureté, de sa surface, de son homogénéité, de sa teneur en eau. Il est caractérisé par les critères suivants :

- ❖ la capacité d'adsorption ; on distingue les adsorbants faibles (à faible capacité d'adsorption), comme le talc ou le carbonate de sodium et les adsorbants forts (à forte capacité d'adsorption) comme le gel de silice ou l'alumine.
- ❖ la polarité ; certains adsorbants présentent une forte polarité, comme le gel de silice ou l'alumine, tandis que d'autres, au contraire, ont une faible polarité comme le charbon actif.
- ❖ la granulométrie ; un adsorbant présentant une granulométrie faible assure une meilleure séparation mais par contre, celle-ci se fait beaucoup plus lentement.

Principaux adsorbants employés en chromatographie

| | |
|--------------------------------|---|
| Papier, cellulose | ↓ forces d'interactions croissantes avec les composés polaires |
| Kieselguhr, terre de diatomées | |
| Amidon | |
| Sucres | |
| Talc | |
| Carbonate de sodium | |
| Oxyde de magnésium | |
| Gel de silice | |
| Alumine | |
| Charbon activé | |

Le gel de silice est l'adsorbant le plus utilisé et le plus rentable à essayer en premier lieu pour séparer des composés neutres contenant un ou deux groupes fonctionnels. Par contre, pour séparer des bases, il est préférable d'utiliser de l'alumine plus basique que la silice. Ces deux adsorbants se trouvent dans le commerce, additionnés d'une substance qui permet une visualisation des dépôts sous U.V.

b- Solvants ou éluants. Le pouvoir éluant d'un solvant dépend de sa polarité. Plus un éluant est polaire, plus il entraînera facilement une substance polaire. En revanche, un solvant apolaire possèdera un mauvais pouvoir éluant vis à vis des substances polaires mais entraînera facilement un constituant apolaire. On utilise soit un solvant pur soit un mélange de plusieurs solvants de façon à « ajuster » son pouvoir éluant au système chromatographique étudié.

Série éluotrope des solvants

| | |
|--------------------|--|
| Ether de pétrole | ↓ « pouvoir éluant » croissant ; polarité croissante |
| Cyclohexane | |
| Toluène | |
| Dichlorométhane | |
| Ethoxyéthane | |
| Ethanoate d'éthyle | |
| Propanone | |
| Propan-1-ol | |
| Ethanol | |
| Méthanol | |
| Eau | |
| Acide acétique | |

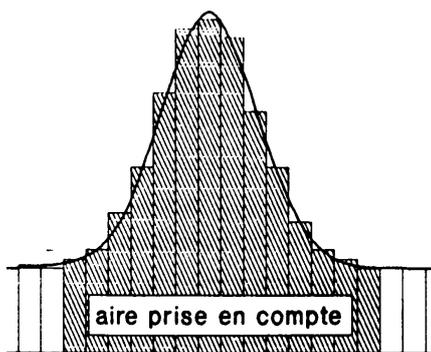
c- Interactions substance-adsorbant et substance-éluant

Les **interactions substance-adsorbant** correspondent essentiellement à l'établissement de liaisons du type dipôle-dipôle, dipôle-ion ou de liaisons de Van der Waals. En général, plus un adsorbant est polaire, plus il fixe les substances polaires. Les **interactions substance-éluant** sont de deux types :

- ❖ dissolution de la substance par l'éluant : les substances ont tendance à se dissoudre dans l'éluant et à migrer avec lui. C'est ce phénomène qui est prépondérant dans le cas de solvants peu polaires (hydrocarbures, éther, composés carbonylés).
- ❖ déplacement des molécules adsorbées par l'éluant : les molécules d'éluant recherchent les mêmes sites d'adsorption que les molécules de la substance adsorbée et « déplacent » ces dernières. C'est ce phénomène qui est prépondérant dans le cas de solvants polaires et protogènes (alcools, eau, acides).

4. Le chromatogramme (CPG et CLHP)

Il s'agit d'un graphe à deux dimensions, montrant l'évolution en fonction du temps d'un paramètre qui dépend de la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne. Si la séparation a été convenable, la courbe est formée d'autant de pics distincts qu'il y a de composés à séparer si tous ceux-ci peuvent être détectés. La ligne de base correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. Un constituant est caractérisé par son temps de rétention t_R , temps écoulé entre l'instant de l'injection de l'échantillon et celui déterminé au maximum du pic qui lui correspond sur le chromatogramme. Le temps de rétention t_R est caractéristique du constituant pour des conditions d'analyse données. Un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_M appelé temps mort. L'aspect d'un chromatogramme idéale est le même que celui obtenu en représentant la loi Normale de distribution des erreurs aléatoires (courbe de Gauss).



Pour un réglage donné de l'appareil, on admet qu'il existe pour chaque pic du chromatogramme une relation linéaire entre son aire et la quantité du composé correspondant dans l'échantillon injecté, pour une plage de concentrations qui dépend du type de détecteur employé. On a la relation :

$$m_i = K_i \cdot A_i$$

avec : K_i coefficient de réponse absolu du composé i
 A_i aire du pic d'éluion du composé i

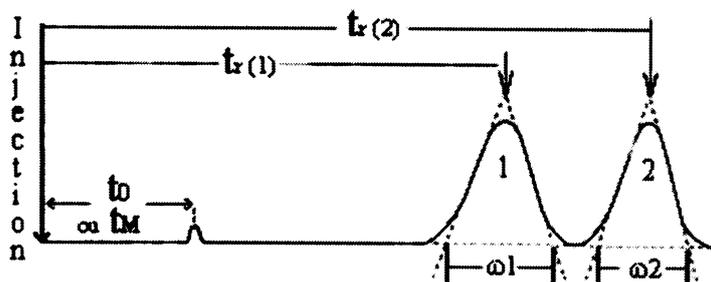
Pour calculer le coefficient K_i d'un composé i , il faut connaître la masse m_i injectée, à laquelle on peut accéder en connaissant le volume de solution introduit dans la colonne. Cependant, il est difficile de déterminer avec précision ce volume qui dépend à la fois de l'injecteur et de la précision de la seringue ou de la boucle d'injection. Par ailleurs, le coefficient de réponse absolu K_i dépend du réglage du chromatographe. Ce n'est pas un paramètre intrinsèque du composé. C'est pourquoi plusieurs des méthodes utilisées en analyse quantitative évitent de faire intervenir les coefficients de réponse absolus K_i .

6. Qualité de la séparation :

a. Sélectivité

C'est le rapport des temps réduits pour deux constituants (1) et (2) $\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$ avec $\alpha \geq 1$

b. Résolution



Pour traduire la plus ou moins bonne séparation entre deux pics, on utilise le facteur de résolution R :

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_2 + w_1}$$

si $R < 1$ la résolution est mauvaise

si $1 < R < 1,5$ la résolution est acceptable

si $1,4 < R < 1,6$ la résolution est optimale

si $R > 1,6$ la résolution est inutilement trop bonne, le temps d'analyse est rallongé.