



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE

UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR – EL OUED

FACULTE DES SCIENCES EXACTES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

COURS

Séparation en chimie analytique

3L Chimie Organique

Dr. Larbi Haddad

PREFACE

Le présent polycopié expose les cours de la matière intitulée « Séparation en chimie analytique » destiné précisément aux étudiants de la troisième année chimie organique et plus généralement à tous les étudiants de formation chimique, physique ou bien physicochimique et pour certains biologistes.

Il a pour but d'initier les étudiants aux concepts fondamentaux des techniques de séparation. Consciemment à garder un caractère pédagogique, toutes les notions abordées dans ce polycopié sont strictement conformes au programme officiel tout en tenant compte les qualifications des étudiants et de leurs connaissances antérieures basées sur la chimie analytique pour la deuxième année.

La matière est subdivisée essentiellement en deux grandes parties : une première qui portera sur la chimie analytique tout en révélant toutes les méthode de séparation utilisées dans la chimie analytique. La deuxième partie sera consacrée à l'analyse chimique en détaillant les notions et les informations relatives des différentes techniques de séparation (CPG, HPLC, ...etc.).

Dr. Larbi Haddad

SOMMAIRE

Partie A : Méthodes de séparation en chimie analytique

I. Généralités sur les méthodes de séparation	01
1. Evaporation	03
2. Distillation	04
3. Filtration	05
4. Décantation	05
5. Sublimation	06
6. Centrifugation	07
II. Séparation par rupture de phase	08
1. Evaporation du solvant	08
2. Précipitation	08
III. Osmose et dialyse	09
1. Osmose	09
2. Dialyse	12
IV. Extraction par un solvant non miscible	13
V. Séparation à contre-courant	14
1. Principe	14
2. Appareil de Craig	15
VI. Extraction par un solide	17
1. Principe	17
2. Différentes méthodes	17
2.1. Extraction discontinue	17
2.2.Extraction continue	17
VII. Séparation par changement d'état	18
1. Distillation simple	18
2. Distillation fractionnée	19
3. Sublimation	19

Partie B : Séparation par Chromatographie

I. Chromatographie CCM	21
II. Chromatographie sur colonne par gravité	23
1. Introduction	23
2. Préparation de la colonne	23
3. Présentation du matériel	24
4. Mise en place du matériel	24
5. Réalisation de l'expérience	25
III. Chromatographie HPLC	26
1. Introduction	26
2. Origine	26
3. Conception générale d'un appareil de CLHP	27
4. Pompes et gradients d'élution	27
5. Injecteurs	29
6. Colonne	31
7. Phases stationnaires	32
8. Chromatographie chirale	35
9. Phases mobiles	36
IV. Chromatographie CPG	38
1. Introduction	38
2. Principe d'une installation de CPG	38
3. Gaz vecteur et régulateur de débit	39
4. Introduction de l'échantillon et chambre d'injection	41
5. Enceinte thermostatée	44
6. Colonnes	44
7. Phases stationnaires	45
8. Principaux détecteurs	47
9. Indices de rétention et constantes des phases stationnaires	49
V. Chromatographie d'exclusion stérique	52
1. Principe	52
2. Phases stationnaires et phases mobiles	53
3. Instrumentation	53

4. Domaines d'application	54
VI. Chromatographie d'interactions hydrophobes	56
1. Principe	56
2. Méthodologie	57
3. Types de groupe fonctionnel hydrophobe	59
VII. Chromatographie en phase supercritique	60
1. Les phases supercritiques comme phase mobile	61
2. Instrumentation en SFC	62
3. Comparaison de la SFC avec la CLHP et la CPG	63

Partie A : Méthodes de séparation en chimie analytique

I- Généralités sur les méthodes de séparation

Le terme « Separation Process Principles » a été publié pour la première fois en 1998 pour fournir un traitement complet des principales opérations de séparation dans l'industrie chimique. Les séparations sont limitées par l'équilibre thermodynamique, tandis que la conception des équipements dépend du taux de transfert de masse. La création d'un mélange d'espèces chimiques à partir d'espèces distinctes est un processus spontané qui ne nécessite aucun apport d'énergie. Le processus inverse, la séparation d'un mélange chimique en composants purs, n'est pas un processus spontané et nécessite donc de l'énergie. Un mélange à séparer peut être monophasique ou multiphasique. S'il est polyphasé, il est généralement avantageux de séparer d'abord les phases.

En analyse chimique, il est d'usage de distinguer deux catégories de méthodes. La première regroupe les méthodes chimiques proprement dites qui mettent en jeu les propriétés chimiques pour obtenir l'information chimique sur la matière traitée et la seconde, dorénavant au premier plan, qui comprend les méthodes physiques et physico-chimiques utilisant des propriétés particulières de la matière pour aboutir à des mesures en relation avec cette même information chimique.

La chimie analytique est indispensable dans de nombreux secteurs autres que ceux, traditionnels, de la chimie ou de la parachimie. Elle est de plus en plus présente au sein des activités humaines. Ainsi on la retrouve dans le médical (elle débouche ainsi sur les diagnostics), la biochimie, l'agroalimentaire, l'environnement (pollution), la sécurité dans un monde souvent dangereux et dans de nombreux secteurs industriels.

Pour mener à bien ces études, l'analyste doit être formé aux différentes techniques. Il doit être expert et connaître les concepts de base de la chimie, sachant qu'il arrive souvent qu'un composé puisse être dosé par des méthodes différentes. Choisir une bonne méthode, et si possible la meilleure, exige la connaissance de beaucoup de paramètres. On doit se poser tout un ensemble de questions :

- de quel type d'échantillon s'agit-il (acier, terre, eau...) ?
- est-ce un constituant majeur, mineur ou à l'état de trace (moins de 0,01 %) ?
- s'agit-il d'une analyse partielle ou complète de l'échantillon ?

- l'échantillon doit-il être récupéré après la mesure ?
- l'analyse demandée est-elle unique ou sera-t-elle répétitive ?
- quel est le degré de précision nécessaire ?
- dispose-t-on du personnel compétent pour mener à bien l'analyse ?
- quel sera le coût de l'analyse ?
- quel est le laps de temps dont on dispose pour fournir le résultat ?
- quelle est la fiabilité des résultats de la méthode envisagée ?
- quelles sont les conséquences d'erreurs possibles ?

N'importe quelle méthode de séparation a principalement trois buts :

- purification : des impuretés doivent être extraites du composé d'intérêt ;
- concentration : élimination d'une partie du solvant. Voir aussi Dessiccation ;
- fractionnement : séparation d'un mélange complexe en plusieurs mélanges différents.

Le principe d'un procédé de séparation est d'utiliser une différence de propriétés entre le composé d'intérêt et le reste du mélange. Plus la différence de propriété sera grande, plus la séparation sera aisée. Ainsi, le choix du procédé de séparation commence par une bonne connaissance de la composition du mélange et des propriétés des différents composants.

Tableau 1. Exemples de quelques méthodes de séparation

Méthodes de séparation	Matériel requis	Différences dans les propriétés physiques des composants sur lesquelles repose la technique de séparation	Exemple pratique
Filtration	Béchers, entonnoir, papier filtre	Dimension des particules	Eau (petites particules) et sable (grosses particules)
Décantation	Béchers, tige de verre	Grande différence de densité	Eau (faible densité) et sable (forte densité)
Centrifugation	Centrifugeuse avec tubes	Faible différence de densité	Eau (faible densité) et farine (densité un peu supérieure)

Séparation	Ampoule à décanter, bécher	Densité différente de liquides non miscibles	Eau (forte densité) et huile d'arachide (faible densité)
Evaporation	Bec Bunsen, capsule d'évaporation, verre de montre	Grande différence entre les points d'ébullition	Eau (100°C) et sel (1413 °C)
Distillation simple	Bec Bunsen, eau courante, réfrigérant, thermomètre	Grande différence entre les points d'ébullition	Eau (100°C) et sel (1413 °C)
Distillation fractionnée	Bec Bunsen, eau courante, réfrigérant, thermomètre, colonne de fractionnement	Faible différence entre les points d'ébullition	Alcool (78°C) et eau (100 °C)
Sublimation	capsule d'évaporation, entonnoir, tube à essai	Un solide qui se sublime et un autre qui ne le fait pas	Iode (187°C) et sable
Cristallisation	Béchers, thermomètre, papier-filtre	Solubilité	Sucre (très soluble dans l'eau chaude, faible solubilité dans l'eau froide)
Chromatographie sur papier	Papier filtre, solvant (éluant) convenable	Solubilité dans le solvant	Les colorants composant une couleur sont plus ou moins solubles dans le solvant

1. Evaporation

L'évaporation peut être utilisée comme méthode de séparation pour séparer les composants d'un mélange avec un solide dissous dans un liquide. Le liquide est évaporé, c'est-à-dire qu'il passe de son état liquide à son état gazeux. Cela nécessite souvent de la chaleur. Une fois que le liquide est complètement évaporé, le solide est tout ce qui reste.

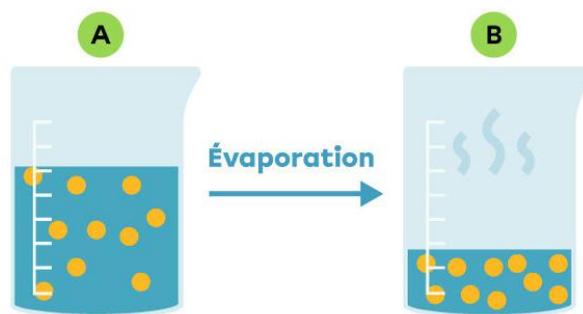


Figure 1. Evaporation : a) avant ; b) après

2. Distillation

La distillation est une technique de séparation utilisée pour séparer les composants d'un mélange liquide par un processus de chauffage et de refroidissement, qui exploite les différences de volatilité de chacun des composants.

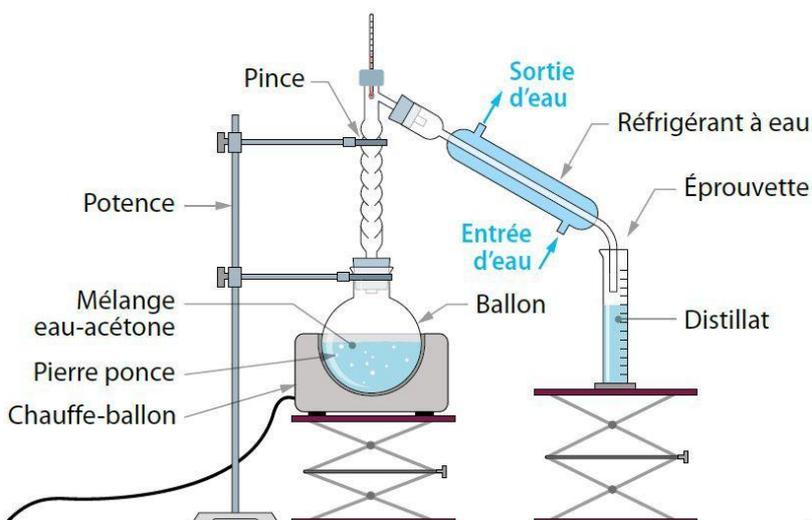


Figure 2. Montage en verrerie de distillation simple

Procédure de distillation : 1) le ballon à fond rond contient le mélange liquide qui doit être porté à ébullition vigoureuse, 2) le composant avec le point d'ébullition le plus bas passera à son état gazeux, 3) au contact du condenseur refroidi à l'eau, le gaz se condense, 4) ruisselle dans l'éprouvette graduée où le chimiste peut récupérer le liquide distillé final, et 5) l'autre composant liquide reste dans le ballon à fond rond.

3. Filtration

La filtration est une technique de séparation utilisée pour séparer les composants d'un mélange contenant un solide non dissous dans un liquide. La filtration peut se faire à froid ou à chaud, par gravité ou par dépression, à l'aide d'un entonnoir *Buchner* ou *Hirsch* ou d'un simple entonnoir en verre. La méthode exacte utilisée dépend du but de la filtration, qu'il s'agisse de l'isolement d'un solide d'un mélange ou de l'élimination des impuretés d'un mélange.

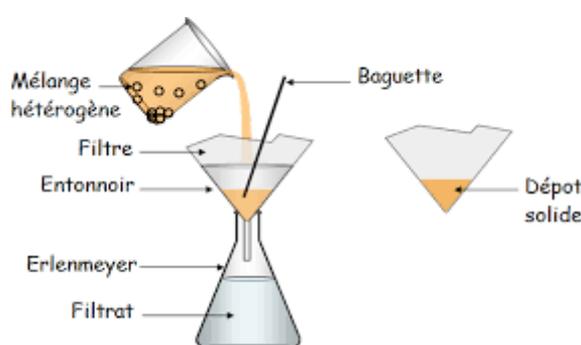


Figure 3. Montage de filtration

Procédure de filtration : 1) le mélange est versé à travers un entonnoir recouvert d'un papier filtre, 2) le filtrat (liquide) s'égoutte dans le flacon filtrant, 3) le solide reste dans l'entonnoir.

4. Décantation

La décantation est une opération de séparation mécanique, sous l'action de la gravitation, de plusieurs phases non-miscibles dont l'une au moins est liquide. On peut ainsi séparer soit plusieurs liquides non-miscibles de densités différentes, soit des solides insolubles en suspension dans un liquide.

Séparation de liquides

Lorsque deux liquides ne sont pas miscibles, comme l'huile et l'eau, il suffit de laisser reposer le mélange pour que le liquide le plus dense se place en dessous du liquide le moins dense, et qu'apparaisse une surface de séparation horizontale entre les deux liquides. Dans les laboratoires de chimie ou de biologie on utilise couramment ce procédé lors des

extractions liquide-liquide impliquant une phase aqueuse et une phase organique. On utilise alors une ampoule à décanter pour séparer les deux phases.

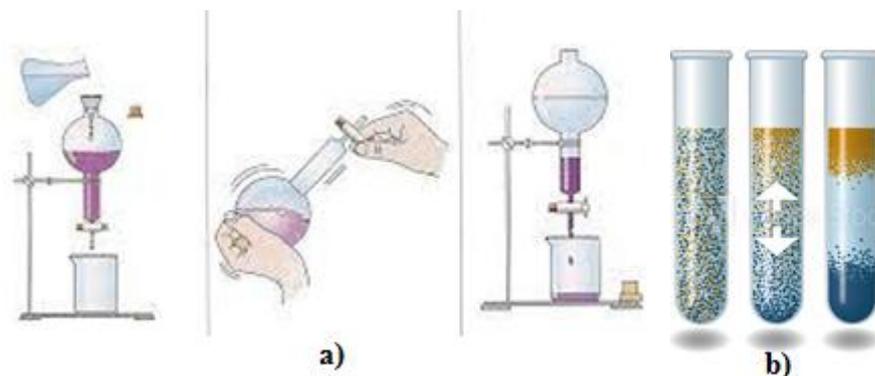


Figure 4. décantation de mélange : a) liquide-liquide ; b) solide liquide

Décantation de matières solides

Si un liquide contenant des particules en suspension est laissé au repos, les particules tombent vers le fond ou remontent à la surface selon leur densité et leur diamètre, sous l'action combinée de leur poids et de la poussée d'Archimède. Le liquide est appelé couramment « surnageant », alors les particules solides qui se sont déposées au fond du récipient constituent le « dépôt »

5. Sublimation

La sublimation sépare un mélange de solides dont l'un sublime. Quelques substances changent directement, du solide à la vapeur lors du chauffage sans passer par l'état liquide. Ce changement s'appelle la sublimation. Lors du refroidissement, la vapeur d'eau redevient directement solide. L'iode est un solide qui sublime. Si un mélange d'iode et de sable est chauffé dans un bécher, l'iode passe directement du solide à la vapeur. La vapeur redevient solide directement sur une surface froide. Le sable n'est pas affecté par la chaleur et reste dans le bécher.

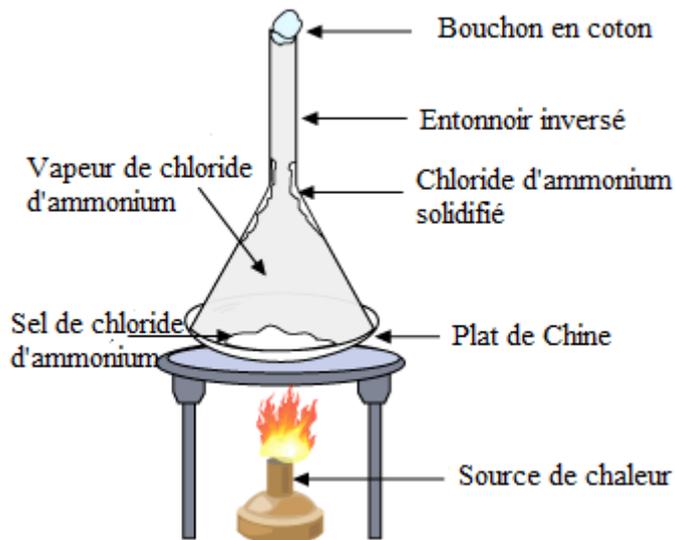


Figure 5. Protocole de sublimation

6. Centrifugation

La centrifugation est un procédé de séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge. Le mélange à séparer peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide. L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse. Cette technique fait partie des opérations unitaires en génie des procédés.

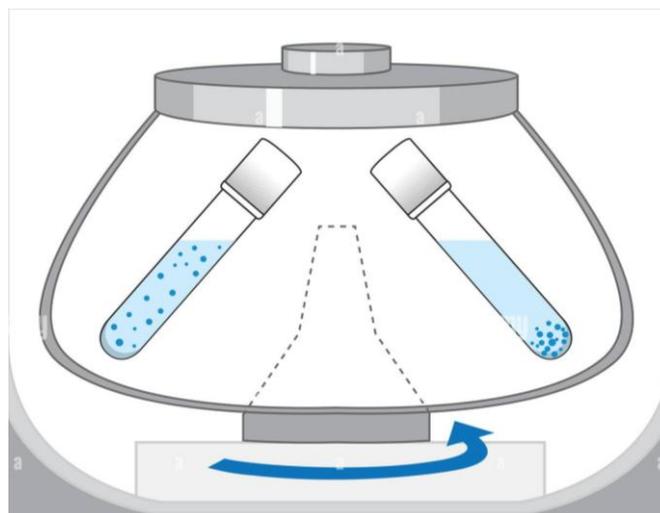


Figure 6. Appareil de centrifugation avec tubes

II- Séparation par rupture de phase

Les constituants d'un mélange homogène peuvent être séparés par plusieurs techniques. Un raisonnement approprié est basé sur la rupture de phase. Cette dernière se fait soit par augmentation de la concentration de l'analyte (évaporation partielle ou totale du solvant), soit par diminution de sa solubilité (précipitation).

1. Evaporation du solvant :

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

2. Précipitation

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

a- *Modification de la température :*

La quantité de soluté pouvant être dissoute dépend de la quantité de solvant et de sa température. En règle générale, plus haute est la température et plus grand le volume de solvant, plus de soluté peut être dissous. Une solution qui ne peut plus dissoudre de soluté à une certaine température est dite saturée. Si l'on refroidit une solution saturée ou si on l'évapore, elle ne sera plus capable de garder le montant originel de soluté et une partie de celui-ci se cristallisera hors de la solution. Les impuretés cependant resteront dans la solution et ne se retrouveront pas dans les cristaux qui seront purs.

b- *Addition d'un non solvant :*

On ajoute un solvant qui diminue la solubilité de l'analyte au sein du mélange. On récupère donc facilement le solide formé.

c- *Relargage* :

C'est une technique qui consiste à séparer une substance en solution de son solvant en introduisant une autre substance plus soluble qui prend sa place. Lorsqu'une substance est en solution, chaque molécule est entourée par des molécules de solvant qui l'empêchent de se grouper. Si on introduit dans la solution une substance plus facilement soluble que la première, celle-ci monopolise les molécules du solvant permettant à la première de se séparer du solvant (phénomène de compétition). Le relargage peut être suivi d'une décantation, une filtration ou d'une distillation.

Parfois deux phases liquides dont l'une est aqueuse ont du mal à se séparer du fait de leurs densités voisines. On sature la phase aqueuse avec du chlorure de sodium et la séparation est facilitée. Cette technique est utilisée pour séparer l'ADN ou les protéines (en ajoutant du sulfate d'ammonium).

III- Osmose et dialyse

1. Osmose

Un procédé membranaire est un procédé qui permet de séparer des constituants d'un mélange à l'aide d'un matériau synthétique appelé membrane. La membrane va permettre de laisser passer certains constituants et d'en retenir d'autres. La membrane va ainsi jouer le rôle de séparateur.

On considère deux phases liquides séparées par une membrane sélective (semi-perméable), perméable à certaines molécules et imperméable à d'autres. Supposons par exemple que l'une des phases soit l'eau pure et l'autre une solution aqueuse d'un soluté arrêté par la membrane. L'eau pure tend à diluer la solution de manière à équilibrer les concentrations. Ce déséquilibre se traduit par un flux de solvant pur à travers la membrane qui veut diluer la solution dans le but de rendre les concentrations égales. C'est au flux de solvant pur qu'on donne le nom de l'osmose de diffusion. En effet les molécules de solvant diffusent du milieu le moins concentré vers le milieu le plus concentré. Le mot osmose vient du fait que c'est le nombre d'osmole du soluté qui fait la différence de concentration

de part et d'autre de la membrane. Comme il y a un flux de particules de solvant, on pourra donc affirmer qu'une pression est responsable de ce flux de solvant.

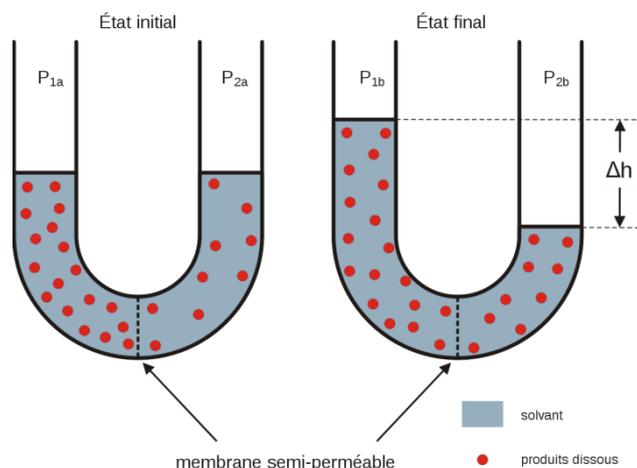


Figure 7. Phénomène d'osmose

1. Pression osmotique

On remarque donc que le solvant passe dans la solution et provoque une pression hydrostatique qui lorsqu'elle sera suffisante, arrêtera le flux de solvant. Donc la pression hydrostatique est égale à la pression osmotique. On définit donc la pression osmotique comme la pression minimum qu'il faut exercer pour empêcher le passage d'un solvant d'une solution moins concentrée à une solution plus concentrée au travers d'une membrane semi-perméable.

2. Loi de Van't Hoff

La pression osmotique se définit comme la pression minimale qu'il faut exercer pour empêcher le passage d'un solvant d'une solution moins concentrée à une solution plus concentrée au travers d'une membrane semi-perméable (membrane héli-perméable). En biophysique, on distingue la pression oncotique qui correspond à la part de la pression osmotique due aux protéines. La pression osmotique se concrétise quand la part de la fraction molaire du solvant aqueux n'est pas égale à 1.

On pourrait imaginer que, dans la solution la plus concentrée, les molécules d'eau sont en moins grand nombre et que donc il y a égalisation de ce nombre de molécules d'eau de chaque part de la membrane. Mais cet effet est très minime. En fait, dans la solution la plus concentrée, les molécules d'eau (si le solvant est de l'eau) s'agglomèrent autour des

molécules de soluté hydrophiles. Ces molécules accaparées ne traversent pas la membrane ; l'important c'est la différence de concentration de « l'eau libre ». Ainsi, l'eau libre se déplace à partir de la solution où la concentration d'eau libre est élevée vers la solution où la concentration d'eau libre est faible, jusqu'à ce que les concentrations soient égales. Mais au bout du compte, le résultat est toujours le même : le solvant se déplace vers la solution dont la concentration de soluté est la plus élevée.

La pression osmotique est proportionnelle aux concentrations de soluté de part et d'autre de la membrane et de la température ; lorsque l'on est en présence de plusieurs solutés, il faut prendre en compte la totalité des solutés (à la manière d'un gaz composé, somme des pressions partielles).

La pression osmotique d'une solution idéale se calcule par une formule développée par « Van 't Hoff » en 1886 et appliquant le deuxième principe de la thermodynamique.

$$\Pi.V = -R.T.\ln(1 - x_2) \quad (\text{Eq. 01})$$

Π : est la pression osmotique, en Pa

V : est le volume molaire occupé par le solvant

R : est la constante des gaz parfaits

T : est la température absolue, en K

x_2 : est la fraction molaire du soluté

L'équation appliquée aux solutions réelles est, quant à elle :

$$\Pi.V = -R.T.\ln(1 - \gamma x_2) \quad (\text{Eq. 02})$$

où γ est le coefficient d'activité du soluté.

Pour une solution très diluée, x_2 est proche de 0, et $-\ln(1-x) \approx x_2$. On peut donc simplifier l'équation en :

$$\Pi = \frac{x_2.R.T}{V} = C.R.T \quad (\text{Eq. 03})$$

où C est la concentration de la solution (en sommant toutes les espèces présentes).

3. Solutions isotoniques, hypertoniques et hypotoniques

Si une membrane semi-perméable sépare deux solutions de molarités différentes, le solvant dialyse de la solution la moins concentrée vers la plus concentrée. La première est dite hypotonique et la deuxième est hypertonique. Si les 2 solutions ont la même molarité, donc, ça ne donne lieu à aucun transfert de solvant, elles sont dites isotoniques (figure 8).

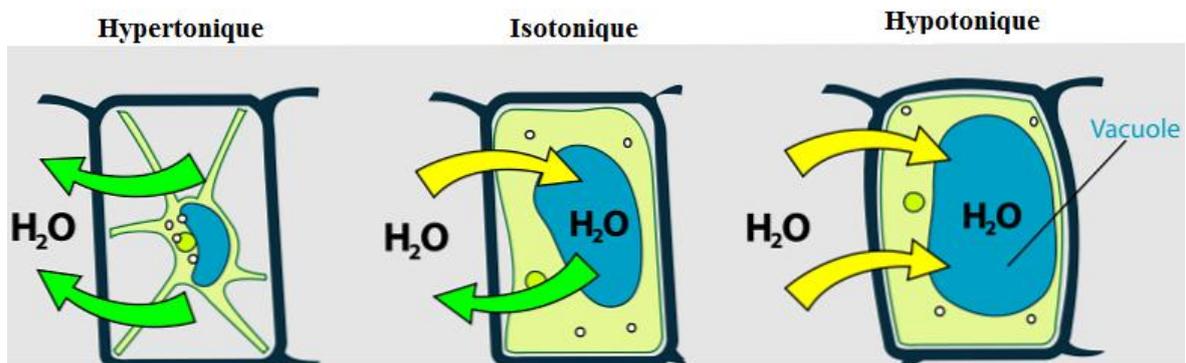


Figure 8. Cas de tonicité

2. Dialyse

La dialyse est une technique de purification de solutions. En particulier, en médecine, est un traitement de suppléance qui n'assure qu'incomplètement le remplacement de la fonction rénale. Elle débarrasse le sang des déchets et de l'eau (ou toxines) accumulés en excès dans le corps. Dans la dialyse simple les impuretés migrent pour égaliser le potentiel chimique (sels et solutés organiques de faible masse molaire) de part et d'autre de la membrane ; si l'on renouvelle suffisamment la phase en cours de concentration, on peut obtenir une élimination quasi totale des impuretés.

Il existe deux techniques de dialyse :

- a- *L'hémodialyse*: Le sang est filtré à travers une membrane artificielle. Cette technique nécessite la réalisation d'un accès facile au sang qu'on appelle l'abord vasculaire. Elle se déroule à domicile ou dans une structure de dialyse. La gestion de la prise en charge peut être publique, privée ou associative.
- b- La *dialyse péritonéale* se déroule en général à domicile.

IV- Extraction par un solvant non miscible

Tous les liquides ne se mélangent pas nécessairement : c'est le cas de l'huile et de l'eau même après agitation. Ces liquides sont dits non-miscibles (contrairement au vinaigre et à l'eau qui sont eux miscibles). Placé dans un récipient, le résultat de leur mélange sera observable (deux phases distinctes superposées, de nature hétérogène).

Une espèce chimique (soluté) possède une faculté plus ou moins importante (à cause de sa structure) à se mélanger avec un liquide (solvant). Le mélange du soluté et du solvant formera une solution. Mais si une trop grande quantité de soluté est versée dans le solvant, ce dernier ne sera pas totalement dissout : on obtiendra une solution saturée. En chimie, cette limite est appelée solubilité : c'est la quantité maximum de soluté que l'on peut dissoudre dans un solvant donné.

L'extraction par solvant est une technique qui consiste à dissoudre une espèce donnée dans un solvant alors qu'elle est dissoute dans de l'eau.

a- Choix du solvant :

Le choix du solvant d'extraction obéit à trois critères :

- l'état physique du solvant ; liquide à température et pression de l'extraction ;
- la non miscibilité du solvant avec l'eau ;
- la solubilité de l'espèce à extraire : l'espèce extraite doit être plus soluble dans le solvant que dans l'eau.

Il faut de surcroît connaître la densité du solvant pour connaître la position de la phase organique (qui contient le solvant) par rapport à la phase aqueuse (qui contient l'eau).

b- Extraction

L'extraction se passe dans une ampoule à décanter en suivant les étapes :

- mise en contact du solvant avec l'espèce dissoute dans l'eau ;
- agitation puis décantation ;
- obtention de deux phases séparées : une phase aqueuse et une phase organique ;

- récupération la phase organique ;
- séchage (utilisation d'un agent desséchant) puis filtration.

On résume donc ce qui suit :

L'extraction par un solvant est une technique **sélective** qui repose sur la solubilité des espèces à extraire dans un solvant donné. Le solvant doit alors être **non miscible** à l'eau, dissoudre facilement l'espèce à extraire et être liquide à la température de l'extraction. Sa densité nous permet de situer la position de la phase organique pour achever l'extraction.

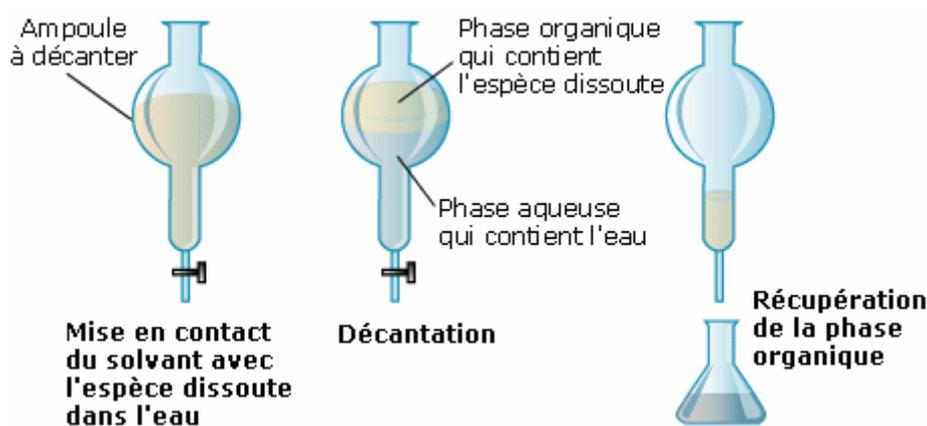


Figure 9. Technique de décantation

Application

Etant miscible à l'eau, l'éthanol ne peut pas être choisi. Pour extraire de l'acide benzoïque de l'eau, il faut donc choisir le dichlorométhane.

V- Séparation à contre-courant

1. Principe

La séparation à contre-courant (Craig 1950) est basée sur la répartition des substances à séparer entre deux phases liquides non miscibles, en les rassemblant dans des fractions distinctes de solvant. La séparation est possible si, pour les solvants choisis, les substances ont des coefficients de partage K_D différents.

$$K_D = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

2. Appareil de Craig

Ce procédé a été optimisé dans l'appareil de Craig. Des dizaines à des centaines de tubes en forme de H sont connectés. La figure suivante montre un tube :

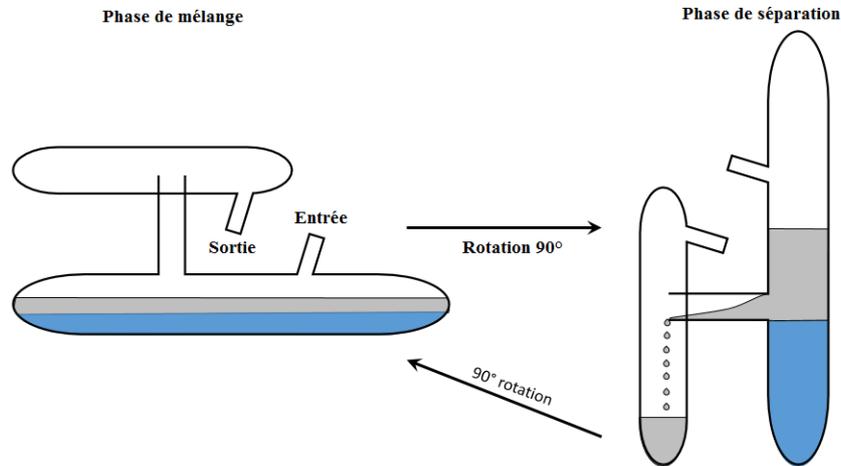


Figure 10. Schéma de l'appareil de Craig

Les bras mécaniques mélangent les petits tubes au cours de la phase de mélange et les inclinent pour transférer la phase supérieure dans le petit compartiment du tube en forme de H. Une fois le transfert effectué les tubes sont remis dans leur position initiale. Cette rotation provoque la vidange du petit compartiment dans le tube suivant. Le processus est répété dans tous les tubes simultanément.

Dans un premier temps l'échantillon se trouve dans le premier tube (noté 0) et la phase inférieure est déjà dans tous les tubes :

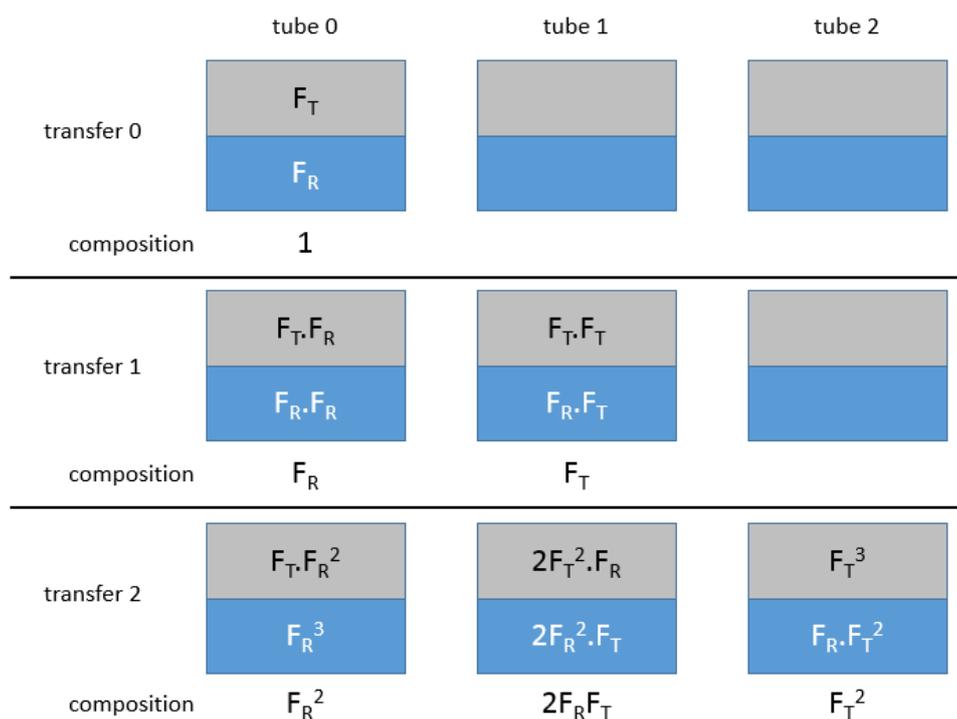


Figure 11. Mécanisme des tubes

Au début tout le substrat est dans le tube 0, la moitié de celui-ci est dans la phase organique et l'autre moitié dans la phase aqueuse. La phase organique est transférée dans le tube 1. On peut définir une fraction F_R restant qui est la fraction de l'échantillon qui reste dans le tube lors d'un transfert et une fraction de transfert F_T qui est la fraction qui est transférée dans le tube suivant. Après le premier transfert il y a F_R dans t_0 et F_T en t_1 . Le tube 0 est maintenant rempli avec le solvant et les tubes sont mélangés.

Après avoir mélangé le tube 0 la fraction restante F_R sera séparée en 2 phases : organique et aqueuse. Dans la phase aqueuse (en considérant que la phase organique est transférée à chaque fois) il restera la fraction restante de la première fraction restante à savoir $F_R \cdot F_R$. Dans la phase organique, il y aura la fraction transférée de la fraction restante à savoir $F_R \cdot F_T$.

Dans le tube 1 la fraction transférée à partir du tube 0 est séparée entre les deux phases. Dans la phase aqueuse il sera maintenant $F_R \cdot F_T$ et dans la phase organique $F_T \cdot F_T$. Une fois que le mélange est effectué, les phases organiques sont transférées sur le tube suivant. Les phases aqueuses restent dans leur tube. F_T^2 est transféré de t_1 à t_2 et $F_R \cdot F_T$ est transféré de t_0 à t_1 . Après le transfert on trouve respectivement dans les tubes 0, 1 et 2, F_R^2 , $2F_R \cdot F_T$ and F_T^2 .

Après trois transferts nous aurions FR_3 , $3F_R^2 \cdot F_T$, $3F_R \cdot F_T^2$ and $3F_R^3$. Vous avez peut-être remarqué que ces valeurs sont les membres d'un exposant d'une somme :

$$(F_R + F_T)^n$$

n étant le nombre de transfert. Dans un tube r donné la fraction est :

$$F_{n,r} = \frac{n!}{r!(n-r)!} F_T^r F_R^{n-r}$$

On peut donc prédire la composition de chaque tube en connaissant le résultat d'une seule extraction. Pour un grand nombre d'extractions nous trouvons l'équation d'une courbe de Gauss.

VI- Extraction par un solide

1. Principe

L'extraction solide-liquide consiste à faire passer une substance d'un solide vers un solvant dans lequel elle est soluble et dont elle sera facilement isolable. Le processus nécessite un long contact du solvant avec le solide préalablement broyé avant extraction.

2. Différentes méthodes

2.1. Extraction discontinue

Elle met en jeu la macération, qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant à température ambiante, à chaud ou à ébullition pour en extraire les constituants solides. Après filtration, on peut répéter l'opération sur le résidu avec une nouvelle portion de solvant. Cette méthode est rapide mais pas toujours très efficace.

2.2.Extraction continue

L'extraction continue est une méthode beaucoup plus longue que l'extraction discontinue, mais plus efficace.

- ◆ Percolation : elle consiste à faire passer lentement un solvant à travers une couche de substance finement pulvérisée, habituellement contenue dans une cartouche de papier poreux et épais ou une pochette de papier filtre. Pour que la durée de contact entre le solvant et l'échantillon soit assez longue, on utilise l'extracteur de Soxhlet.

- ◆ Entraînement à la vapeur et hydrodistillation : ce sont deux techniques basées sur la distillation d'un mélange hétérogène eau-composé organique. Elles sont mises en œuvre pour l'isolement des huiles essentielles des plantes ou d'un composé organique situé dans un milieu hétérogène.

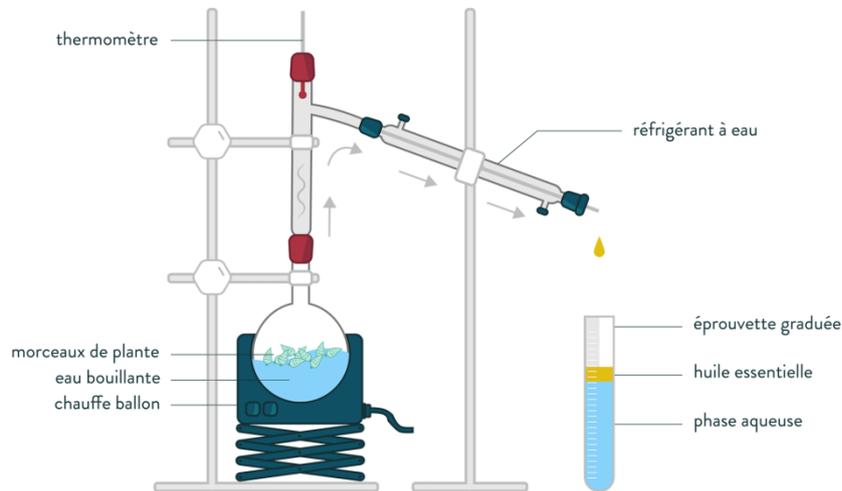


Figure 12. Montage d'hydrodistillation

VII- Séparation par changement d'état

1. Distillation simple

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

Elle nécessite un montage un peu complexe (voir figure 13). Le mélange homogène liquide est chauffé grâce au chauffe ballon jusqu'à atteindre le point d'ébullition du liquide le plus volatile. Ce liquide se vaporise donc et monte le long de la colonne puis la vapeur est condensé (distillat) en passant à l'intérieur du réfrigérant grâce à un circuit externe dans lequel circule en permanence de l'eau fraîche. Le deuxième liquide n'atteint pas sa température d'évaporation et reste sous forme liquide dans le contenant initial (résidu). En contrôlant la température avec un thermomètre en haut de la colonne, on sélectionne les corps que l'on souhaite récupérer dans la fiole placée à la sortie du réfrigérant. Le bulbe du

thermomètre est disposé tout près du tube à dégagement pour mesurer la température de la vapeur à condenser. D'habitude on ajoute au ballon de petits morceaux de pierre ponce pour réguler l'ébullition.

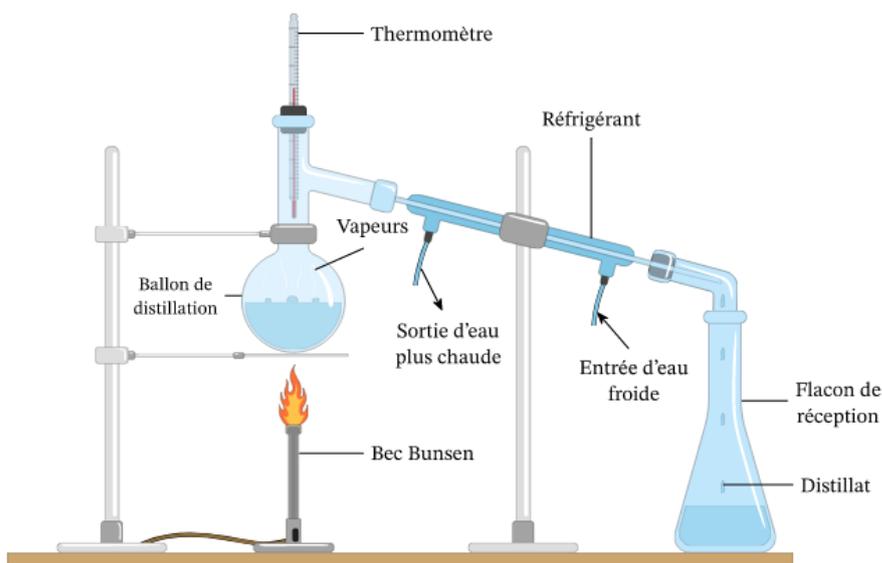


Figure 13. Montage de distillation simple

2. Distillation fractionnée

Par simple distillation, on ne peut séparer de façon satisfaisante un mélange d'eau et d'éthanol. Cela s'explique par la différence relativement faible entre leurs points d'ébullition (100 °C pour l'eau et 78 °C pour l'éthanol). Quand le mélange est chauffé à 78 °C, l'eau et l'alcool s'évaporent tous deux. Cependant, la présence de la colonne de fractionnement fournit des surfaces suffisamment froides pour que le composant le moins volatil de la vapeur, l'eau, s'y condense. Finalement, en théorie, seul le composant le plus volatil, l'alcool, atteint le haut de la colonne et passe dans le réfrigérant. En réalité, de la vapeur d'eau réussit toujours à accompagner l'alcool. En recommençant plusieurs fois à partir du distillat, on arrivera cependant à des concentrations assez fortes en alcool.

3. Sublimation

Cette méthode a été discutée auparavant.

Partie B : Séparation par Chromatographie

On a coutume d'attribuer à Michel Tswett l'invention, peu après 1900, de la chromatographie actuelle. Au travers de ses publications successives, on peut en effet reconstituer sa démarche intellectuelle qui en fait un pionnier, si ce n'est l'inventeur, de cette importante méthode séparative. Son domaine de recherche était lié à la biochimie des plantes.

A son époque on savait extraire avec de l'éthanol la chlorophylle et les autres pigments des plantes vertes, souvent des feuilles. En évaporant ce solvant, il restait un extrait noirâtre qui pouvait être redissous dans bon nombre d'autres solvants et en particulier dans l'éther de pétrole (on dirait maintenant des solvants polaires ou non polaires). Cependant on ne comprenait pas bien pourquoi ce dernier solvant était incapable d'extraire directement la chlorophylle des plantes. Tswett émit l'hypothèse que dans les plantes la chlorophylle devait être retenue par des forces qui la fixait sur la cellulose, empêchant ainsi l'éther de pétrole de l'extraire. Il entrevoyait ici le principe de l'adsorption. Pour tester cette hypothèse il eut l'idée de dissoudre l'extrait de pigments dans l'éther de pétrole et d'ajouter du papier filtre (cellulose), comme succédané du tissu des feuilles. Il s'aperçut alors que le papier captait la teinte et qu'en ajoutant de l'éthanol au mélange on pouvait ré-extraire ces mêmes pigments. En prolongement de ce travail, il décida de faire des essais systématiques avec toutes sortes de poudres dont il pouvait disposer. Pour gagner du temps, il avait réalisé un montage qui lui permettait de faire plusieurs essais simultanément.

Il plaçait les poudres à tester dans les tubes et il ajoutait à chacun d'eux une solution des pigments dans l'éther de pétrole. Cela lui permit d'observer que dans certains tubes les poudres laissaient apparaître des anneaux superposés aux couleurs différentes, ce qui témoignait que la force de rétention variait avec la nature des pigments présents. En rinçant les colonnes avec des solvants différents, il put recueillir séparément certains de ces constituants. La chromatographie moderne était née. C'est un peu plus tard, en 1906, qu'il rédigea la publication (parue dans Ber. Dtsch. Botan., Ges.), dans laquelle il écrivit le paragraphe le plus souvent cité : « Comme les radiations lumineuses dans le spectre, les différents composants d'un mélange de pigments, obéissant à une loi, se trouvent séparés sur la colonne de carbonate de calcium et peuvent ensuite être déterminés qualitativement

et quantitativement. In s'appelle une telle préparation un chromatogramme et la méthode correspondante la méthode chromatographique ».

I. Chromatographie CCM

Il existe plusieurs variantes de la chromatographie sur papier :

1/ Chromatographie ascendante.

2/ Chromatographie descendante.

3/ Chromatographie circulante.

4/ Chromatographie à deux dimensions.

Les deux premières ne diffèrent que dans la manière dont se déplace le solvant le long du papier filtre.

- dans le premier cas, le solvant se déplace par capillarité de bas en haut le long de la bande de papier ;

- dans le second cas, il se déplace de haut en bas par capillarité et par gravité ;

- dans la chromatographie circulaire, la feuille de papier est un disque, et c'est du centre du disque que le solvant se déplace en cercle concentrique (photo n° 8).

- la chromatographie à deux dimensions consiste à effectuer successivement deux chromatographies, ascendantes ou descendantes, faisant entre elles un angle de 90°.

Après avoir expérimenté ces différentes variantes, nous avons choisi d'appliquer la chromatographie ascendante. D'une part, les résultats qu'elle permet d'obtenir diffèrent très peu de ceux que donnent les autres variantes et, d'autre part, c'est celle qui exige l'appareillage le plus simple et le moins onéreux.

Technique d'utilisation

On dépose tout d'abord une goutte ou une traînée de la solution contenant le ou les éléments à rechercher à 3 cm de l'extrémité d'une bande de papier filtre.

L'endroit où l'on dépose la solution aura été au préalable matérialisé par un trait de crayon. Du papier Whatman n° 1 est utilisé pour cette chromatographie.

Il est préféré de déposer la solution sous forme d'une traînée perpendiculaire à la bande. En effet, l'expérience nous a montré que l'on obtenait ainsi des séparations plus nettes que lorsque l'on déposait des gouttes. La bande de papier est alors introduite dans la cuve, comme le montre la figure 14. La partie supérieure de la bande est accrochée au support de verre fixé au couvercle, et la partie inférieure mise en contact avec le solvant. On aura soin d'accrocher la bande de telle façon que l'endroit où l'on a déposé la goutte de solution ne soit pas directement en contact avec le solvant, pour ne pas contaminer ce dernier.

Le solvant mouille le papier et, par capillarité, progresse le long de la bande en entraînant à des vitesses différentes les éléments contenus dans la solution. Lorsque l'on décide d'arrêter l'expérience, on retire la bande de papier de la cuve, et après avoir noté au crayon l'endroit où s'est arrêté le solvant, on la fait sécher.

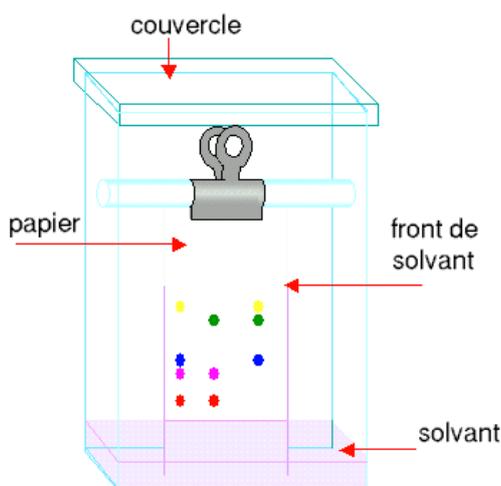


Figure 14. Chromatographie sur papier

Généralement, le temps nécessaire pour parcourir cette distance varie avec la nature du solvant. Lorsque la bande est sèche, on pulvérise sur les deux faces du papier une solution d'un réactif approprié qui donne une coloration caractéristique avec les éléments à rechercher.

Pour évaluer la valeur du R_f d'un élément, il suffira d'appliquer la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le centre de la zone}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

Pour un élément déterminé, on connaît la valeur de son R_f dans un solvant donné. En chromatographie sur papier, il est utile de connaître la valeur du R_f d'un élément, lorsque l'on ne possède pas de réactif spécifique pour le révéler, car c'est elle qui permettra de la localiser et de la différencier des autres éléments.

II. Chromatographie sur colonne par gravité

1. Introduction

La chromatographie sur colonne est basée sur le même principe que la chromatographie sur couche mince, sauf que la silice ne se trouve pas sur une plaque mais dans une colonne. Cette technique est très utilisée dans la purification en chimie organique. La séparation des composés est provoquée par l'écoulement continu d'un éluant passant dans la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. Les composés sont entraînés par l'éluant à des vitesses différentes en fonction de leurs affinités avec la silice et avec l'éluant. Ce procédé permet de séparer les différents composants d'un produit mais aussi de purifier le produit d'une réaction.

2. Préparation de la colonne

Plusieurs choix sont à faire en fonction de la quantité de produit et de l'aspect de la CCM :

- Diamètre de la colonne
- Hauteur de silice

Masse de produit	Masse de silice	Diamètre de la colonne	Hauteur de silice
15 – 500 mg	15 g	30 mm	45 mm
500 mg – 3 g	30 g	40 mm	50 mm
3 – 15 g	100 g	70 mm	55 mm

3. Présentation du matériel

Nous avons ici besoin de ces différents éléments :

- Pot silice,
- les deux éluants : eau salée à 40g/L, puis éthanol,
- entonnoir,
- sable et coton,
- colonne en verre,
- béchers,
- pipettes pasteur, propipettes, verre à pied,
- solution contenant le mélange sirop menthe,
- support et tubes à essai,
- laine verte (contenant les colorants).

Revenons sur quelques-uns de ces éléments :

- Le pot de silice : il contient la phase stationnaire finement divisée à introduire dans la colonne, car toute séparation chromatographique implique l'écoulement d'une phase mobile au contact d'une phase stationnaire de grande surface.
- La colonne en verre : selon la quantité de produits à séparer et la qualité de la séparation, on choisira des colonnes de diamètre et de longueur plus ou moins importants.
- Les colorants du sirop de menthe ont été extraits à l'aide d'un morceau de laine préalablement lavé en milieu basique dans une solution d'ammoniac à 1% d'ammoniaque, puis rincé à l'eau. L'extraction se fait en milieu acide à l'aide d'acide acétique dilué, et le relargage s'effectue en milieu basique dans la solution ammoniacale à 1%.

4. Mise en place du matériel

La réalisation d'une colonne impose de respecter certaines règles qui permettront une séparation efficace.

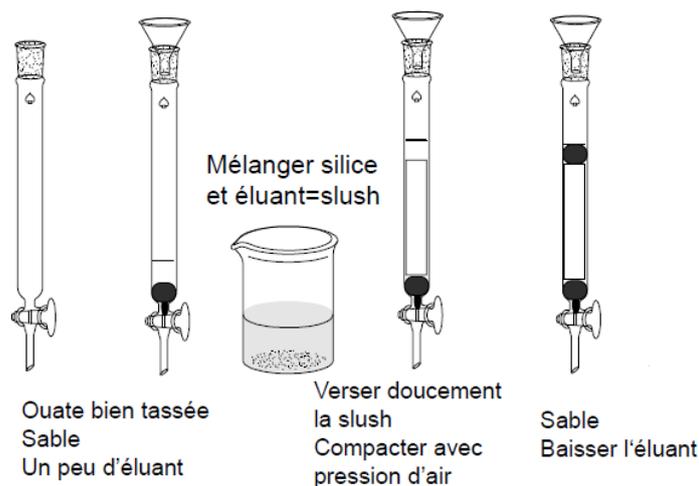


Figure 15. Préparation de la colonne

On place tout d'abord un morceau de coton au fond de la colonne que l'on recouvre d'éluant, afin d'éliminer l'air emprisonné dans le coton. On rajoute un demi centimètre du sable environ au-dessus du coton, afin que la phase stationnaire ne puisse pas s'échapper de la colonne. On considérera ici que le sable n'a pas de propriétés adsorbantes.

Enfin, on remplit la colonne avec la phase stationnaire en réalisant une suspension de silice dans le premier éluant qui est l'eau salée. Le gel ainsi formé est introduit dans la colonne grâce à l'entonnoir. On rince avec l'éluant et on le laisse s'écouler.

Une fois la colonne remplie, on rajoute un demi centimètre de sable en tête de colonne au-dessus de la surface de silice, après s'être assuré que cette dernière était plane. Cette couche permet de réaliser des dépôts et d'ajouter de l'éluant sans perturber la surface de silice, ce qui empêcherait une bonne séparation. On s'assure régulièrement de ne pas assécher la phase stationnaire, en vérifiant qu'il reste toujours de l'éluant au niveau du sable.

5. Réalisation de l'expérience

On amène le niveau d'éluant au niveau de la surface du sable. On peut alors déposer délicatement la solution de colorants en haut de colonne à la pipette Pasteur afin de ne pas perturber la surface de silice.

On ouvre le robinet pour que les colorants arrivent au niveau de la silice. On rajoute quelques millilitres d'éluant et on ouvre de nouveau le robinet afin de s'assurer que toute la solution soit en tête de la colonne de silice.

On peut alors ajouter l'éluant. Les premiers millilitres doivent toujours être ajoutés avec précaution à la pipette pasteur afin de ne pas perturber la surface de silice. Ensuite, on peut ajouter l'éluant plus rapidement en le versant directement dans la colonne.

L'éluant utilisé ici dans un premier temps est l'eau salée, il permet l'élution de la tartrazine, alors que le bleu patenté V reste fortement retenu par la silice. Après avoir récupéré la tartrazine, on change d'éluant pour récupérer le bleu patenté.

On utilise ici de l'éthanol. En effet, la tartrazine a peu d'affinité pour la silice par rapport à l'éluant, qu'on utilise l'eau salée ou l'éthanol. C'est pourquoi elle est entraînée facilement. Par contre, le bleu patenté V développe plus d'interaction avec la silice que la tartrazine, et l'eau salée n'est alors pas un éluant capable de l'entraîner, contrairement à l'éthanol.

Le bleu patenté est entraîné par la phase mobile, et il est récupéré dans un autre tube. Il est souvent utile de réaliser des chromatographies sur couche mince sur chaque tube pour vérifier où sont les composés à séparer, dans le cas où ceux-ci ne sont pas colorés.

III. Chromatographie HPLC

1. Introduction

Parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) est la plus connue. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire. L'efficacité des colonnes est moindre qu'en CPG, mais l'utilisation de phases chirales ou des nouvelles phases stationnaires opérant suivant plusieurs modes, les techniques par appariement d'ions ainsi que d'interaction hydrophobe accroissent encore plus les possibilités de la CLHP. Enfin la miniaturisation de la technique (nanochromatographie) a facilité son association avec la spectrométrie de masse.

2. Origine

La *chromatographie liquide haute performance*, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les

performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

Ces phases, constituées de la réunion de micro-particules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 micromètres ou de matériaux monolithiques poreux conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable. Pour marquer cette particularité de la technique, la lettre P du sigle CLHP a pendant longtemps correspondu au mot *pression*.

3. Conception générale d'un appareil de CLHP

Une installation de CLHP comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement (figure ci-dessous).

Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK® (ou polyether-etherketone), un polymère souple et coloré qui résiste aux solvants usuels, même sous des pressions élevées (350 bars).

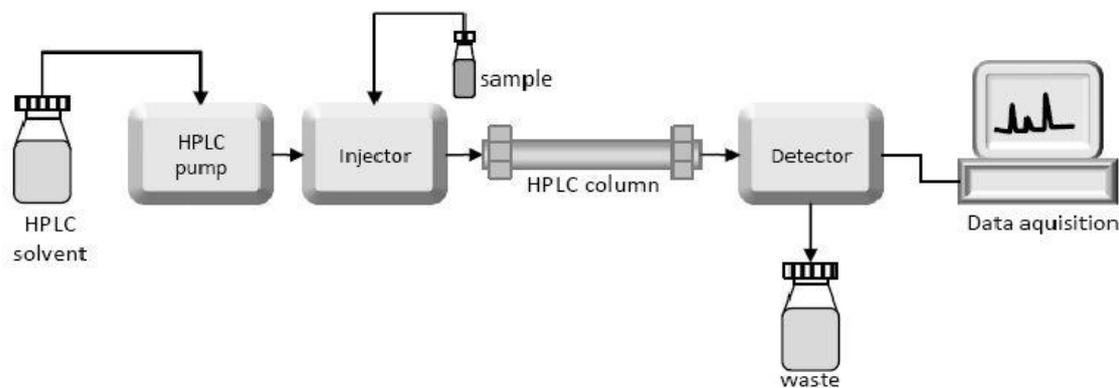


Figure 16. Différents compartiments d'un appareil HPLC

4. Pompes et gradients d'élution

4.1 Pompes pour éluants

Toute installation de CLHP comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars) selon le débit imposé à la phase mobile ou sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire.

On utilise des pompes conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable, même si la composition de la phase mobile varie. Ces pompes *débitométriques* comportent généralement deux pistons en série fonctionnant en opposition pour éviter les interruptions de débit dues au remplissage du cylindre (fig.).

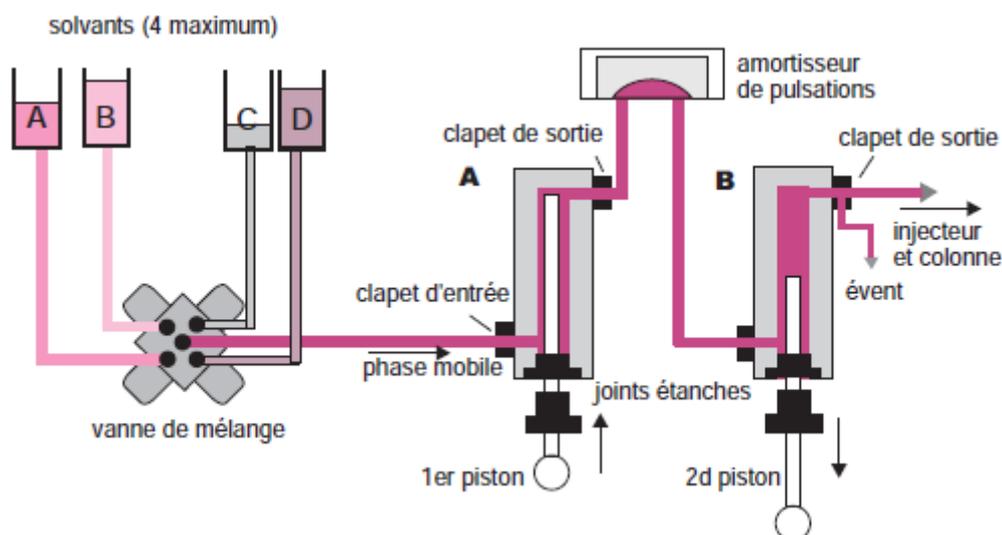


Figure 17. Principe de fonctionnement d'une pompe à deux têtes en série.

Partant de l'instant où le clapet de sortie du cylindre A vient de se fermer et le clapet d'entrée vient de s'ouvrir, le piston de A recule pour remplir la chambre A. Pendant ce temps le cylindre B est ouvert et le piston de B avance pour chasser la phase mobile vers la colonne. Le volume déplacé par le piston de B est deux fois plus petit que le volume aspiré par le piston de A. Arrivé au fond de sa course, le clapet d'entrée de A se ferme et le clapet de sortie s'ouvre.

Le piston de A avance et chasse le contenu du cylindre A. Ce volume pour moitié est expulsé vers la colonne, l'autre moitié servant à remplir le cylindre B dans sa phase de recul. Entre les deux cylindres est placé un amortisseur de pulsations.

- La présence, dans les solvants, des gaz ambiants (N_2 , O_2 , CO_2 ...), dissous en quantité

non négligeable, peut perturber les séparations par modification de la compressibilité des éluants et formation éventuelle de bulles. En outre le dioxygène abrège la vie des colonnes et est gênant pour les détecteurs électrochimiques ou photométriques UV. Il est donc préférable de dégazer les solvants, soit avec des ultrasons soit par barbotage d'hélium, soit par diffusion en les faisant passer dans un long tube de petit diamètre en polymère perméable aux gaz.

- Pour parfaire la régulation du débit, on intercale entre la (ou les) pompe(s) et l'injecteur un amortisseur de pulsations fonctionnant suivant le principe mécanique du ballastage. Le montage le plus simple consiste à intercaler dans le circuit de la phase liquide un tube de faible section de plusieurs mètres de long, enroulé sur lui-même. Sous l'effet de l'onde de pression de solvant envoyée par la pompe, le tube se déplie légèrement ce qui augmente son volume interne et par là, contrecarre la variation de pression.



Figure 18. Matière précieuse de laquelle les pistons sont fabriqués

- Pour obtenir les micro-débits ($1 \mu\text{L}/\text{min}$, par exemple) nécessaires aux colonnes capillaires remplies, on utilise les mêmes pompes en ajoutant à la sortie un by-pass pour diviser le débit en deux fractions dont seule la plus petite est dirigée vers la colonne. Par ailleurs pour résister aux pH acides de beaucoup de mélanges d'élution, qui sont d'autant plus corrosifs que la pression est plus grande, les pièces et revêtements au contact de la phase mobile doivent être inertes. Ainsi les pistons ou clapets des pompes sont en téflon ou alliages spéciaux et souvent même en pierres précieuses, saphir ou agate.

5. Injecteurs

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne (figure). Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser $30\,000 \text{ kPa}$. Elle fonctionne en deux temps :

- Dans la position chargement, où seule la communication entre pompe et colonne est assurée, l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle. Celle-ci, dont il existe tout un choix de volumes, est soit extérieure, soit intégrée dans le corps de la vanne.

- Dans la position *injection*, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle.

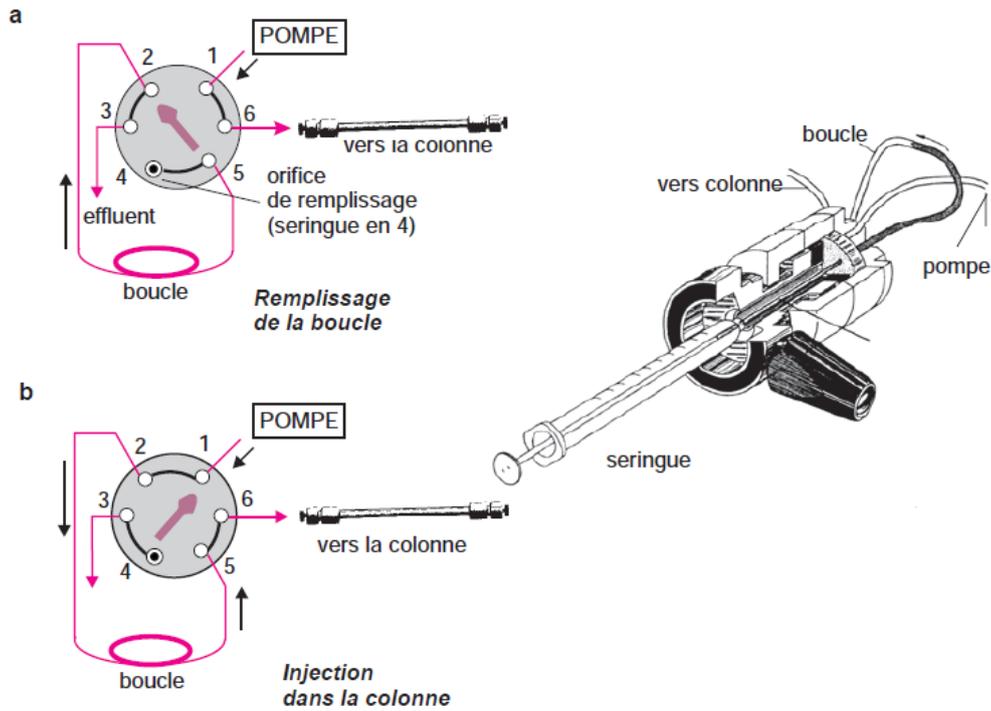


Figure 19. Injection avec boucle



Figure 20. Injecteur avec boucle

6. Colonne

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Les colonnes « standard » dont le diamètre interne (DI) est d'environ 4,5 mm et la longueur de 10 cm (fig.), sont de plus en plus supplantées par des colonnes de plus faibles diamètres, baptisées *narrow-bore* (DI 2-4 mm), *micro-bore* (DI 1-2 mm), *capillaires remplies* (DI 0,1-1 mm). Ces modèles sont apparus suite à l'évolution des phases stationnaires customisées et pour simplifier les problèmes de couplage avec la spectrométrie de masse (technique couplée CLHP/SM).

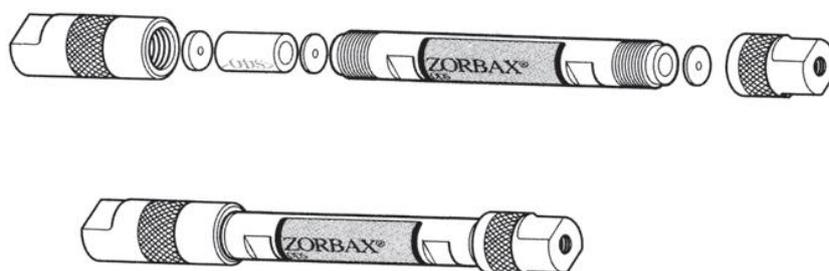


Figure 21. Colonne standard et pré-colonne de CLHP.

Toute application en chromatographie correspond avant tout à une séparation. La colonne doit donc avoir une efficacité suffisante, sans pour autant qu'il soit utile d'avoir des performances plus que nécessaires. Une colonne courte permettra d'aller plus vite. Une colonne étroite se traduira par une économie de phase mobile. Ainsi pour une colonne standard, le débit est de l'ordre de 1 ml/min, alors qu'il tombe à quelques ml/min pour une colonne micro-bore, ce qui nécessite des pompes et des détecteurs adaptés – quelques gouttes suffisant pour éluer tous les composés.

La colonne est souvent précédée d'une pré-colonne, dite colonne de garde, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés. On augmente ainsi la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances.

Les écarts de température modifiant les temps de rétention, les appareils actuels permettent de thermostatier la colonne et l'éluant, à la fois pour assurer la répétitivité des analyses et pour faire intervenir éventuellement la température comme paramètre de séparation.

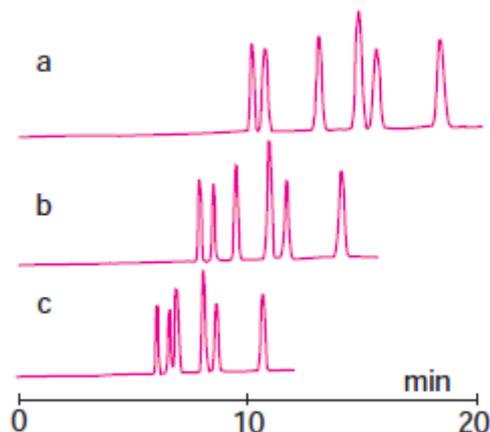


Figure 22. Effet de la température de la colonne sur une séparation
Exemple relatif à trois essais effectués sur un même mélange et avec un même débit de phase mobile à des températures différentes (a) 25°C, (b) 35°C et (c) 45°C.

7. Phases stationnaires

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par voie de conséquence d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées. Pour raccourcir les temps d'analyse, il faut tenter d'accélérer dans la colonne les transferts entre les phases mobile et fixe.

1.1. Le gel de silice, matière de base des phases actuelles

Parmi tous les matériaux qui ont été ou sont actuellement utilisés pour la confection des phases stationnaires, le gel de silice tient une place prépondérante.

Ce matériau de base est un solide amorphe ayant pour formule de composition $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$ (avec n très proche de 0). Il est tout à fait différent de la silice naturelle cristalline (SiO_2) qui n'est qu'un précurseur très éloigné de sa préparation. Cette dernière fait appel à des procédés de polymérisation *sol-gel* d'un tétraalcoxysilane (ex. tétraéthoxysilane) au sein d'un liquide, sous l'effet d'une hydrolyse catalysée (figure).

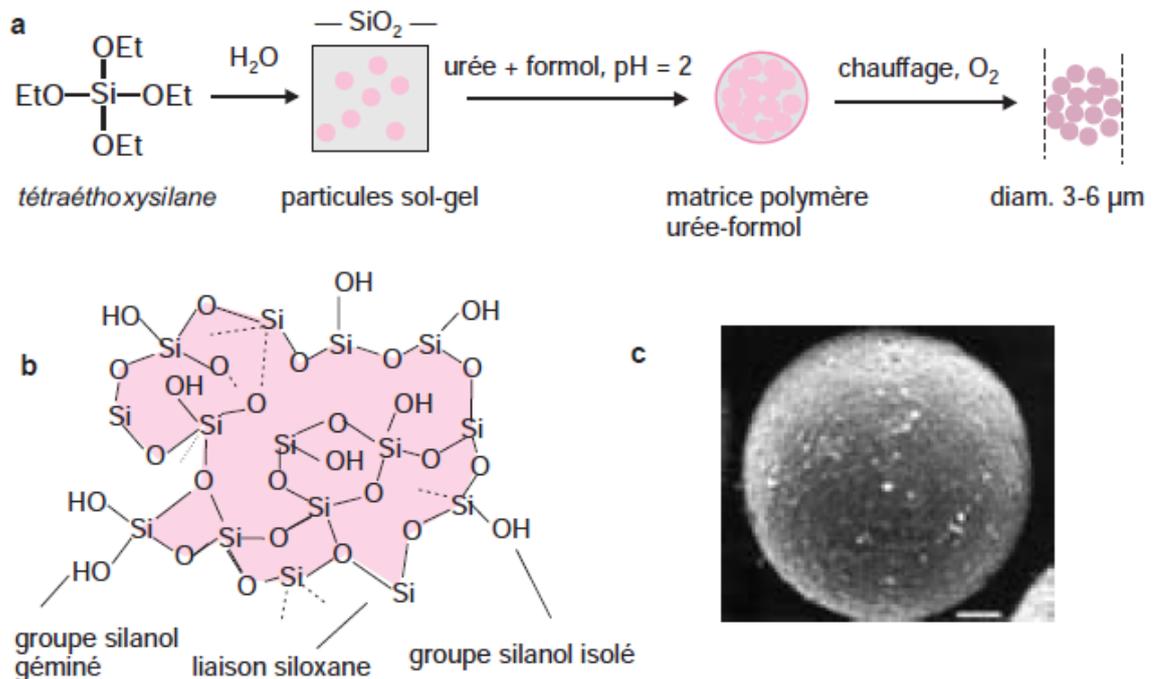


Figure 23. Le gel de silice pour chromatographie.

a) préparation de grains sphériques de gel de silice via un sol-gel. La dispersion, appelée sol, constituée de particules sphériques de quelques nm de diamètre, s'agglutine en présence d'un liant organique urée/formol jusqu'à atteindre la taille voulue (3-7 μm).

Le traitement final consiste en une pyrolyse pour éliminer la matrice organique. b) représentation du réseau, correspondant à un maillage tridimensionnel, d'un gel de silice porteur de groupements silanols. c) image d'une particule sphérique de gel de silice issu d'un assemblage compact de sphères submicroniques.

Le gel de silice n'a pas la structure ordonnée de la silice cristalline, mais il reste néanmoins bâti autour de l'agencement tétraédrique des quatre liaisons issues de l'atome de silicium. C'est un polymère inorganique réticulé. Il comporte des groupements silanols, Si-OH en nombre variable, qui ont résisté à la phase finale de déshydratation thermique.

Ces groupements sont responsables des propriétés catalytiques acides de ce matériau très polaire car Si-OH a un pK de 10, comparable à celui du phénol.

Le gel de silice comporte des pores de tailles différentes. Pour remplir la colonne d'une manière homogène, il est préparé sous forme, soit de microparticules sphériques, soit d'un monolithe poreux (figure). Il est nécessaire en effet d'éviter la formation de chemins préférentiels pour la phase mobile et par suite pour les composés qui y sont dissous.

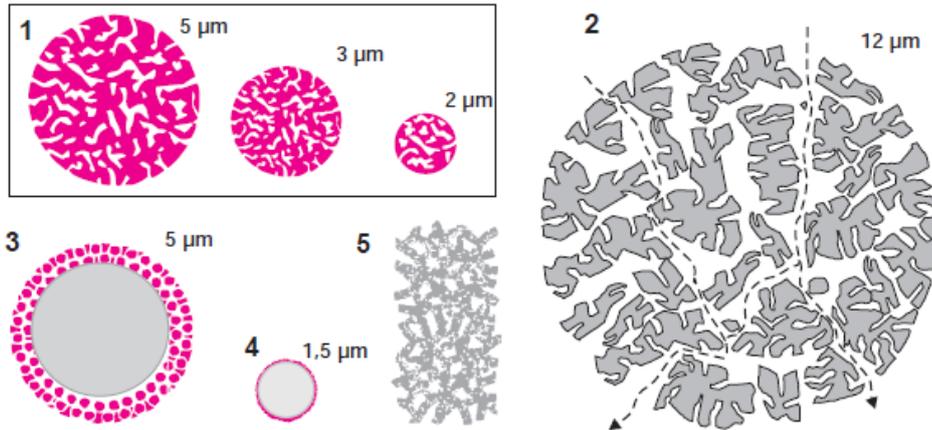


Figure 24. Représentations imagées de quelques types de gels de silice (porosité et dimensions).

- Les micro-sphères ont un diamètre constant dans une même colonne mais il en existe plusieurs types allant de 1 à 12 mm.
- Les monolithes, apparus plus récemment, sont ainsi nommés parce qu'il s'agit d'un gel de silice formé d'une seule pièce dans la colonne même. La reproductibilité des caractéristiques de ce second type de colonne est plus difficile à maîtriser.

1.2. Les silices greffées

Bien qu'ayant une capacité d'adsorption élevée, le gel de silice décrit précédemment n'est plus utilisé tel quel en chromatographie analytique. Hydrophile par nature, ses caractéristiques évoluent au cours du temps, entraînant un manque de reproductibilité des séparations.

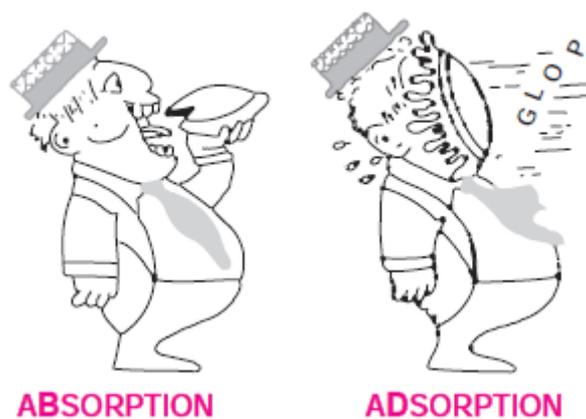


Figure 25. Phénomènes d'adsorption et de partage

Pour diminuer sa polarité jugée excessive dans de nombreux cas on le rend essentiellement hydrophobe.

Les modifications classiques mettent à profit la réactivité des fonctions silanols présentes en surface pour fixer des molécules organiques par des liaisons covalentes. Le gel de silice ainsi modifié devient assimilable à un liquide immobilisé, la séparation mettant en jeu les *coefficients de partage* et non plus les *coefficients d'adsorption*. Ces phases greffées, dont la polarité peut être ajustée avec précision, sont à l'origine de la *chromatographie de partage à polarité de phase inversée*, utilisée dans quasiment toutes les séparations.

8. Chromatographie chirale

Un composé moléculaire organique dont la formule développée révèle l'existence d'un centre d'asymétrie, conduit généralement à notre échelle, dite macroscopique, à un mélange en quantités variables des deux énantiomères possibles R et S. Si on chromatographie ce composé sur une colonne dont la phase stationnaire est chirale, c'est-à-dire possédant des centres d'asymétrie identiques et correspondant à un seul énantiomère (R ou S), on observe sur le chromatogramme deux pics (figure). Ces pics résultent des interactions réversibles notées ici R (composé)/R(phase stat.) et S (composé)/R (phase stat.) dont les stabilités sont légèrement différentes. Les aires sont proportionnelles à l'abondance de chacune des deux formes R et S.

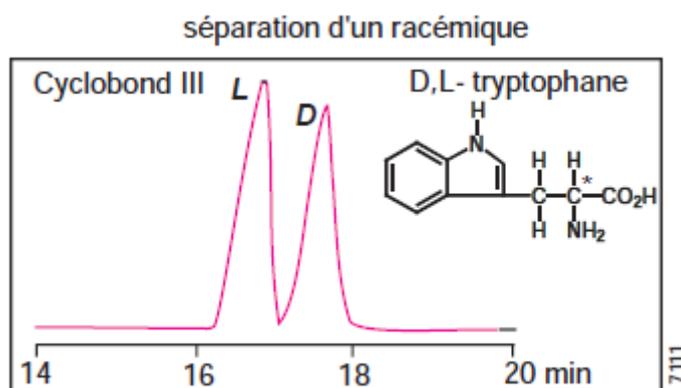


Figure 26. Séparation d'un racémate sur phase stationnaire chirale

On appelle **pureté optique** de l'analyte, son excès énantiomérique (e.e), calculé à partir de la relation suivante où S_R et S_S désignent les aires des pics des deux énantiomères

$$: \quad \text{Pureté optique (e.e. \%)} = 100 \frac{|S_R - S_S|}{S_R + S_S}$$

9. Phases mobiles

Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire et vice-versa. La chromatographie est dite *en phase normale* dans le premier cas et à *polarité de phase inversée* (R-HPLC) dans le second.

Sachant que la plupart des applications actuelles font appel à des gels de silice transformés, peu polaires, de nature plutôt hydrophobe, on choisit comme phases mobiles des mélanges d'eau et d'un modifiant tel le méthanol ou l'acétonitrile. En changeant la composition de la phase mobile, donc sa polarité, on agit par l'intermédiaire des coefficients de distribution K (C_S/C_M) sur les facteurs de rétention k des composés. La difficulté pour le chromatographe est de faire le bon choix en fonction des composés à séparer.

Avec une phase stationnaire dont la partie active ressemble à une couche paraffinique, l'ordre d'éluion est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. En revanche, les composés polaires sont assez difficiles à séparer entre eux. Il faut réaliser des gradients d'éluion en diminuant progressivement au cours du temps la concentration en eau (polaire) au profit du modifiant choisi (moins polaire). On commencera par exemple avec un mélange 80/20 % eau/acétonitrile pour terminer à la composition de 40/60 %. C'est le domaine de la chromatographie d'interaction hydrophile.

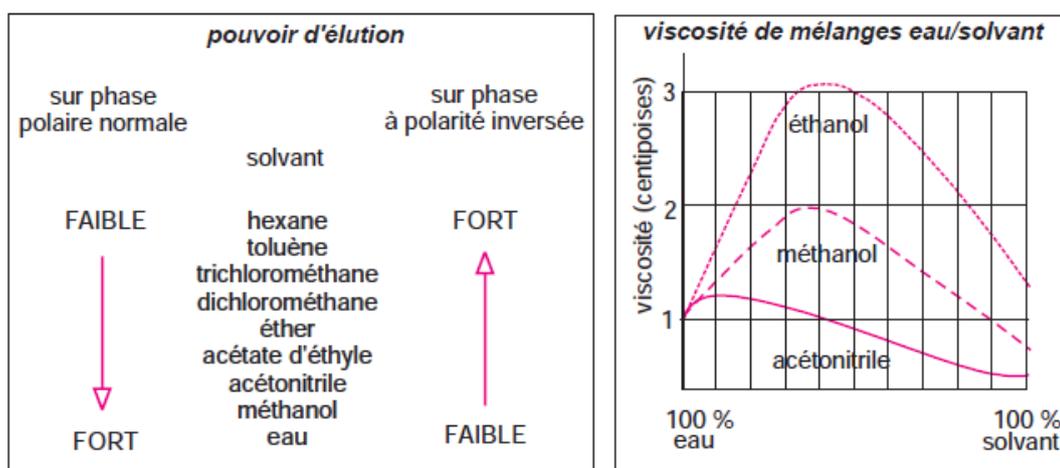


Figure 27. « Force » des solvants utilisés comme phases mobiles

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile. On notera que la viscosité, donc la pression en tête de colonne varie selon la composition de la phase mobile.

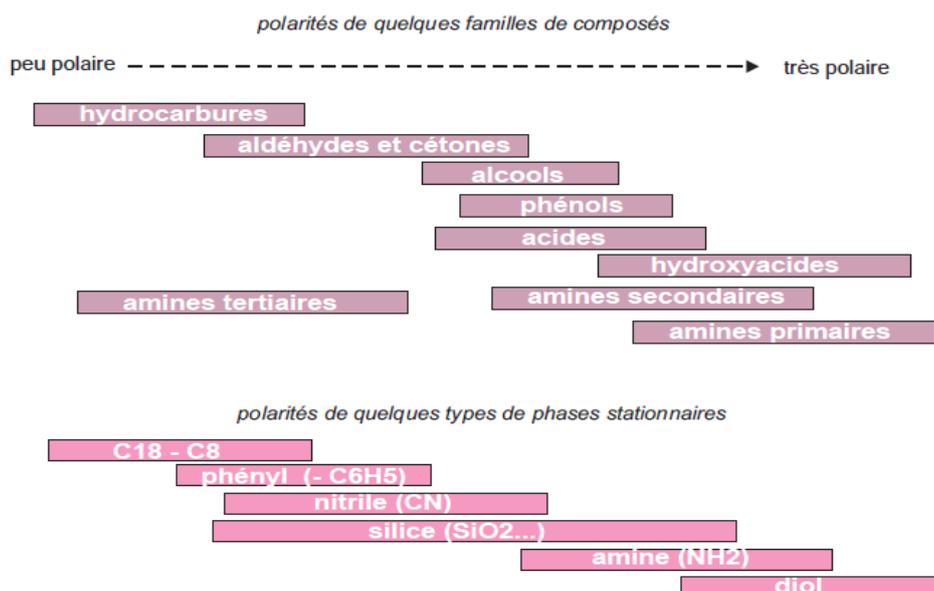


Figure 28. Polarités de quelques familles de composés organiques ainsi que des principaux types de greffons des phases stationnaires actuelles

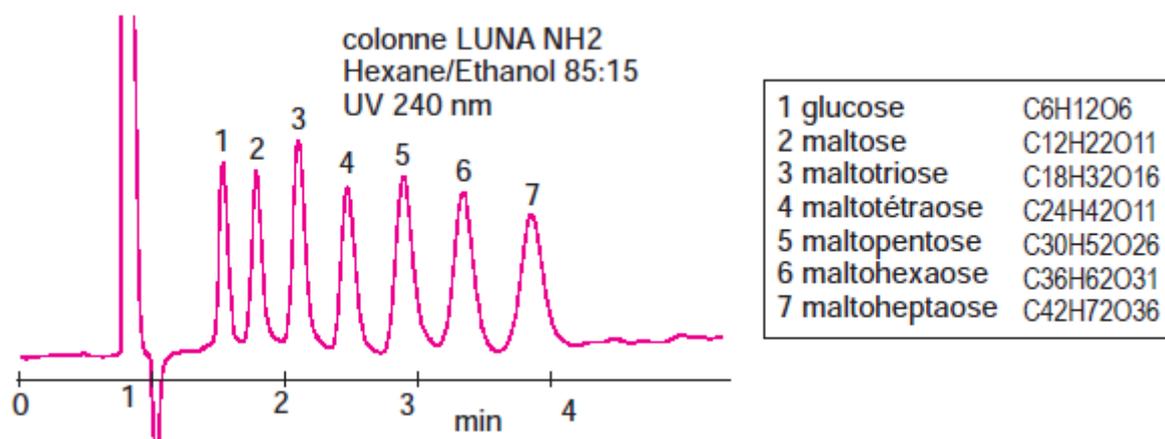


Figure 29. Séparation de sucres sur une phase « amine »

La séparation des composés très polaires sur les phases stationnaires de type RP-18 impose l'usage d'une phase mobile très riche en eau. Dans ces conditions, il arrive que la phase stationnaire, qui est hydrophobe, devienne subitement non mouillable. La séparation devient mauvaise. C'est pourquoi on choisit de préférence des phases présentant une polarité résiduelle pour maintenir l'interaction entre les analytes et l'eau de la phase mobile.

IV. Chromatographie CPG

1. Introduction

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles de plus de 60 ans. Son développement qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent encore plus son intérêt. La séparation sur la colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. C'est sans doute la principale contrainte à laquelle il faut penser avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et suffisamment volatils. La très grande sensibilité des détecteurs permet de déceler des quantités de l'ordre du picogramme pour certains composés. Les applications sont très nombreuses dans tous les domaines et les développements de la chromatographie gazeuse à grande vitesse ou multidimensionnelle rendent cette technique toujours plus attractive.

2. Principe d'une installation de CPG

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



Figure 30. Enceinte de CPG thermostaté

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire. Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre. Certains modèles de chromatographes ont une alimentation autonome ainsi qu'une taille réduite pour faciliter l'emploi en milieu extérieur, sur le terrain (figure 31).



Figure 31. Chromatographe miniaturisés

En CPG il y a quatre paramètres opérationnels pour une phase stationnaire donnée : L, longueur de la colonne et u , vitesse de la phase mobile (qui conditionnent N), T température de la colonne et β rapport de phase (qui conditionnent k). Les réglages du chromatographe permettent d'agir sur T et sur u , donc sur l'efficacité et sur les facteurs de rétention.

3. Gaz vecteur et régulateur de débit

On utilise comme phase mobile l'un des trois gaz suivants : l'hélium, le diazote ou le dihydrogène. Ils proviennent soit d'un cylindre sous pression soit d'un générateur (électrolyse de l'eau pour H_2 et séparation de l'air pour N_2), ce qui a l'avantage de fournir sur place un gaz très pur. Ce gaz vecteur doit être exempt de traces d'hydrocarbures, de vapeur d'eau et de dioxygène qui se comportent comme des impuretés préjudiciables pour certaines phases stationnaires polaires et qui réduisent la sensibilité des détecteurs. C'est la raison pour laquelle on place un double filtre, desséchant et réducteur, juste en amont du chromatographe.

La nature du gaz vecteur ne modifie pas de manière significative les valeurs des coefficients de distribution K des composés par suite de l'absence d'interaction entre gaz et solutés, la température étant le seul facteur de modification important. En revanche, la viscosité et la vitesse du gaz dans la colonne ont une influence sur la dispersion des composés dans la phase stationnaire et sur la diffusion dans la phase mobile, donc sur le paramètre d'efficacité N et sur la sensibilité de la détection (figure 32).

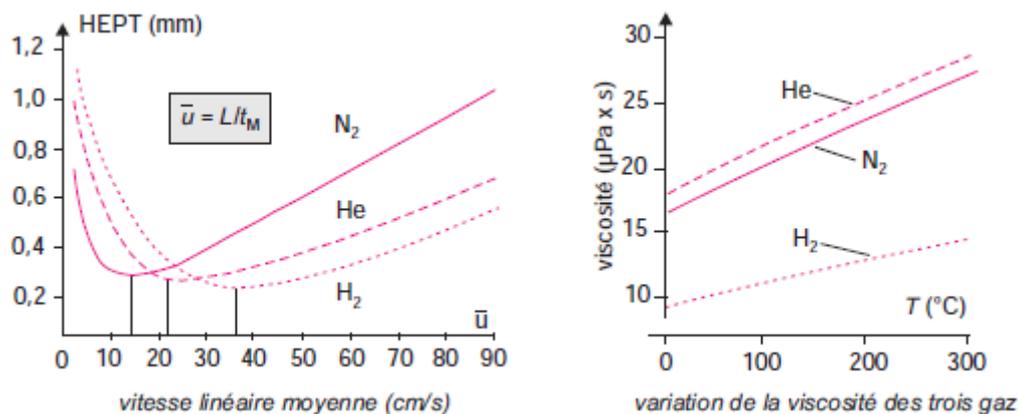


Figure 32. Efficacité en fonction de la nature et de la vitesse linéaire du gaz vecteur

Ces courbes typiques de Van Deemter montrent que l'hydrogène est, parmi les 3 gaz étudiés, celui qui permet les séparations les plus rapides, à performances égales, tout en donnant plus de souplesse en ce qui concerne le débit, ce qui est très utile en mode programmation de température. Noter l'augmentation de la viscosité de ces gaz avec la température T. On constate aussi que l'hélium est plus visqueux que le diazote, à température égale.

L'efficacité d'une colonne de chromatographie peut s'exprimer par le nombre N de plateaux théoriques qu'elle possède. Plus le nombre de plateau est élevé, plus la colonne est efficace.

On définit également la hauteur équivalente de plateaux théoriques (HEPT) :

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

Avec L la longueur de la colonne. Plus la hauteur de plateau H est faible, plus la colonne est efficace.

4. Introduction de l'échantillon et chambre d'injection

4.1. Introduction de l'échantillon

Une très petite quantité d'échantillon en solution (ex. 0,5 μL), est introduite dans l'appareil avec une microseringue (figure) dont il existe de nombreux modèles adaptés aux divers injecteurs et colonnes.



Figure 33. Seringue de 10 μL d'un type courant, utilisé en CPG

Un guide évite de tordre le piston, très fragile. Dans d'autres modèles (0,5 à 1 μL), le piston rentre dans l'aiguille pour libérer la totalité de l'échantillon et éviter tout volume mort (reproduit avec l'autorisation de la société Hamilton).

Pour les échantillons gazeux on utilise des vannes à boucles semblables à celles que l'on rencontre en chromatographie liquide. Pour mieux maîtriser la reproductibilité des injections – le simple changement d'opérateur pouvant conduire, en mode manuel, à des différences –, on adapte presque toujours un injecteur automatique grâce auquel les mouvements de la seringue sont automatisés. Associé à un carrousel porte-échantillons, il devient possible de programmer la séquence cyclique de prélèvement de l'échantillon, de son introduction très rapide dans l'injecteur (0,2 s) et du rinçage de la seringue. Cette dernière phase est importante pour éviter les contaminations d'un échantillon à l'autre lorsqu'il s'agit de dosages enchaînés de manière automatique.

Une technique d'échantillonnage connue sous le nom de « Headspace », dont il existe deux variantes, dites statique et dynamique, est très répandue en CPG pour faire l'analyse qualitative des constituants volatils des échantillons.

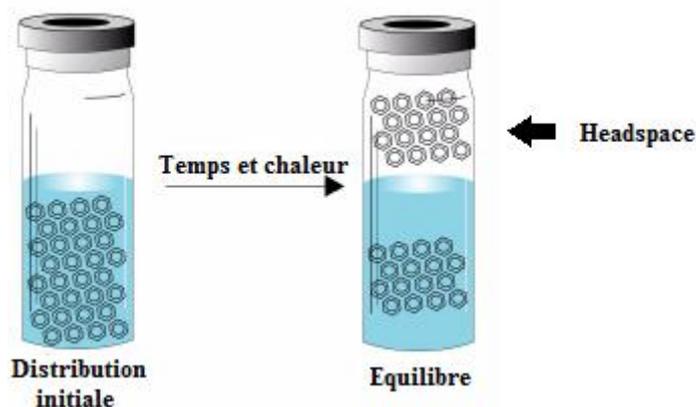


Figure 34. Technique dite « Headspace »

4.2. Injecteurs

L'injecteur est la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe. Il a deux autres fonctions : vaporiser et entraîner en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur. Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes auxquels ils sont réunis. La qualité des séparations dépend de cette phase de l'analyse.

Injecteur à vaporisation directe. Il consiste en un tube métallique doublé d'un chemisage de verre (appelé insert), balayé par le gaz vecteur et chauffé à la température moyenne d'ébullition des composés à chromatographier. L'aiguille de la microsiringue contenant l'échantillon traverse l'une des extrémités de l'injecteur obturée par une pastille d'élastomère siliconé (le septum). L'autre extrémité est raccordée à la colonne également chauffée (figure). La totalité de l'échantillon introduit, immédiatement vaporisé, part dans la colonne en quelques secondes. Cette méthode convient pour les colonnes remplies et les grosses colonnes capillaires, quand le débit de gaz vecteur atteint au moins 8 mL/min.

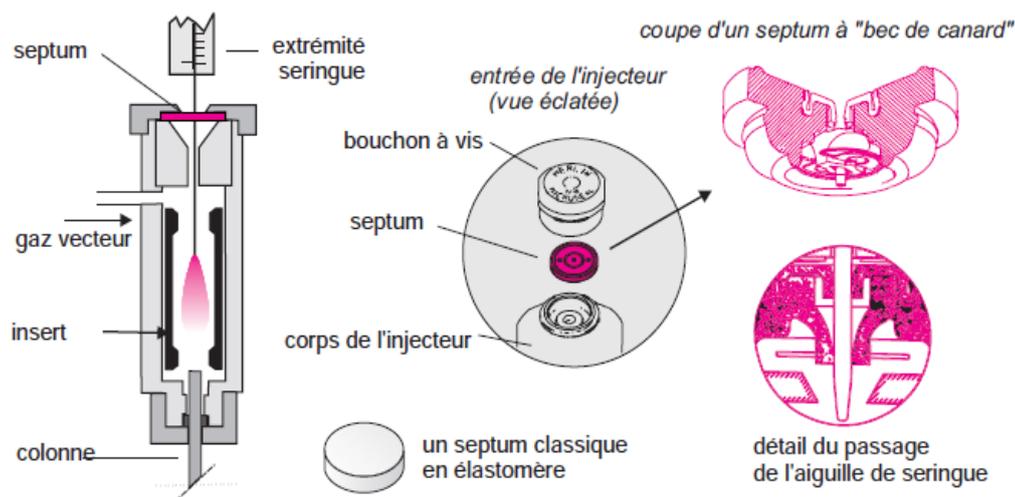


Figure 35. Injecteur à vaporisation directe utilisé pour colonnes remplies

Injecteur avec ou sans division. Pour les colonnes capillaires, à faible capacité d'échantillon, les plus petits volumes qu'il est possible de prélever avec une microsiringue (0,1 μL) peuvent saturer la colonne. On utilise alors des injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, avec ou sans division (encore appelés split ou splitless).

Un courant de gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation où il se mélange à l'échantillon injecté (figure). Une vanne de fuite, couramment réglée entre 50 et 100 mL/min, divise ce débit en deux fractions dont la plus importante est éliminée du corps de l'injecteur en entraînant la majeure partie de l'échantillon introduit. Le rapport de division (split ratio) peut varier entre 20 et 500. Seule la plus petite fraction pénètre dans la colonne. Elle contient une fraction de l'échantillon qui est égale au rapport de division.

Rapport de division = (débit sortie split + débit sortie colonne)/(débit sortie colonne)

Ce type d'injecteur peut également fonctionner en mode splitless. Dans ce mode d'introduction réservé aux échantillons en solution très diluée, on injecte lentement le contenu de la microsiringue en laissant la vanne 2 (figure 36) en position fermée durant 0,5 à 1 minute afin que les composés vaporisés avec le solvant se concentrent dans les tous premiers décimètres de la colonne. Ce mode d'injection, qui demande plus d'expérience, se fait à une température plus basse au départ afin que le solvant précède les composés dans la colonne.

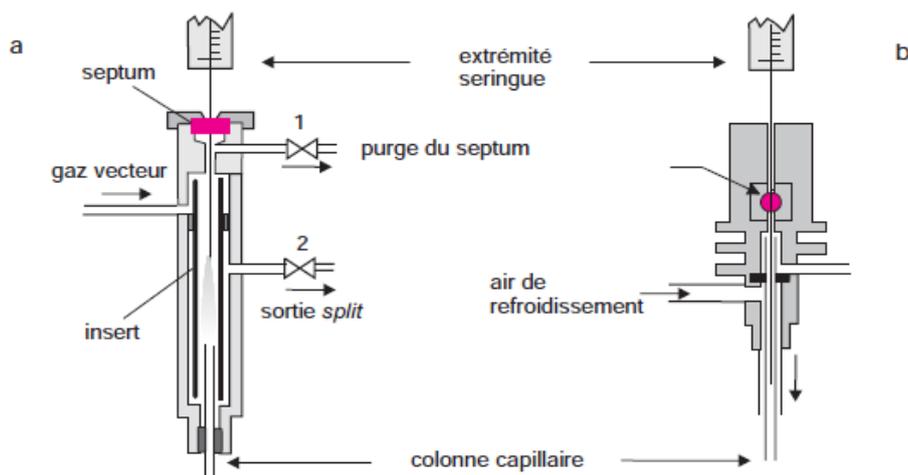


Figure 36. a) chambre d'injection avec diviseur ; b) injection à froid dans la colonne

5. Enceinte thermostatée

Le chromatographe comporte une enceinte qui permet de chauffer la colonne jusqu'à plus de 400°C. Elle doit avoir une faible inertie thermique pour permettre une montée contrôlée et rapide en température (rampe pouvant aller jusqu'à 100°C/min) et une excellente stabilisation (au 1/10 de °C). En adjoignant une vanne cryogénique alimentée par N₂ ou CO₂ liquides, l'enceinte peut être régulée à basse température.

6. Colonnes

Il existe deux types de colonnes, les colonnes *remplies* (ou colonnes à *garnissage*) et les colonnes *capillaires* (figure 37). Elles n'offrent pas les mêmes performances. Pour les colonnes remplies, la phase stationnaire est immobilisée par imprégnation ou par réaction chimique avec le support poreux. Pour les colonnes capillaires, une faible épaisseur de phase stationnaire est soit déposée, soit greffée sur la surface interne de la colonne.

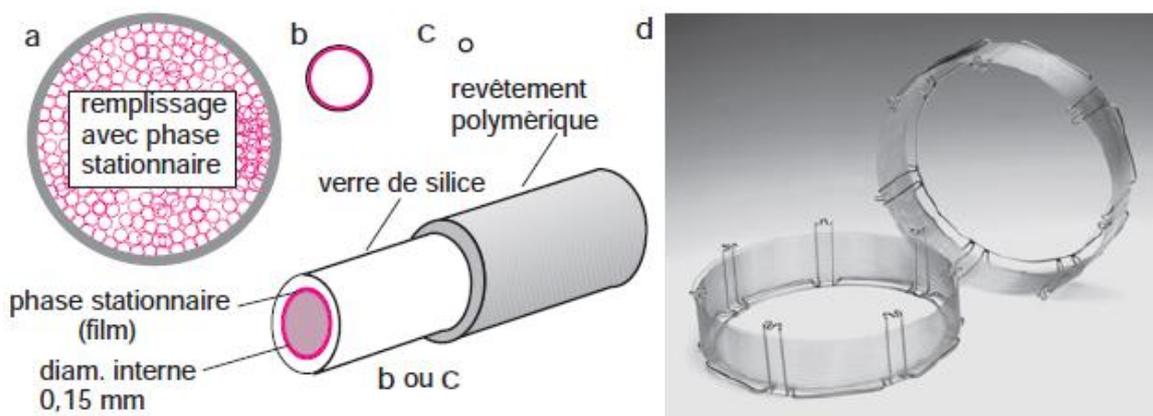


Figure 37. Colonnes de CPG

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

6.1. Colonnes remplies

Ces colonnes, d'un diamètre de 1/8 ou 1/4 d'inch (3,18 ou 6,35 mm) et de 1 à 3 m de long, sont fabriquées à partir d'un tube d'acier ou de verre dont la paroi interne est traitée pour éviter d'éventuels effets catalytiques sur l'échantillon. Elles supportent un débit de gaz vecteur allant de 10 à 40 ml/min. Elles contiennent un support poreux et inerte. Il s'agit de solides ayant une surface spécifique de 2 à 8 m²/g qui se présentent sous forme de grains sphériques d'environ 0,2 mm de diamètre.

Bien qu'ayant des performances moins élevées que les colonnes capillaires, elles sont toujours utilisées pour certaines analyses de routine normalisées. Elles sont faciles à fabriquer à partir d'un grand choix de phases stationnaires. Elles ne sont cependant pas adaptées aux analyses de traces actuelles.

6.2. Colonnes capillaires

Elles sont généralement en *silice fondue* de grande pureté, obtenue par combustion de tétrachlorosilane (SiCl₄) dans une atmosphère de dioxygène. Le diamètre interne de ces colonnes varie de 100 à 530 μm (la précision est de quelques %). La technologie est particulièrement délicate pour obtenir des colonnes parfaitement cylindriques, dont la longueur peut aller jusqu'à 100 m pour une paroi d'environ 50 μm.

Elles comportent un revêtement extérieur brun de polyimide, polymère thermiquement stable ($T_{\max} = 370^{\circ}\text{C}$), pour les rendre moins fragiles et pouvoir les enrouler sur elles-mêmes grâce à un support métallique adapté.

La phase stationnaire recouvre la paroi interne sur une épaisseur régulière pouvant aller de 0,05 à 5 μm. Elle est simplement *déposée* ou mieux *greffée* par des liaisons covalentes éventuellement suivie d'une polymérisation avec réticulation sur la paroi. Ce dépôt est obtenu par évaporation d'une solution ou par polymérisation *in situ* au contact de la paroi. Ce sont les colonnes WCOT (*Wall Coated Open Tubular*), et PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) suivant la nature de la phase stationnaire concernée.

7. Phases stationnaires

Pour les colonnes remplies, la technique d'imprégnation, de mise en œuvre très simple, permet de choisir de nombreux composés organiques peu volatils à usage de phases stationnaires. Mais, pour les colonnes capillaires, les contraintes de fabrication imposent un

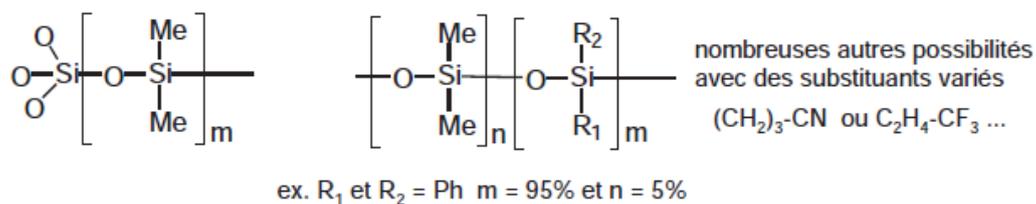
choix beaucoup plus limité. Les phases actuelles correspondent à deux principaux types de composés : les *polysiloxanes* et les *polyéthylèneglycols*, chaque catégorie pouvant faire l'objet de modifications structurales mineures.

7.1. *Polysiloxanes*

Les polysiloxanes (également connus sous le nom d'huiles et gommages silicones) correspondent à la répétition d'un motif de base comportant deux chaînes carbonées par atome de silicium (figure). Les grandes firmes mondiales en commercialisent une vingtaine de diverses compositions avec des chaînes alkyle ou aryle (méthyle ou phényle) pouvant comporter en plus des fonctions (ex. cyanopropyle, trifluoropropyle). Les monomères, combinés en diverses proportions, permettent de moduler les propriétés des phases stationnaires (polarité et domaine de stabilité souvent de -50°C à $300/325^{\circ}\text{C}$, pour les diméthylpolysiloxanes, selon le type de colonne). Grâce à leur gamme de température très étendue, ce sont, pour les colonnes capillaires, les phases les plus utilisées.

La phase très connue qui sert de référence, parce qu'elle est la seule à être parfaitement définie, est le **squalane** dont la polarité est nulle dans l'échelle établie par McReynolds. Cet hydrocarbure saturé ($\text{C}_{30}\text{H}_{62}$) dérive du squalène, terpène naturel extrait du foie de requin. Il est également présent dans le sébum de la peau. Sur cette phase utilisable entre 20 et 120°C (en mode déposé ou en imprégnation), les composés sont élués dans l'ordre de leur température d'ébullition croissante (le temps de rétention étant inversement proportionnel à la pression de vapeur). Diverses phases greffées à base de polyalkylsiloxanes, pratiquement apolaires, remplacent le squalane.

polysiloxanes greffés (exemples)



un exemple de formation d'une phase greffée

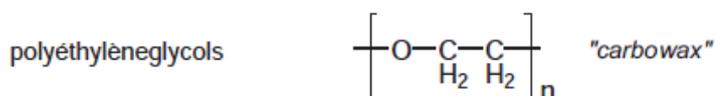
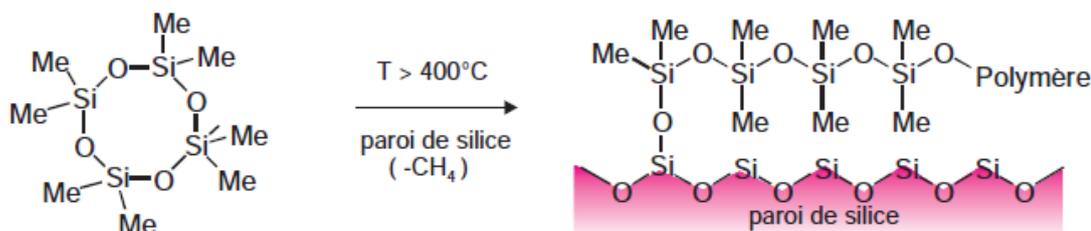


Figure 38. Structure des polysiloxanes (silicones), et des polyéthylèneglycols

7.2. Polyéthylèneglycols (PEG)

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

8. Principaux détecteurs

Certains détecteurs sont universels, c'est-à-dire qu'ils sont sensibles à pratiquement tous les composés élués, d'autres sont beaucoup plus sensibles à un type particulier de molécules.

Un détecteur spécifique, qui ne voit que certains produits, donnera un chromatogramme plus simple. A la limite, pour doser un analyte, l'idéal serait de disposer d'un détecteur ne voyant que lui. On peut répartir les détecteurs en deux groupes, ceux qui conduisent aux seuls temps de rétention, et ceux qui donnent, en outre, des informations structurales sur les composés détectés. Tous les détecteurs donnent une réponse qui dépend de la concentration molaire ou massique du soluté dans le gaz vecteur. Plusieurs détecteurs peuvent être associés en série (figure 39).

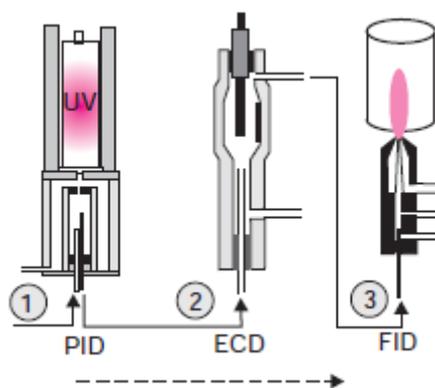


Figure 39. Association de trois détecteurs en série

8.1. Détecteur à ionisation de flamme (FID)

Considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques, c'est le détecteur par excellence de la CPG actuelle. Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans la flamme d'un petit brûleur alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées, responsables du passage d'un courant ionique extrêmement faible (10–12 A) entre deux électrodes (*ddp* de 100 à 300 V). L'extrémité du brûleur sert d'électrode de polarisation (masse). La seconde électrode, de forme annulaire, entoure la flamme. Le signal est amplifié par un électromètre en une tension mesurable (figure 40).

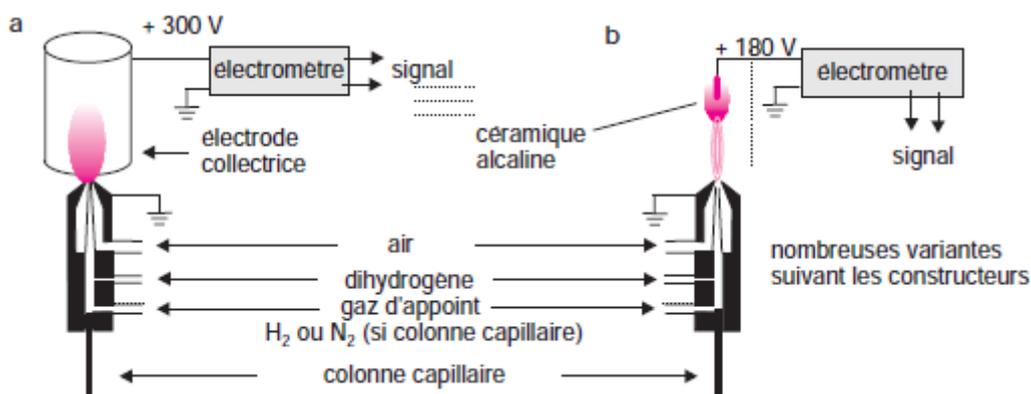


Figure 40. Détecteurs FID (a) et NPD (b)

Pour les composés organiques, l'intensité du signal est sensible au *débit massique* de l'échantillon, sachant bien que la présence de certains hétéroéléments tels les halogènes, peut modifier notablement la réponse. L'aire du pic reflète donc la masse du composé élué (dm/dt intégré entre les instants de début et de fin de pic dont la masse totale est m). Le FID est donc à l'abri des variations de débit qui peuvent conduire à des erreurs avec les détecteurs du type TCD. Pour les composés organiques, la sensibilité, très grande,

s'exprime en C/g de l'élément carbone. La limite de détection est de 2 ou 3 pg/s. et la linéarité atteint 10⁸ (8 décades). Cependant la linéarité ne doit pas faire oublier que c'est avec les solutions les plus diluées que la résolution est la meilleure.

8.2. Détecteur thermoionique (NPD)

Ce détecteur est très sensible aux composés azotés (N) ou phosphorés (P). Il comporte un petit cylindre en céramique dopée avec un sel alcalin (ex. sulfate de rubidium) auquel on applique une tension électrique pour entretenir un petit plasma (800 °C) alimenté par combustion d'un mélange air/hydrogène (figure 40). A la différence du FID la flamme est plus petite. Les composés contenant N ou P donnent, assez spécifiquement, des fragments de décomposition transformés en ions négatifs. Ces ions sont recueillis sur une électrode collectrice. Le diazote de l'air est inactif. La sensibilité est typiquement de 0,1 pg/s pour N ou P et l'étendue dynamique de 5 décades, mais elle varie beaucoup avec les réglages.

8.3. Association des détecteurs

A la sortie d'une colonne capillaire on peut installer en série ou en parallèle, selon que le détecteur détruit ou non l'échantillon, plusieurs détecteurs de principes différents. Chromatogrammes du mélange injecté, obtenus en sortie de chaque détecteur. On remarquera que la sélectivité varie beaucoup d'un détecteur à un autre.

9. Indices de rétention et constantes des phases stationnaires

L'introduction de ces paramètres a au moins trois objectifs :

- Caractériser tout composé par une grandeur plus générale que son temps de rétention dans des conditions définies.
- Suivre l'évolution dans le temps des colonnes et par suite leurs performances.
- Classer entre elles les phases stationnaires connues pour faciliter le choix d'une colonne bien adaptée pour tout problème nouveau de séparation, sachant que la polarité ou la nature chimique d'une phase stationnaire ne permet pas, seules, de prévoir sa réelle aptitude séparatrice. On examine pour cela le comportement des phases stationnaires vis-à-vis de quelques composés de référence. On aboutit aux *constantes des phases stationnaires*.

9.1. Droite de Kovats

Pour déterminer les indices de rétention on met à profit la propriété générale suivante : quand on injecte un mélange constitué de composés appartenant à une série homologue de *n*-alcane sur une colonne maintenue en régime isotherme, le chromatogramme qui en

résulte est tel que les logarithmes des temps de rétention réduits $t'_{R(n)}$ croissent linéairement avec le nombre n d'atomes de carbone des n -alcanes correspondants (figure 41). En reportant sur un graphe n et $\log t'_{R(n)}$ on obtient, en effet, des points bien alignés :

$$\log (t_{R(n)} - t_M) = \log t'_{R(n)} = a \cdot n + b$$

$t'_{R(n)}$ correspond au temps de rétention de l'alcane ayant n atomes de carbone, diminué du temps mort t_M ; a et b sont des coefficients numériques. La pente de la droite obtenue dépend de la colonne dans sa globalité et des conditions de réglage du chromatographe.

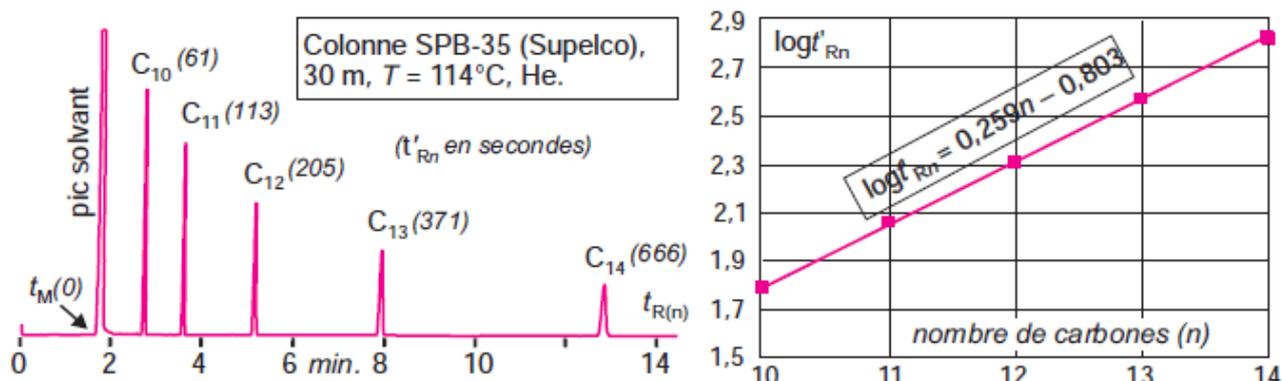


Figure 41. Droite de Kovats

Chromatogramme en régime isotherme d'une série de 5 n -alcanes (C10 –C14) et droite de Kovats correspondante dans les conditions d'analyse précisées.

9.2. Indice de rétention de Kovats d'un composé.

Sans changer les conditions de réglage de l'appareil, on injecte ensuite un composé (X). Le nouveau chromatogramme obtenu va permettre de calculer I_X , *indice de rétention de Kovats* de (X) sur la colonne considérée : celui-ci est égal au produit par 100 du nombre apparent d'atomes de carbone de l'« alcane théorique » ayant le même temps de rétention réduit.

Deux méthodes sont utilisées pour trouver le nombre n_X de carbones équivalents de (X) :

- La première qui repose sur l'équation de la droite de Kovats obtenue précédemment (figure) et permet de calculer n_X (donc I_X) par utilisation d'un tableur par exemple.
- La seconde, qui permet de calculer directement I_X à partir des temps de migration réduits des deux n -alcanes (à n et $n+1C$) qui encadrent (X) sur le chromatogramme :

$$I_X = 100n + 100 \frac{\log t'_{R(X)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}}$$

A la différence de la droite de Kovats, les indices de rétention ne dépendent que de la phase stationnaire et non des conditions de réglage du chromatographe. Ils s'affranchissent en particulier des temps de rétention. Pratiquement, pour s'assurer de l'identité des conditions expérimentales pour les deux injections, on co-injecte le composé X avec le mélange des n -alcanes.

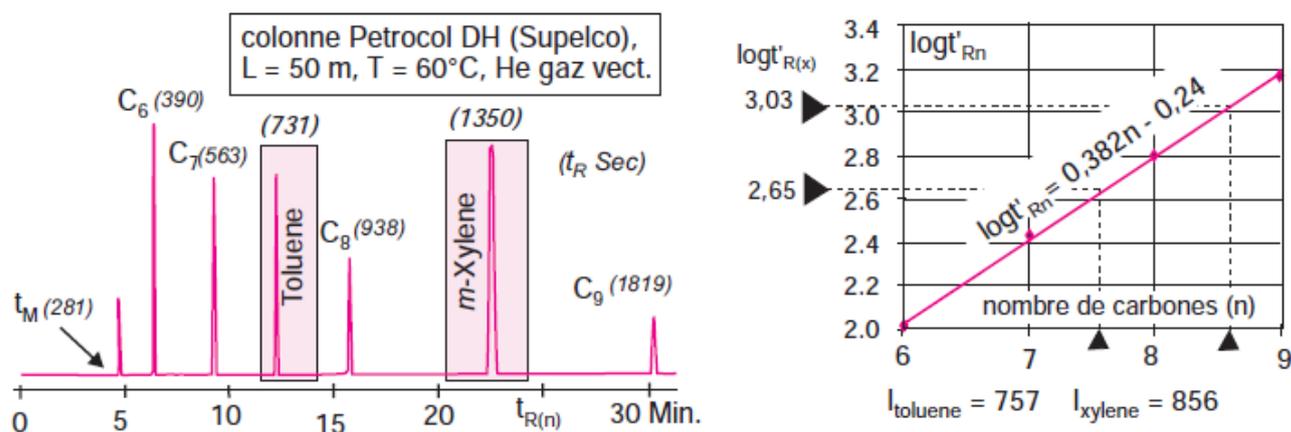


Figure 42. Indices de rétention de Kovats ($I = 100 n_X$) sur une colonne en régime isotherme

Le nombre de carbones équivalent n_X , est trouvé à partir du logarithme du temps de rétention réduit $t'_{R(X)}$. Le chromatogramme correspond à l'injection d'un mélange de 4 n -alcanes et 2 hydrocarbures aromatiques. Les valeurs en italiques correspondent aux temps de rétention en secondes. En injectant périodiquement ce même mélange, la modification des indices de Kovats de ces hydrocarbures permet de suivre l'évolution des performances d'une colonne. En programmation de température on peut encore tracer cette droite en utilisant une formule corrigée, mais la précision est moins bonne.

V. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) permet de séparer les molécules suivant leur taille. Elle utilise pour cela des phases stationnaires qui comportent des pores dans lesquels les composés vont pouvoir diffuser, plus ou moins suivant leur volume. La vitesse de migration d'un composé va donc dépendre, pour une même famille de molécules, de sa masse moléculaire.

1. Principe

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) est basée sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon dans la phase stationnaire (figure 43). La séparation résulte de l'existence de pores dans la phase stationnaire, dont le diamètre est comparable à celui des espèces présentes lorsqu'elles sont en solution dans la phase mobile. On désigne la CES par filtration sur gel quand la phase stationnaire est hydrophile (phase mobile aqueuse) et par perméation de gel quand elle est hydrophobe (la phase mobile est un solvant organique).

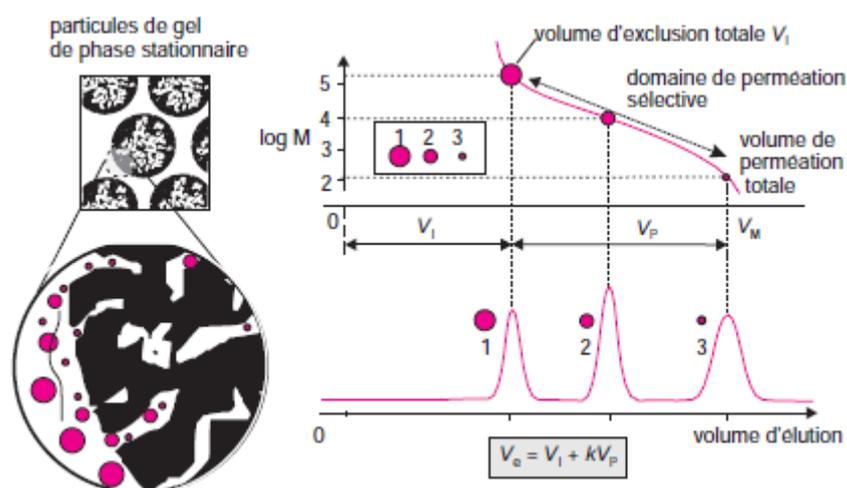


Figure 43. Migration au travers du gel de phase stationnaire

Le volume total V_M de phase mobile dans la colonne peut être décomposé en deux parties : le volume interstitiel V_I (extérieur aux pores) et le volume V_P qui est celui des pores. V_I représente le volume de phase mobile nécessaire pour transporter, d'une extrémité à l'autre de la colonne, une grosse molécule supposée exclue des pores et $V_M = V_I + V_P$, le volume correspondant pour une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores. Les volumes d'élution V_e sont donc compris entre V_I et V_M . On a :

$$V_e = V_I + KV_P$$

Soit :

$$K = \frac{V_e - V_I}{V_M - V_I}$$

K, coefficient de diffusion, représente le degré de pénétration d'une espèce dissoute dans le volume V_P ($0 < K < 1$). Pour la plupart des remplissages modernes, V_I et V_P sont tous les deux de l'ordre de 40 % du volume de la colonne vide.

Important : Lorsque V_e/V_M dépasse 1, le comportement du composé dans la colonne ne suit plus seulement le mécanisme d'exclusion stérique, mais il s'y ajoute des interactions physicochimiques avec le support comme en CLHP.

2. Phases stationnaires et phases mobiles

Les phases stationnaires sont constituées par des polymères réticulés organiques ou minéraux (silices greffées de substituants hydroxylés), qui se présentent sous forme de grains sphériques de 3 à 10 μm de diamètre avec des pores compris entre 4 nm et 200 nm. Ces matériaux, communément appelés gels, doivent résister à l'effet d'écrasement dû à la pression en tête de colonne et à une température de plus de 100 °C pour la technologie actuelle.

La réduction du diamètre des particules, gage d'efficacité, a pour effet de diminuer les passages interstitiels ce qui rend plus difficile la migration des grosses molécules exclues. Aussi est-il préférable dans ce cas d'augmenter la taille des particules et de compenser par une colonne plus longue. Les colonnes standards ont une longueur de 30 cm (diamètre interne de 7,5 mm). Leur efficacité N peut atteindre 10^5 plateaux/m.

3. Instrumentation

Le matériel est comparable à celui qui est employé en CLHP si ce n'est que les colonnes ont des volumes plus importants. Pour améliorer la résolution il est assez courant de mettre en série deux ou trois colonnes aux porosités complémentaires.

Le détecteur le plus employé est le réfractomètre différentiel. Pour les polymères, la variation d'indice de réfraction étant généralement indépendante de la masse moléculaire,

ce détecteur est considéré comme universel. D'autres détecteurs sont parfois ajoutés au réfractomètre. Ils sont basés sur l'absorption lumineuse (détecteur UV) la diffusion de la lumière (figure 44) et la viscosimétrie. Ils donnent des indications complémentaires sur les composés séparés.

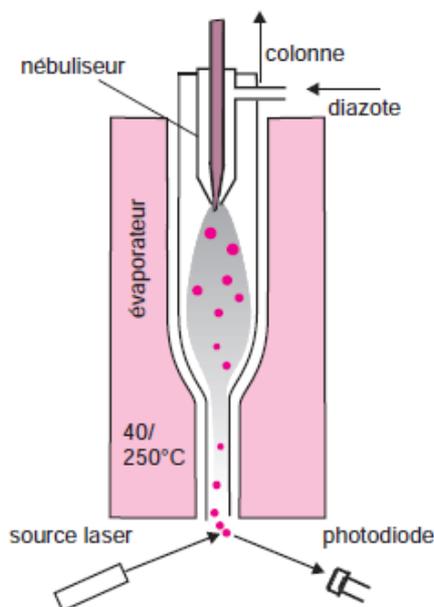


Figure 44. Détecteur à diffusion de la lumière

La phase mobile en sortie de colonne est transformée, sous l'effet d'un courant de diazote, en un brouillard par un dispositif d'atomisation de géométrie adaptée. Lorsqu'un composé est élué, les gouttelettes, en s'évaporant, abandonnent en suspension de fines particules. Eclairées par une source laser elles diffusent la lumière par effet Tyndall (ce qui se passe est comparable à la diffusion de la lumière que l'on observe avec les phares d'une voiture par temps de brouillard). Le signal émis par la photodiode est en rapport avec la concentration du composé ainsi éclairé. Les facteurs de réponses sont très voisins quel que soit le composé. Ce détecteur n'est évidemment pas utilisable pour les composés volatils à la température de la zone chauffée.

4. Domaines d'application

Comme il est possible de séparer des masses nominales allant de 200 à plus de 10^7 Da, les principales applications se trouvent dans le domaine de l'analyse des polymères, qu'ils soient d'origine naturelle ou de synthèse. L'absence d'interaction chimique avec la phase

stationnaire, associée à une élution rapide et la récupération totale des analytes, constituent autant d'avantages. La mise au point des analyses est rapide, sachant aussi qu'on n'utilise pas de gradient d'élution puisqu'il n'y a pas d'interaction soluté/phase mobile.

Le choix de la phase stationnaire adaptée à la séparation envisagée se fait à partir des courbes d'étalonnage des différentes colonnes disponibles. On retient celle dont la courbe en masses présente une partie linéaire de faible pente recouvrant toute l'étendue des masses présentes dans l'échantillon (figure 45). Il faut que l'étalonnage soit réalisé avec des standards de même type, les macromolécules pouvant adopter des formes variées allant de la pelote à l'aspect filiforme.

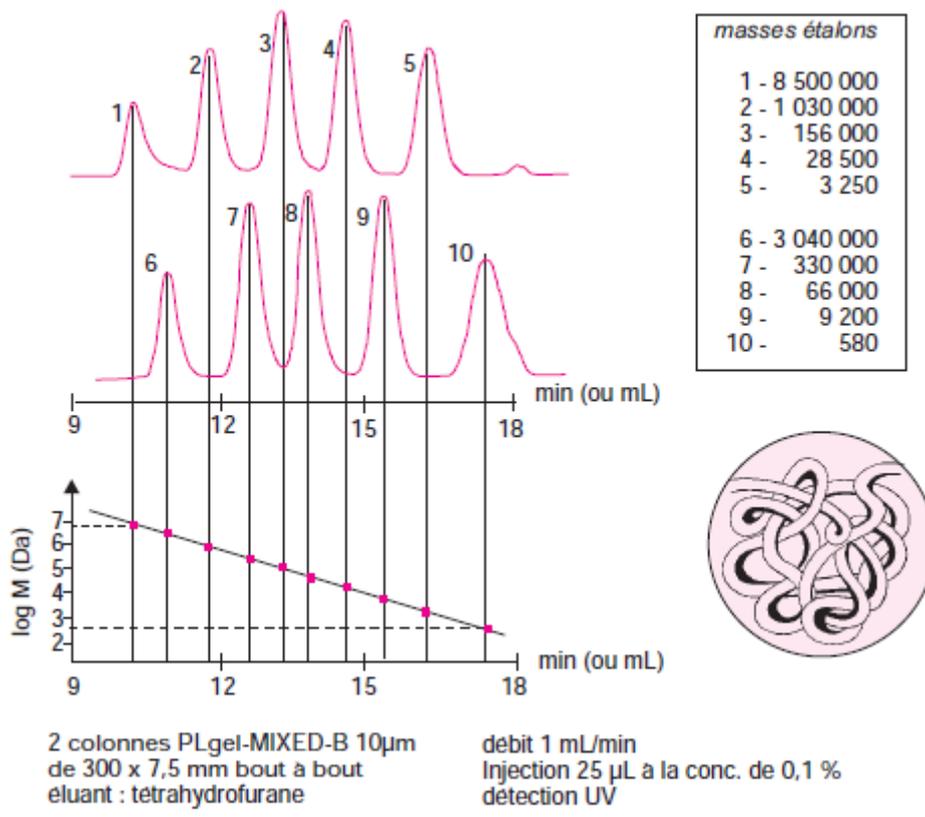


Figure 45. Courbe d'étalonnage d'aspect linéaire d'une colonne de perméation de gel

En utilisant, comme le montre la figure, deux mélanges complémentaires d'étalons de polystyrène on dispose d'un nombre suffisant de masses pour étalonner la colonne. La droite obtenue, qui recouvre un large domaine de masses (conséquence d'une phase stationnaire « panachée »), permet, dans un second temps de déterminer la masse moléculaire d'un polystyrène inconnu. En bas, à droite, le dessin symbolise une

macromolécule repliée sur elle-même par effet du solvant. On désigne ce volume par volume hydrodynamique de la macromolécule.

VI. Chromatographie d'interactions hydrophobes

1. Principe

Cette chromatographie sépare les protéines en fonction de leur caractère hydrophobe. Son principe repose sur le fait qu'en présence d'une force ionique élevée (fortes concentrations en sels), les molécules d'eau constituant l'enveloppe d'hydratation des protéines sont déplacées pour hydrater les anions et les cations provenant de la dissociation du sel (relargage, salting out). Ceci entraîne une réorganisation des molécules d'eau autour des protéines et l'exposition de leurs zones hydrophobes favorisant l'établissement d'interactions hydrophobes entre ces zones (normalement enfouies) et les groupements hydrophobes portés par la phase stationnaire. Les protéines qui se lient à la phase stationnaire réadoptent leur conformation native lorsqu'un tampon avec une force ionique faible est ajouté. Il en résulte une élution des protéines.

Le gel de chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH) porte un groupement hydrophobe comme un noyau phénol à l'extrémité d'une chaîne carbonée. Ce groupe hydrophobe interagit avec les zones hydrophobes situées à la surface des protéines. La CIH peut être une méthode de séparation précieuse pour la purification des protéines qui peuvent se replier spontanément par une diminution de la force ionique. Cependant, sous crainte de précipitation par les sels d'une protéine d'intérêt, la force ionique du tampon de liaison doit être aussi faible que possible pour lier la protéine. Dans le cas contraire, il faut faire fixer les protéines contaminantes et récupérer la protéine d'intérêt dans la fraction non retenue.

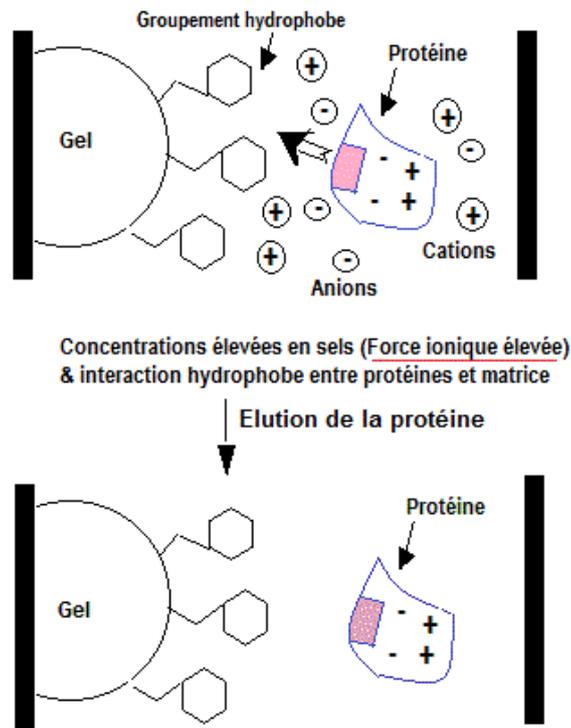


Figure 46. Représentation de chromatographie d'interaction hydrophobe

2. Méthodologie

L'instrumentation pour la chromatographie d'interaction hydrophobe peut être automatisable et semi-automatisable. Le fait que la technique peut être automatisable permet de réaliser des séparations plus rapidement, permet d'obtenir un plus grand nombre de données fiables (reproduit la séparation sous les mêmes conditions).

En addition, il existe plusieurs facteurs qui peuvent optimiser la séparation :

- Choisir une résine qui possède beaucoup de sites disponibles (plus d'interactions de l'analyte avec la résine contribue à avoir un meilleur rendement).
- Choisir un Ligand très pur (augmente la sélectivité pour l'analyte, qui augmente le rendement).

2.1. Influence du choix et de la concentration du sel antichaotrope

Une des considérations la plus importante est le choix du sel et sa concentration de départ (salinité initiale) ainsi que sa concentration de fin d'élution (salinité finale). Il faut d'emblée comprendre que la capacité d'un sel à favoriser la rétention de la protéine sur la

phase stationnaire suit la même relation que lors de la précipitation des protéines. Cette relation est illustré par la **série de salage de Hofmeister**.

L'effet **salting-in** (effet chaotropique) indique la tendance de la solubilité dans l'eau d'une protéine à augmenter lorsque nous augmentons la force ionique et l'effet (lyotropique) **salting-out** indique la tendance de la solubilité dans l'eau d'une protéine à diminuer lorsque nous augmentons la force ionique. Il va donc de soi de dire que selon la série de Hofmeister suivante, les sels de Ba^{2+} est celui qui favorise le plus la rétention de la protéine sur la phase stationnaire (c'est celui avec l'effet chaotropique le plus marqué de par sa grande capacité à solubiliser les protéines en milieu fortement salin) tandis que le PO_4^{3-} est le sel qui favorise le plus l'élution de la protéine (c'est celui avec l'effet chaotropique le moins marqué de par sa faible capacité à solubiliser les protéines en milieu fortement salin). Cependant, le sel le plus utilisé est le sulfate d'ammonium (grande effet lyotropique et petit effet chaotropique). Lors de la considération des effets chaotropique/lyotropique, il ne faut pas oublier de considérer la solubilité du sel car si la quantité de sel qu'on doit mettre dépasse sa solubilité dans l'eau, l'expérimentateur aura des ennuis puisque la force ionique (gradient d'élution) ne sera pas comme prévu.

Série Hofmeister des ions lyotropiquee ou chaotropique

- Augmentation de l'effet lyotropique (Salting out) . Classé de l'effet le moins au plus prononcé. $\text{SCN}^- < \text{ClO}_4^- < \text{NO}_3^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{COO}^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{PO}_4^{3-}$.
- Augmentation de l'effet chaotropique (Salting in). Classé de l'effet le moins au plus prononcé. $\text{NH}_4^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{Li}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$.

2.2. Influence du pH de la phase mobile

Ce facteur entre en jeu seulement lorsque les bases ou acides des acides aminés sont situées à proximité d'un site hydrophobe. Dans le cas où une protéine aurait des acides aminés acide (ou basique) sur le site apolaire de la molécule (où se fait le contact entre la molécule et la phase stationnaire), le pH vient influencer la rétention. Si la protéine contient des acides aminés éloignés du site de contact, le pH n'est pas un facteur.

2.3. Influence de la présence d'additifs

La présence d'additif vient affecter la rétention de deux manières. En se liant à la colonne, le tensioactif vient diminuer son hydrophobicité, ce qui influence la rétention. Un

tensioactif est une molécule qui contient deux parties avec des polarités différentes. En se liant à la molécule, le tensioactif vient diminuer son hydrophobicité, ce qui influence la rétention. En effet, la section hydrophobe du tensioactif se lie avec la section hydrophobe de la protéine. Par contre, l'autre bout des tensioactifs est hydrophile donc le «complexe» formé par le tensioactif et la protéine est maintenant moins hydrophobe et plus hydrophile, ce qui diminue la rétention. Par contre, l'ajout de tensioactif a une dimension d'utilité. En effet, si on cherche à séparer plusieurs molécules excessivement apolaires, cela serait impossible nous n'arriverions pas à solubiliser les molécules dans une solution très saline; la séparation serait alors impossible. Par contre, en ajoutant des surfactants dans la solution, on permet à des espèces très hydrophobes (telles que des protéines membranaires), de se solubiliser et ainsi d'être séparé par CIH. On peut aussi ajouter des solvants organiques comme additifs.

2.4. Influence de la température

La rétention en CIH est directement proportionnelle à l'entropie. En chauffant, on augmente l'entropie et donc on augmente aussi le temps de rétention des molécules sur la phase stationnaire apolaire. Ce comportement est opposé par rapport au comportement général de la relation température-rétention en chromatographie liquide. En effet, la tendance générale est que plus on chauffe, plus on donne de l'énergie au système et plus il sera facile de rompre les interactions intermoléculaires qui unissent la molécule à la phase stationnaire. Par contre, dans le cas de la CIH, lorsqu'on chauffe la molécule apolaire, il se produit des changements de conformations qui font en sorte de rendre disponible des groupements apolaires qui étaient préalablement pas disponible dans la conformation à basse température. Ainsi, plus on est à haute température, plus il y a de groupement apolaires disponible pour se lier à la phase stationnaire apolaire et plus il y a de rétention.

3. Types de groupe fonctionnel hydrophobe

✚ La phase stationnaire utilisée pour la CIH est composée d'une matrice de base faite d'agarose réticulé ou d'un copolymère synthétique. Un ligand alkyle ou aryle est ensuite conjugué à la matrice, fournissant une spécificité pour des molécules hydrophobes. - Alkyle: une chaîne hydrocarbonée de différentes longueurs; souvent un groupe butyle ou octyle est utilisé. La capacité de liaison de la phase stationnaire est augmentée avec l'augmentation de longueur de chaîne alkyle Les groupes fonctionnels lient des protéines entièrement sur l'hydrophobicité de la protéine.

- ✚ Aryle: un groupe fonctionnel dérivé d'un cycle aromatique; souvent un groupe phényle. Les groupes aryle offrent spécificité croissante, les protéines peuvent également interagir avec le groupe fonctionnel grâce à des interactions d'empilement de base.

VII. Chromatographie en phase supercritique

La chromatographie en phase supercritique est une technique séparative dont la phase mobile est principalement constituée de CO₂ en phase supercritique (SC), produit de recyclage de l'industrie pétrolière. Le fluide SC possède une densité et un pouvoir de solvation proches de celui d'un liquide et une viscosité et une diffusivité proche de celles d'un gaz. Ces propriétés particulières permettent une bonne solubilité des analytes apolaires ou peu polaires et un temps d'analyse court sans générer de pressions excessives sur le système chromatographique. De plus, l'emploi de co-solvants permet l'analyse de composés polaires. Cette technique a fait un remarquable pas en avant ces 2 dernières décennies, soutenue par de nombreux industriels, de par sa rapidité d'analyse mais surtout de par son faible impact environnemental.

La chromatographie en phase supercritique ou en anglais (SFC) a pour originalité d'utiliser comme phase mobile un fluide à l'état supercritique, ce qui améliore les séparations de composés thermolabiles ou de masses moléculaires élevées. Le matériel est de conception hybride entre CPG et CLHP. On peut utiliser soit les colonnes capillaires de la CPG soit les colonnes classiques de la CLHP, mais la tendance actuelle est d'opter plutôt vers l'utilisation de ces dernières. L'arrivée tardive de cette technique sur le marché de l'instrumentation a été un handicap à son développement, beaucoup de méthodes étant déjà normalisées avec les autres techniques chromatographiques classiques qui donnent satisfaction. Si on ajoute à cet argument que le matériel est plus complexe et d'un coût plus élevé, on conçoit que peu de constructeurs d'instruments d'analyse s'y soient intéressés et que ce type de chromatographie soit resté peu développé.

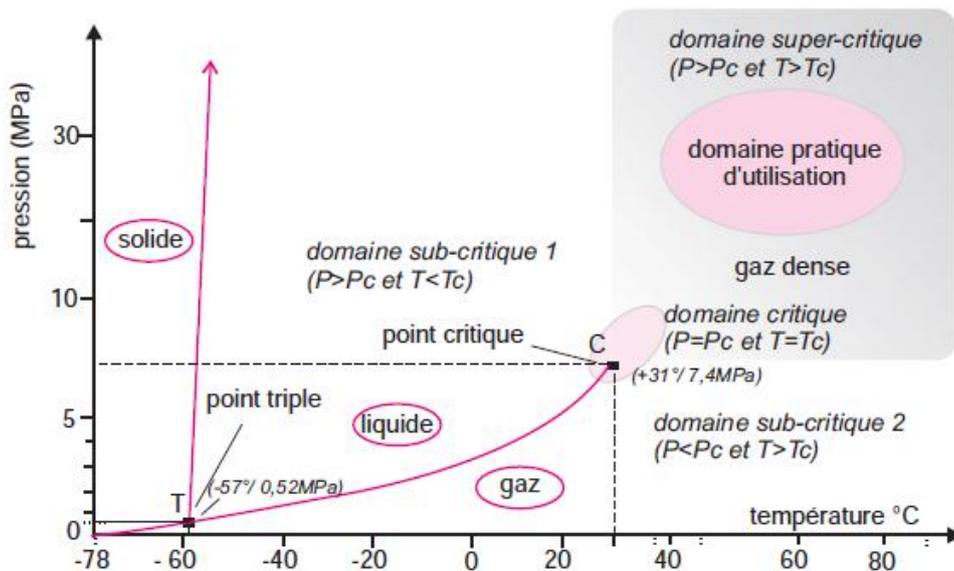


Figure 47. Diagramme d'équilibre de phase pression/température du dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone à l'état de phase supercritique permet l'extraction, à l'échelle du laboratoire, de certains échantillons, ce qui permet de séparer de la matrice les analytes qui sont peu stables. Il a également beaucoup d'applications possibles dans l'industrie qui vont des extractions de produits alimentaires (décaféination, récupération d'arômes et d'épices, élimination de graisses) jusqu'au pressing pour le nettoyage à sec des vêtements. Ce fluide particulier peut être éliminé à basse température sans laisser de résidu toxique, mais l'emploi de pressions élevées alliées à de grands volumes rend ces installations d'extraction potentiellement dangereuses.

1. Les phases supercritiques comme phase mobile

Le dioxyde de carbone à l'état supercritique est le composé le plus utilisé parce que son point critique a pour coordonnées $T_C = 31 \text{ °C}$ et $P_C = 7\,400 \text{ kPa}$ (figure 47). Si la pression et la température sont toutes deux supérieures, on passe dans le domaine de l'état supercritique, dans des conditions qui techniquement sont assez faciles d'accès. De plus ce composé est peu toxique, ininflammable, sans odeur et non corrosif.

On utilise également, quoique plus rarement, le monoxyde de diazote :

$$\text{N}_2\text{O} / T_C = 36 \text{ °C}, P_C = 7\,100 \text{ kPa},$$

ou l'ammoniac :

$$\text{NH}_3 / T_C = 132 \text{ }^\circ\text{C}, P_C = 11\ 500 \text{ kPa.}$$

La densité et par suite le pouvoir de solvation des fluides supercritiques varient avec la pression à laquelle ils sont soumis. Par conséquent, en faisant un gradient de pression en SFC, l'effet est comparable à un gradient de concentration en CLHP, ou à un gradient de température en CPG. Si le chromatographe utilisé permet de réaliser un double gradient de température et de pression, allié à l'ajout d'un modifiant (qui déplace les coordonnées du point critique), il devient possible d'agir de manière très fine sur les facteurs de rétention des analytes, donc sur les sélectivités α .

2. Instrumentation en SFC

Les installations de chromatographie en phase supercritique (SFC pour Supercritical Fluid Chromatography) sont des montages hybrides de CPG et de CLHP (figure 48). Pour assurer le débit du fluide supercritique on utilise une pompe à seringue ou une pompe à piston dont le corps de pompe est maintenu au-dessous de la température critique à l'aide d'un cryostat réglé vers 0 °C. Dans le cas où un modifiant est ajouté, on utilise soit une seconde pompe, soit une pompe tandem comportant deux chambres, l'une pour le fluide supercritique et l'autre pour le modifiant. Le liquide passe ensuite dans un serpentin chauffé pour élever sa température au-dessus du point critique afin de le transformer en fluide supercritique.

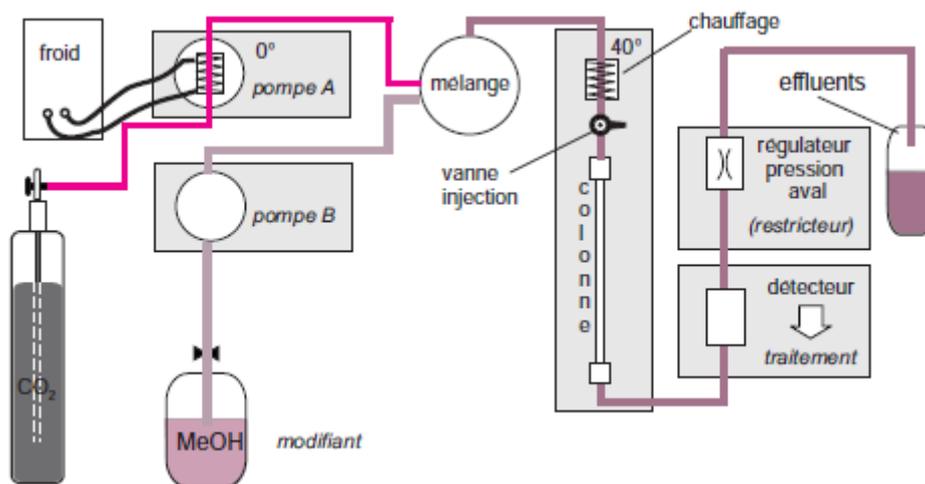


Figure 48. Schéma fonctionnel d'une installation de SFC pour colonne remplie de type CLHP

Un appareillage de SFC comporte également un système de contre-pression régulateur pour maintenir la phase mobile à l'état supercritique depuis la pompe jusqu'à l'extrémité

de la colonne, voire jusqu'en aval du détecteur selon le type choisi. Le dispositif de restriction de pression doit gérer correctement le refroidissement important et l'expansion de volume quand la phase supercritique redevient un gaz à la pression atmosphérique. Il est installé en amont du détecteur s'il s'agit d'un FID (ce détecteur à ionisation de flamme fonctionne à la pression atmosphérique), et après pour un détecteur reposant sur l'absorption UV, la fluorescence ou la diffusion de la lumière.

3. Comparaison de la SFC avec la CLHP et la CPG

La SFC complète les autres techniques classiques de chromatographie liquide ou gazeuse. La migration du soluté résulte d'un mécanisme de partage entre une phase stationnaire apolaire et une phase éluante peu polaire. Le phénomène de rétention est donc différent de celui de la CLHP. Le pouvoir solvatant de la phase mobile est déterminé par la pression et la température de la phase supercritique. La résistance au transfert de masse entre la phase stationnaire et la phase mobile est moindre qu'en CLHP parce que la diffusion est plus rapide. Le coefficient C de l'équation de Van Deemter étant plus faible, la vitesse de la phase mobile peut donc être plus grande sans perte appréciable d'efficacité (figure 49).

Par ailleurs, comme la viscosité de la phase mobile est proche de celle d'un gaz, on peut utiliser les colonnes capillaires de la CPG. Cependant la perte de charge due à la colonne, modifie les coefficients de distribution des composés entre le début et la fin de leur migration, ce qui provoque un élargissement des pics. De ce fait on n'atteint pas les efficacités rencontrées en CPG.

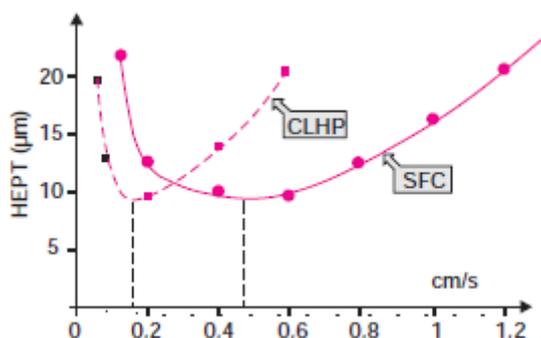


Figure 49. Comparaison entre CLHP et SFC.

Ces deux courbes expérimentales ont été obtenues avec une même colonne et un même composé, l'une en utilisant une phase liquide classique et l'autre du dioxyde de carbone à

l'état supercritique. Les HEPT sont comparables mais la séparation peut être conduite 3 fois plus rapidement en SFC, d'où un gain de temps.

Références

[1] INSTRUMENTAL ANALYSIS (IID ED.)

G.D. Christian et J.E. O'Reilly, 1986, Allyn & Bacon Intl.

0.205.08685.3

[2] INSTRUMENTATION IN ANALYTICAL CHEMISTRY

R. Murray, 1992, Louise Voress

0.8412.2202.9

[3] JUGEMENT STATISTIQUE SUR ÉCHANTILLONS EN CHIMIE

J. Maurice, 1993, Polytechnica

2.84054.013.4

[4] CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE ET SUPERCRITIQUE

R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, 1991, Masson

2.225.82308.1

[5] LA SPECTROSCOPIE DE RMN

H. Gunther, J-J. Suffert, G. Ourisson, 1994, Masson

2.225.84029.6

[6] MANUEL PRATIQUE DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

J. Tranchant, 1994, Masson

2.225.84681.2

[7] MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES COUPLÉES À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

J de Graeve, F. Berthou, M. Prost, 1986, Masson

2.225.80627.6

[8] MÉTHODES DE SÉPARATION, 2ÈME ÉDITION

G. Mahuzier et M. Hamon, 1990, Abrégés de chimie analytique, Masson

2.225.81849.1

[9] MÉTHODES SPECTOSCOPIQUES POUR LA CHIMIE ORGANIQUE

M. Hesse, H. Meier et B. Zeeh, 1997, Masson

2-225-83050-9

[10] PRACTICAL THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

B. Fried et J. Sherma, 1996, Springer-Verlag

0.8493.2660.5

[11] PRINCIPLES OF INSTRUMENTAL ANALYSIS, 5TH ED.

D.A. Skoog, F.J. Holler et T.A. Nieman, 1998, Saunders College Publishing

0.03.002078.6

[12] QUANTITATIVE ANALYSIS

R.A. Day et A.L. Underwood, 1991, Prentice Hall

0.13.747361.3

[13] SPECTROMÉTRIE DE MASSE, PRINCIPE ET APPLICATIONS

E. Constantin et A. Schnell, 1986, Technique et documentation, Lavoisier

2.85206.352.2

[14] SPECTROMÉTRIE DE MASSE

E. De Hoffmann, J. Charette et V. Strobant, 1994, Masson

2.225.84582.4

[15] STATISTICS FOR ANALYTICAL CHEMISTRY (3RD EDIT.)

J.C. Miller & J.N. Miller, 1993, Ellis Horwood PTR Prentice Hall

0.13.030990.7