

Chromatographie

Pr. Franck DENAT
ICMUB UMR 5260
9, Av. Alain Savary
BP 47870 21078 Dijon
Franck.Denat@u-bourgogne.fr

Chromatographie

I. Généralités.

Méthode de séparation des constituants d'un mélange.

Applications: Identification, dosage (quantification), purification.

Quelques noms et dates :

- **1903** : mise en évidence par Mikhaïl TSWETT, botaniste russe
- **1931** (KUHN et LEDERER) : chromatographie sur colonne (chromatographie liquide-solide CLS)
- **1938** (IZMAILOV et SCRAIBER) : chromatographie sur couche mince (**CCM** ou **TLC**), TAYLOR et UREY : chromatographie par échange d'ions
- **1941** (MARTIN et SYNGE, Nobel en 1952) : concept de chromatographie gaz-liquide, chromatographie de partage liquide-liquide
- **1952** : développement pratique de la chromatographie gaz-liquide
- **1955** : 1^{er} chromatographe gaz-liquide sur le marché (chromatographie en phase gazeuse : **CPG** ou **GC**)
- **1965** (HALASZ, HORVATH) : Chromatographie Liquide Haute Performance (**CLHP** ou **HPLC**)

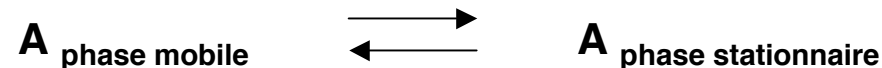
Références :

- F. Rouessac et A. Rouessac. *Analyse Chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes*, 6^{ème} édition (Dunod)
- D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler. *Chimie analytique* (De Boeck).

I. Généralités.

I. 1. Principe :

Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la **phase stationnaire** et la **phase mobile** (gaz ou liquide) qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...).



$$K = C_S / C_M$$

K : Coefficient de distribution

C_S : Concentration de l'analyte A dans la phase stationnaire

C_M : Concentration de l'analyte A dans la phase mobile

Chromatographie : partition phase stationnaire - phase mobile

Extraction : partition entre deux phases liquides non miscibles

Cristallisation : partition entre phase liquide - phase cristalline

Distillation : partition entre phase liquide - phase gazeuse

Sublimation : partition entre phase solide - phase gazeuse

I. 2. Classification des méthodes chromatographiques :

On distingue les différentes méthodes chromatographiques selon la nature des phases.

Phase stationnaire : - dans une colonne au travers de laquelle progresse la phase mobile par gravité ou sous l'action d'une différence de pression → **chromatographie sur colonne**

- sur une surface plane → **chromatographie sur couche mince (CCM)**

Phase mobile : phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant avec elle l'analyte. Le processus d'entraînement de cet analyte est appelé **élution**. La phase mobile peut être un **liquide** ou un **gaz**.

I.2.1. Chromatographies en phase liquide (CPL)

La phase mobile est un liquide. On distingue:

- Les chromatographies de partage :

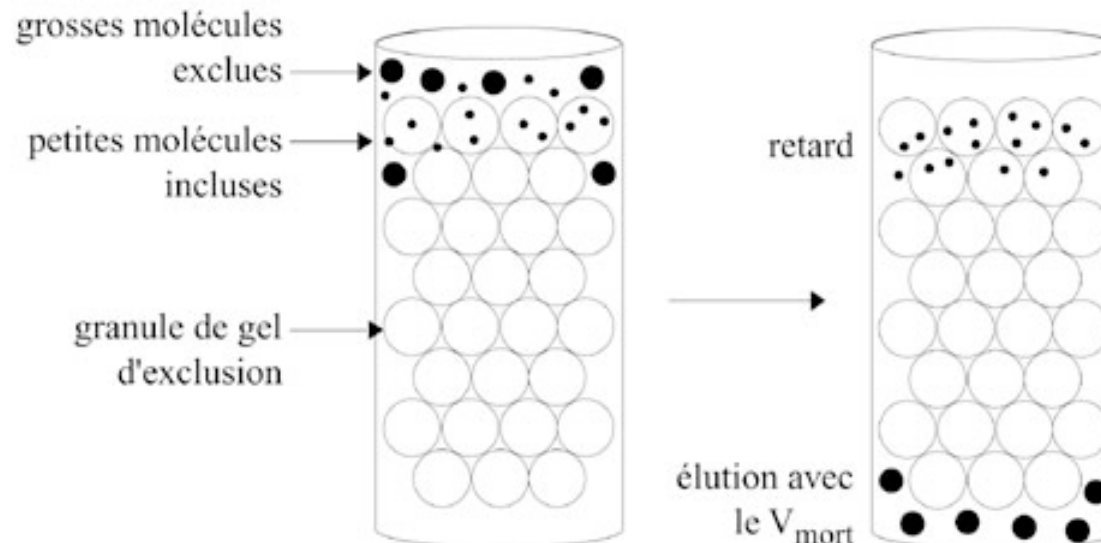
- La chromatographie **liquide-liquide (CLL)** ou chromatographie de partage :

la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide inerte : soit imprégnée dans un solide poreux (risques de lessivage), soit greffée sur le solide (**phase greffée**).

La séparation repose sur le **coefficient de partage** du soluté dans les deux phases liquides.

- La **chromatographie d'exclusion**, ou perméation de gel, ou tamisage moléculaire :

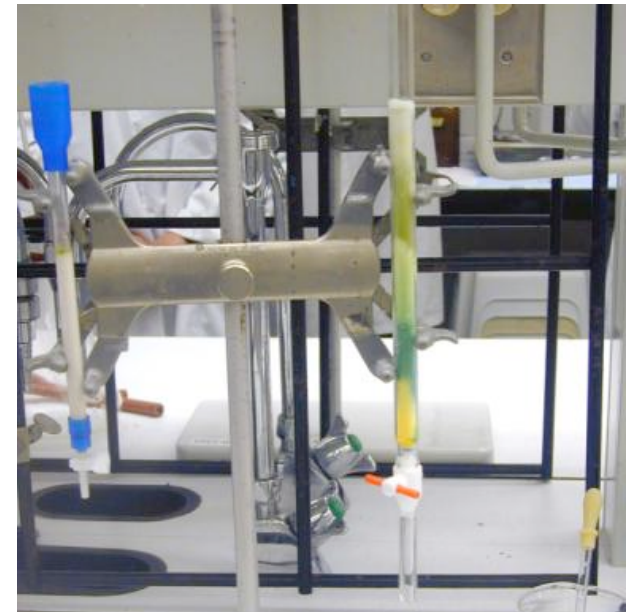
la phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel et sont donc retardés.



-Les chromatographies d'adsorption :

- La **chromatographie liquide-solide (CLS)** ou chromatographie d'adsorption (la plus ancienne et la plus générale) :

la phase stationnaire est un adsorbant solide polaire (**silice** ou alumine) : **chromatographie sur colonne ou CCM**. L'analyte adhère à la phase stationnaire par physisorption et chimisorption → coefficient d'adsorption. La phase stationnaire peut être modifiée pour être apolaire : chromatographie d'adsorption en **phase inverse**.



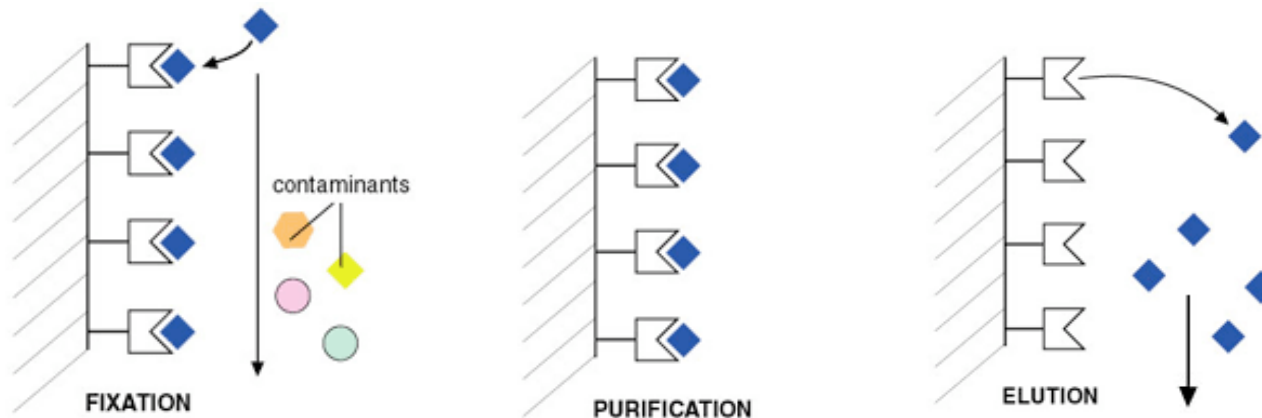
-Les chromatographies d'adsorption :

- La chromatographie par échange d'ions ou chromatographie ionique :

la phase stationnaire est une résine échangeuse d'ions (polymère porteur de groupements ionisés, négativement pour séparer des cations, positivement pour séparer des anions) : interactions électrostatiques.

- La chromatographie d'affinité :

la phase stationnaire est ici un substrat inerte sur lequel est greffé un "effecteur" qui présente une affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).



I.2.2. Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

La phase mobile est un gaz vecteur. On distingue :

- **chromatographie de partage :**

- La chromatographie gaz-liquide : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.

- **chromatographie d'adsorption :**

- La chromatographie gaz-solide : la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.

Eventuellement, la phase mobile peut être un fluide à l'état supercritique (ex CO₂ à 50°C et 150 bars)

TABLEAU 28-1 Classification des méthodes chromatographiques sur colonne

Classification générale	Méthode spécifique	Phase stationnaire	Type d'équilibre
Chromatographie en phase liquide (CPL) (phase mobile liquide)	Liquide-liquide (CLL) ou partage	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre liquides non miscibles
	Liquide-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre liquide et surface greffée
	Liquide-solide (CLS) ou adsorption	Solide	Adsorption
	Échange d'ions	Résine échangeuse d'ions	Échange d'ions
Chromatographie en phase gazeuse (CPG) (phase mobile : gaz)	Liquide-gel (CLG) ou perméation	Liquide dans les interstices d'un solide polymérique	Partage/tamisage
	Gaz-liquide (CGL)	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre gaz et liquide
	Gaz-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre gaz et surface greffée
Chromatographie en fluide supercritique (CFS)(phase mobile : fluide supercritique)	Gaz-solide (CGS)	Solide	Adsorption
		Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre fluide supercritique et surface greffée

I.3. Choix de la technique :

Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes.

Le choix de l'une ou l'autre dépend :

- **de la nature du soluté** : gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...
- **du but de l'analyse** : identification de composants d'un mélange, nécessité ou non de "coupler" la chromatographie avec une méthode spectroscopique ou avec la spectrométrie de masse (CPG/SM ou GC/MS), contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages (quantification)...

II. Chromatogramme.

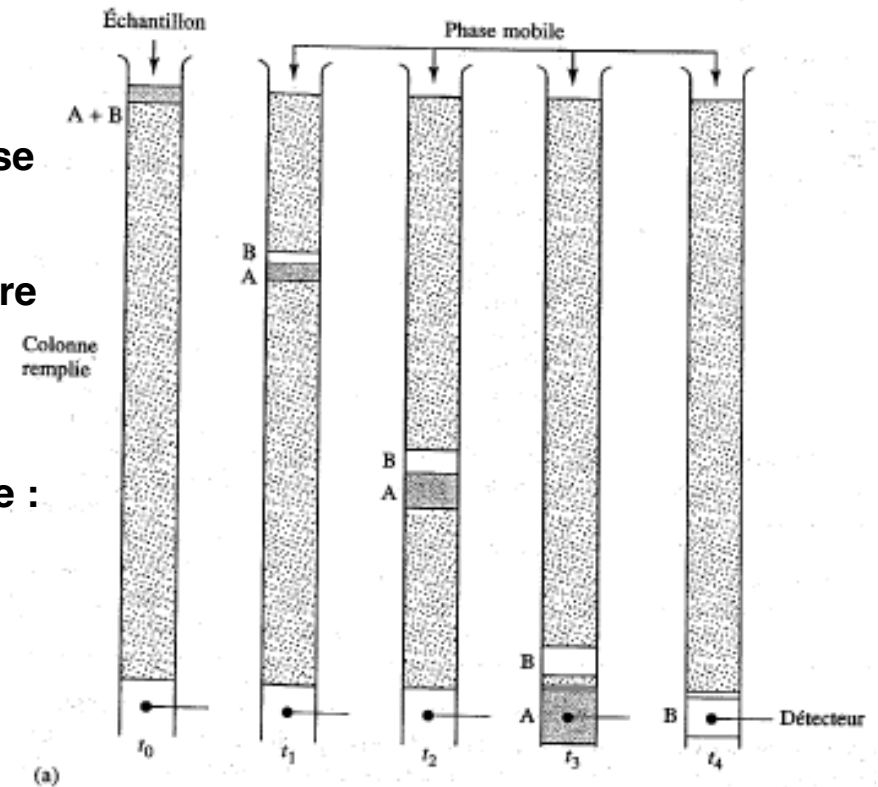
Diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur (\propto à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution)

Elution : entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile.

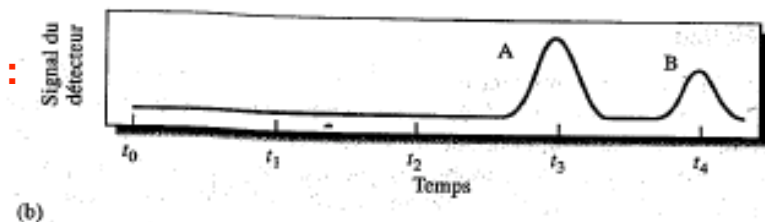
En CLS (colonne ou CCM), la phase mobile peut être appelée **éluant**

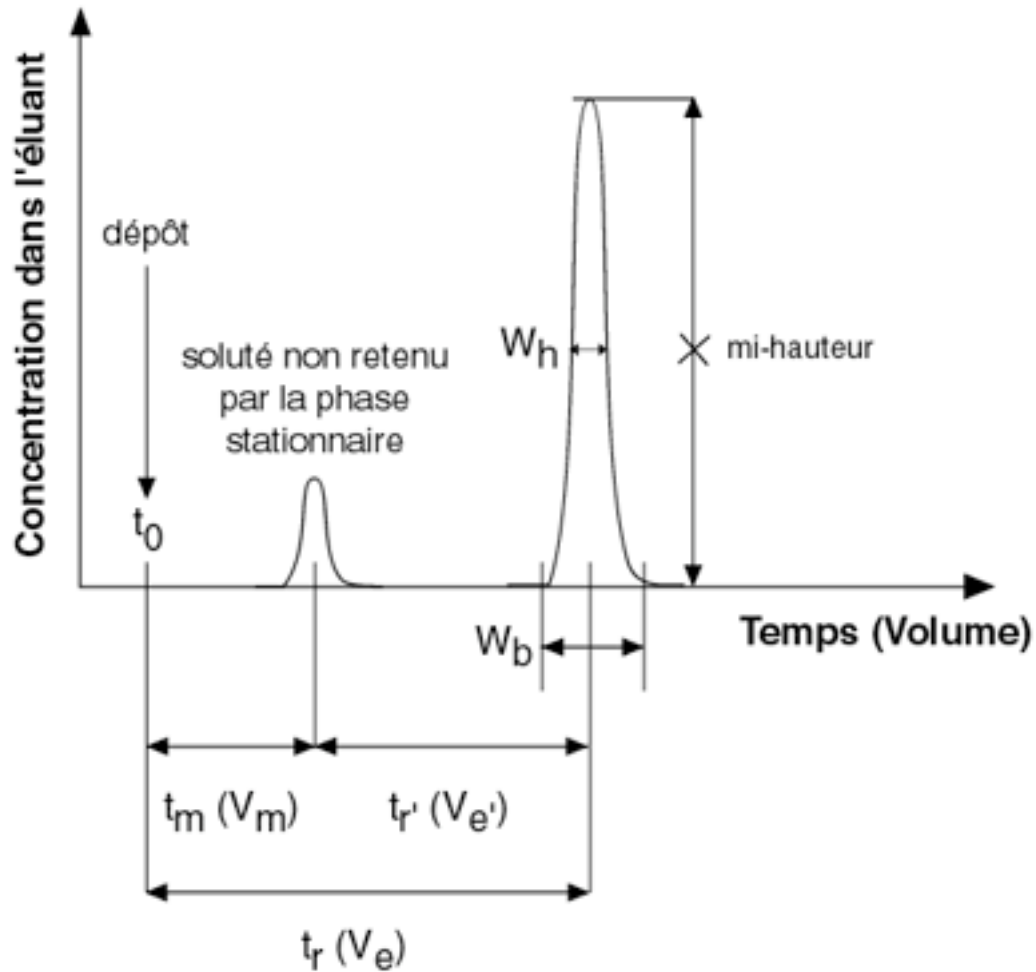
L'analyse du chromatogramme permet une analyse :

- qualitative : identification / position du pic
- quantitative : aire des pics



Chromatogramme :





t_0 : début de l'injection

V_m : volume mort de la colonne

t_m : temps mort

V_e : volume d'éluion (de rétention, V_r)
d'un composé

t_r : temps de rétention (d'éluion, t_e) d'un
composé

V_e (volume d'éluion) = d (débit) x t (temps)

V_e' : volume d'éluion réduit ($V_e = V_e' + V_m$)

t_r' : temps de rétention réduit ($t_r = t_r' + t_m$)

W_b : largeur du pic à la base (ω)

W_h : largeur du pic à mi-hauteur (δ)

Facteur de rétention (ou facteur de capacité) k :

$$k = \frac{t_r'}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

$$k = \frac{m_s}{m_M} = \frac{C_s V_s}{C_M V_M} = K \frac{V_s}{V_M}$$

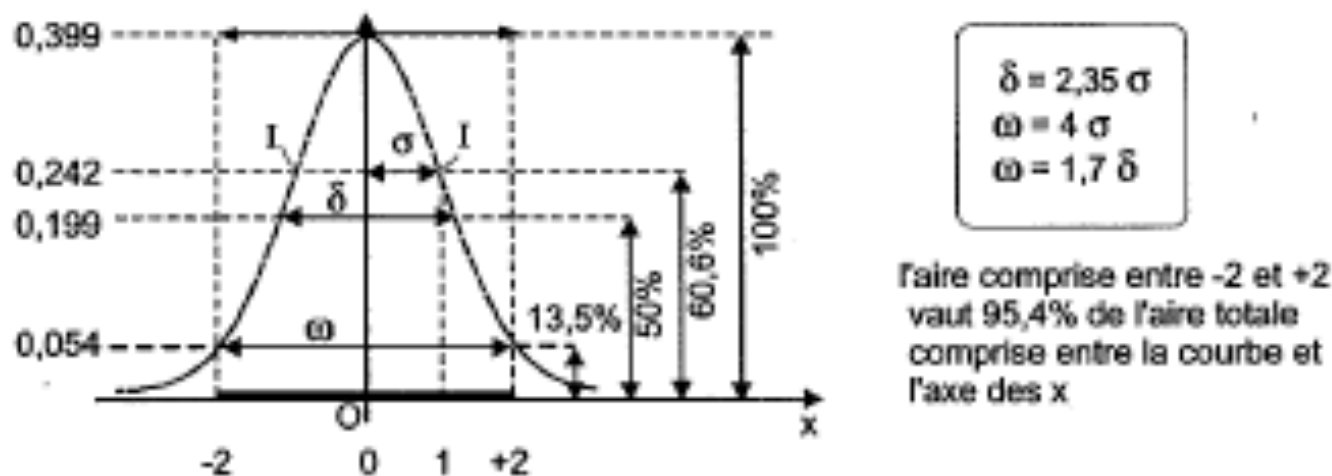
K : coefficient de distribution

m_s : masse de soluté dans la phase stationnaire

m_M : masse de soluté dans la phase mobile

Idéalement $1 < k < 10$ pour les \neq solutés d'un mélange

Caractéristiques d'une courbe de Gauss (pic idéal) :



Les molécules “subissent” un grand nombre de transferts phase mobile ↔ phase stationnaire. Or la progression (élution) n’a lieu que lorsque la molécule est dans la phase mobile. Certaines molécules progressent plus rapidement car elles passent plus de temps dans la phase mobile que la moyenne, d’autres au contraire sont retardées car elles restent plus longtemps que la moyenne sur la phase stationnaire : répartition statistique autour d’une valeur moyenne.

→ La largeur du pic est liée à l’efficacité de la colonne.

III. Efficacité d'une colonne

III.1. Modèle des plateaux (cf distillation fractionnée)

Approche ancienne mais toujours utilisée : le phénomène de migration qui est en réalité dynamique et continu est considéré comme une suite d'étapes distinctes (équilibres successifs). On considère alors qu'une colonne de longueur utile L est composée de N petits disques fictifs superposés (plateaux théoriques) de même hauteur H .

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

L : longueur utile de la colonne

N : nombre de plateaux théoriques : $100 - 10^6$

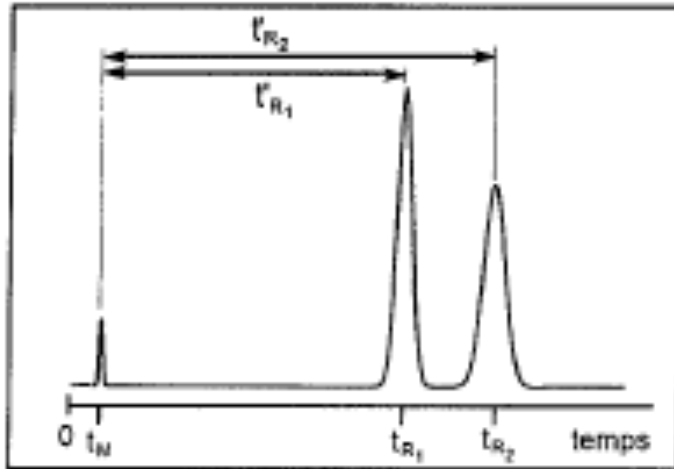
H : hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) : $1 \text{ cm} - 10 \mu\text{m}$

Une colonne sera d'autant plus efficace que N est grand (L grand) et H est petit.

On peut montrer que : $H = \frac{\sigma^2}{L}$ et $\sigma = \frac{L\omega}{4t_R}$

Donc $H = \frac{L\omega^2}{16t_R^2}$ et $N = 16(t_R/\omega)^2$ ou $N = 5,545 (t_R/\delta)^2$

III.2. Facteur de séparation entre deux solutés (facteur de sélectivité)

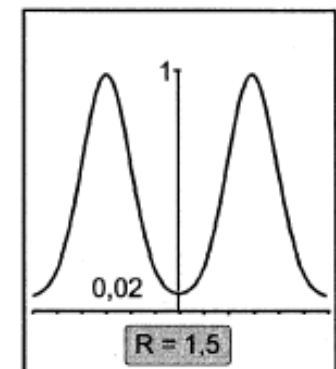
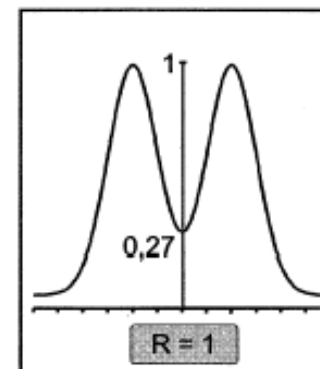
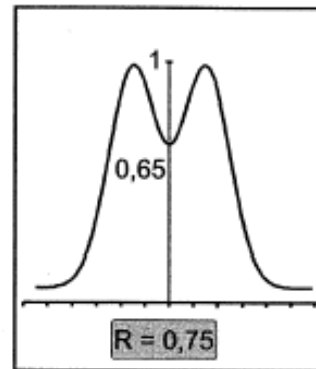


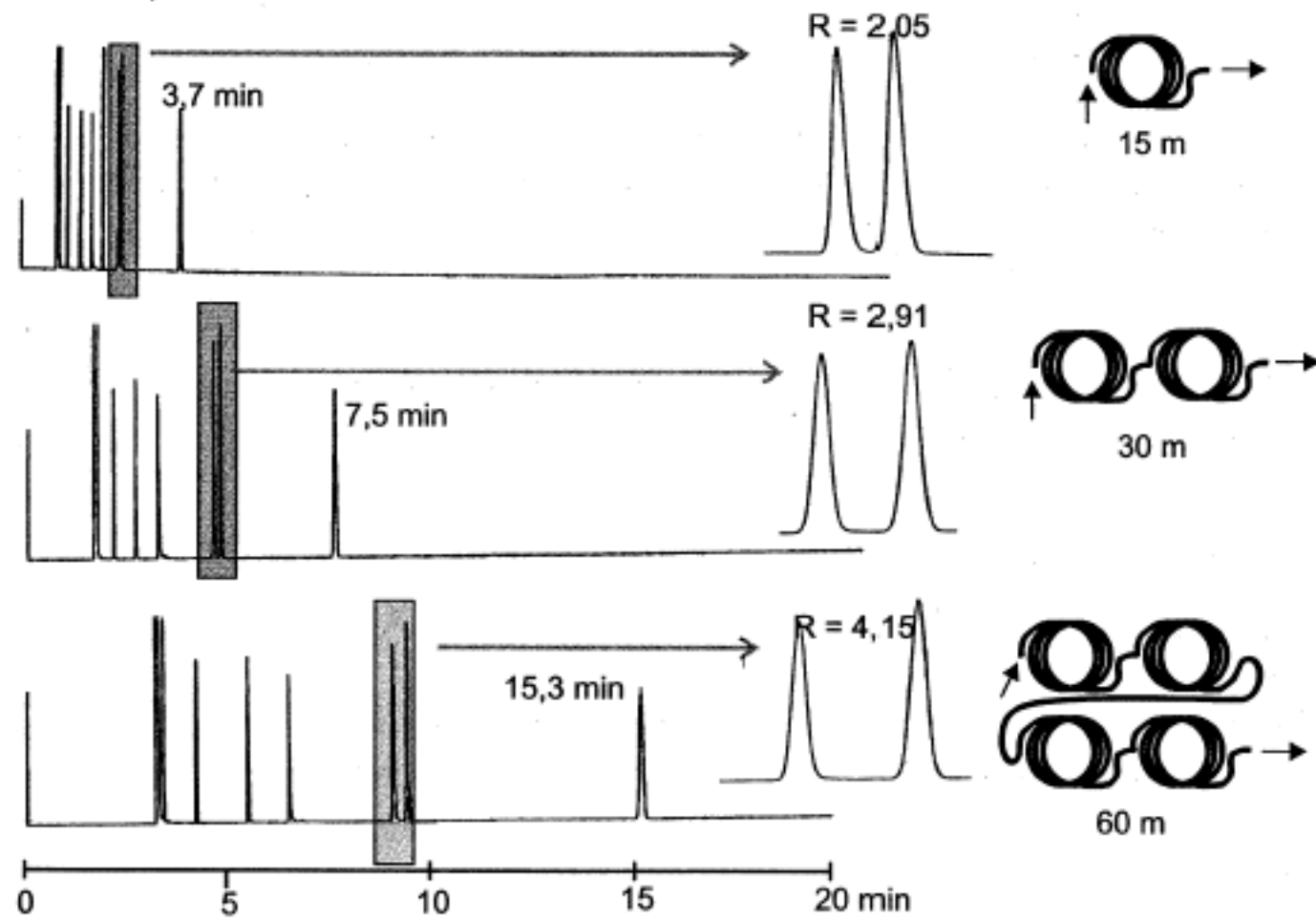
$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

III.3. Facteur de résolution

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

On peut montrer que R est $\propto \sqrt{N}$, dépend aussi de k et α





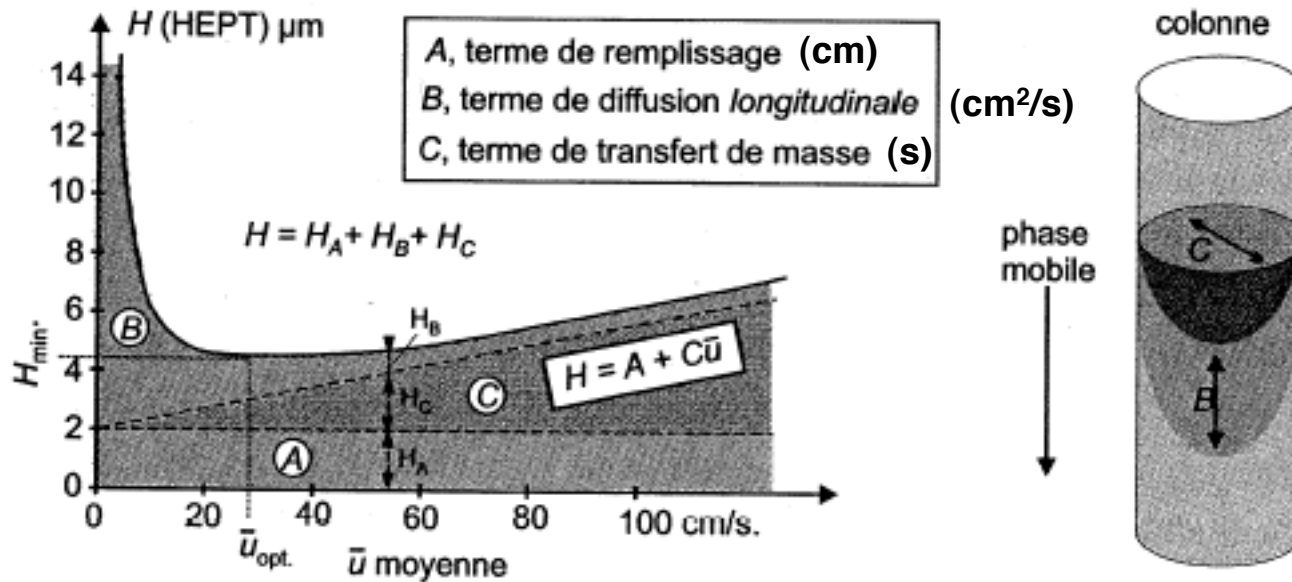
III.4. Effet de la vitesse d'élution sur l'efficacité de la colonne

Mis en évidence par **Van Deemter** → équation simplifiée :

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

u : vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile (cm/s)

Allure de la courbe de Van Deemter en CPG :



$$u_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

A : Coefficient de diffusion turbulente ou terme de remplissage

Chemins préférentiels dus à la granulométrie de la phase stationnaire (taille et répartition des particules) → échanges imparfaits entre les phases → perte d'efficacité.

A est donc lié au **diamètre des particules** du support et à l'irrégularité du remplissage.

B : Coefficient de diffusion longitudinale

Diffusion : migration des espèces des régions les plus concentrées vers les régions plus diluées. La vitesse de diffusion est \div au coefficient de diffusion.

Le coeff. de diffusion est plus important dans les gaz que dans les liquides → phénomène important en **CPG** (principale cause d'élargissement des pics). **B est inversement \div à u** (moins de diffusion lorsque l'analyte séjourne moins longtemps dans la colonne).

Rq.: éviter d'interrompre une chromatographie en cours.

C : Coefficient de transfert de masse

Coefficient de transfert de masse du soluté entre les deux phases, important lorsque le passage est trop rapide pour que l'équilibre soit atteint (**C \div à u**).

III.5. Comparaison de l'efficacité des colonnes en CPL et CPG :

u plus faible en CPL qu'en CPG, H plus petit en CPL qu'en CPG, mais L plus grand en CPG (≈ 50 m) qu'en CPL (25 à 50 cm max (trop de pertes de charge au delà))

→ En général, meilleure efficacité en CPG (N plus grand).

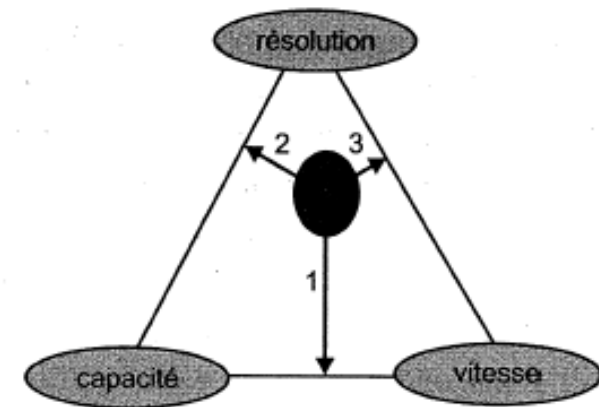
III.6. Optimisation d'une analyse chromatographique

R (facteur de résolution) dépend de \sqrt{N} , k et α

- N peut être optimisé en jouant sur H (diminution du \varnothing des particules, optimisation du \varnothing de la colonne, L , et u (Van Deemter)

- k (facteur de rétention) R augmente avec k mais le temps aussi (compromis : $1 < k < 10$). Pour augmenter k : baisser la T en CPG, modifier la composition de la phase mobile en CPL.

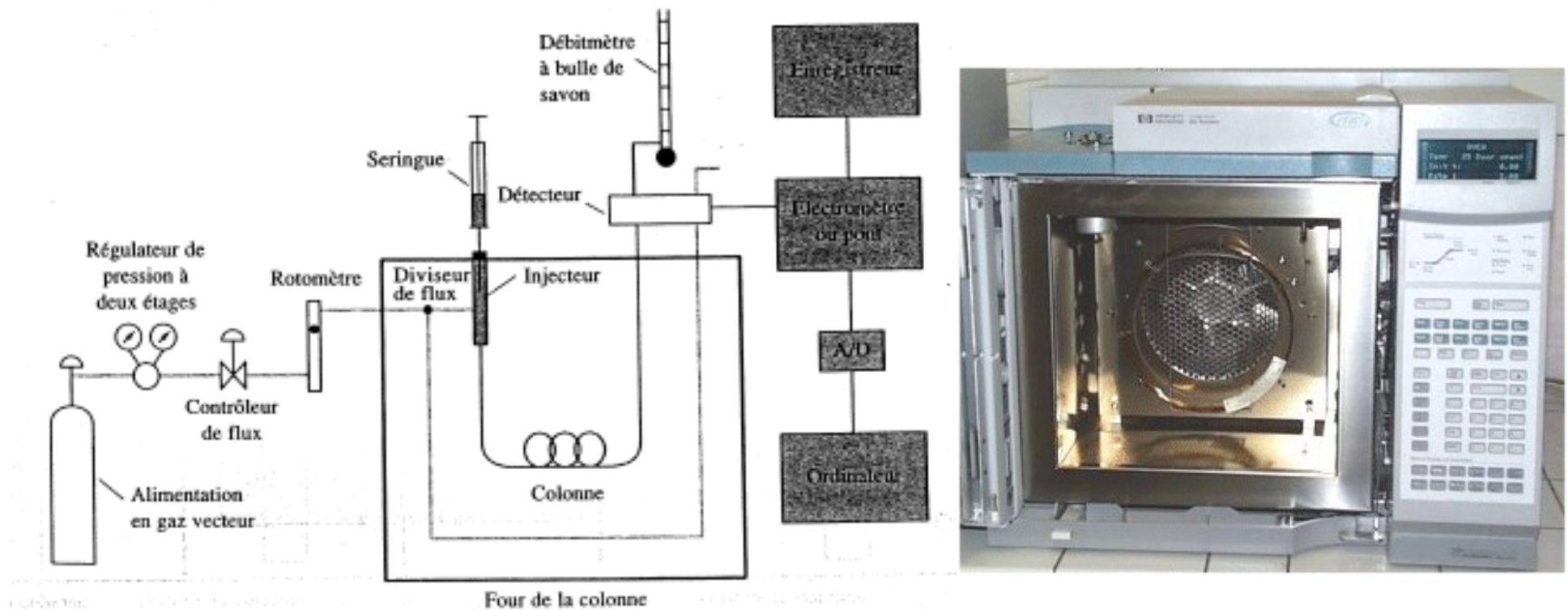
- Inutile d'optimiser N et k si α (facteur de séparation) = 1. Pour augmenter α tout en conservant $1 < k < 10$: programmation de T en CPG, modifier la composition de la phase mobile en CPL, modification de la phase stationnaire, ajouter une espèce chimique susceptible d'interagir avec certains constituants.



IV. Chromatographie en phase gazeuse

L'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne. L'élution est assurée par un flux de **gaz inerte** appelé **gaz vecteur** (phase mobile). **Il n'y a pas d'interaction entre l'analyte et la phase mobile en CPG.**

IV.1. Schéma de principe



IV.2. Alimentation en gaz vecteur

Gaz inerte vis-à-vis de l'échantillon et du garnissage de la colonne (phase stationnaire) : **He, N₂, H₂, Ar** ... (le choix du gaz dépend du détecteur utilisé).

Le gaz doit être exempt de traces d'H₂O et O₂ : gaz **purs et desséchés** (tamis moléculaire).

Contrainte : régulation du débit (u) : $\Delta \text{débit} = 1\% \rightarrow \Delta t_R = 1\%$

En général : 25 à 100 ml/mn pour les colonnes remplies
 0,5 à 5 ml/mn pour les colonnes capillaires

IV.3. Injection de l'échantillon

Microseringue (**1** μ l à 10 μ L). Injection à travers un **septum** (élastomère) dans une chambre à vaporisation instantanée (**injecteur**) située à une extrémité de la colonne.

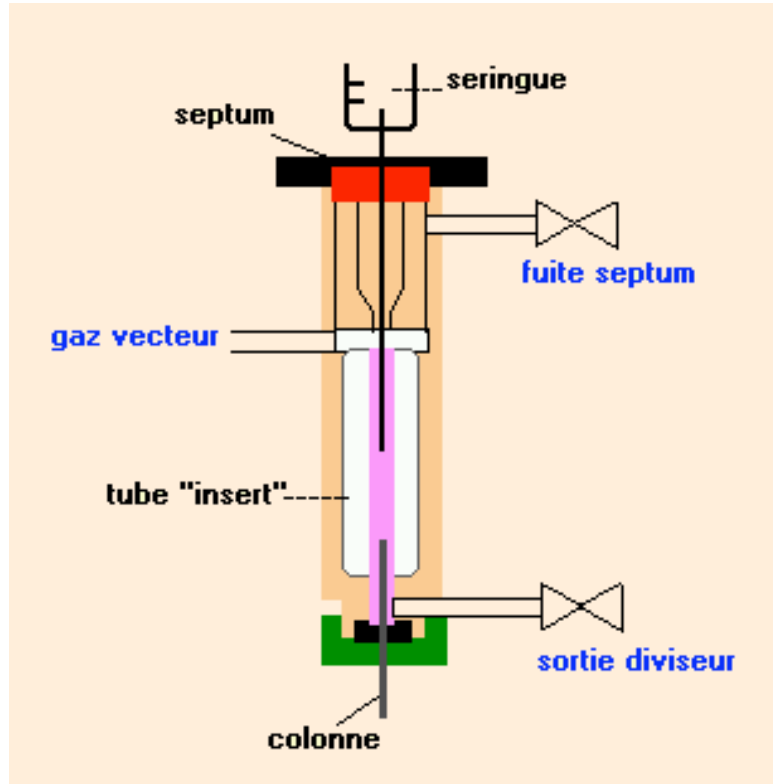
Temp. de l'injecteur : doit permettre la vaporisation mais éviter la décomposition ($\approx 50^\circ\text{C}$ au dessus du point d'ébullition du constituant le moins volatil)

Les caractéristiques de l'injecteur dépendent du type de colonne utilisé :

-**Colonnes remplies** : injection de 0,1 à 0,5 μ l de solution de l'échantillon, injecteur "classique", à vaporisation directe.

-**Colonnes capillaires** (faibles débits) : quantités très faibles, difficiles à mesurer : injecteur avec ou sans division (split/splitless)

Injecteur split/splitless :



Mode split : le gaz vecteur pénètre dans la chambre de vaporisation avec un débit élevé (ex: 50 ml/mn), une vanne de fuite, réglable, permet d'évacuer la plus grande partie du gaz et de ne laisser entrer dans la colonne qu'une faible partie (1/20 à 1/500), ex: 1% de 50 ml/mn, soit un débit dans la colonne de 0,5 ml/mn : seulement 1% de l'échantillon injecté passe réellement sur la colonne.

Mode splitless : réservé aux solutions très diluées (analyse de traces)

Injecteur “on column” :

Injection directe, à froid (40°C), de l'échantillon à l'intérieur de la colonne (micro-seringue spéciale). La vaporisation n'a lieu qu'après le dépôt.

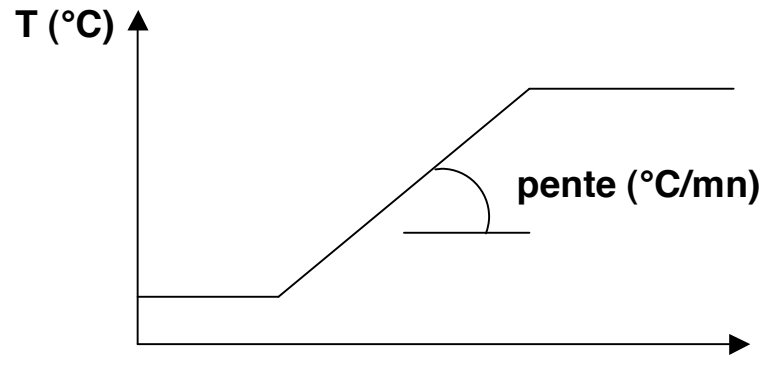
Adapté aux composés fragiles (thermodégradables), en biochimie par ex.

Injecteur à température programmable (PTV) :

Programmation de la température de la chambre d'injection de 20 à 300°C en quelques dizaines de secondes : conjugue les avantages de l'injecteur split/splitless et de l'injecteur “on column” : possibilité d'injecter à froid, en mode split, avec une seringue “classique”.

IV.3. Colonne et four

Colonne (une ou deux) dans enceinte thermostatée (40 à 400 °C) avec possibilité de programmation de température. Doit être très stable : ΔT de 1 °C \Rightarrow Δt_R de 2 à 3%.



IV.3.1. Colonnes remplies (à garnissage) (les plus anciennes)

Tube en acier inox, verre, ou téflon de 1/8 ou 1/4 de pouce de \varnothing (3,18 ou 6,35 mm) et 1 à 3 m de long, rempli d'un support poreux, inerte et stable, finement et uniformément divisé, préalablement recouvert d'une couche mince de la phase stationnaire liquide. La phase stationnaire est donc imprégnée (taux de 3 à 25%) dans les pores (pb de lessivage). Grand choix de phases stationnaires.

Support le plus utilisé : **terre de diatomées** (silicates fossiles) : chromosorb®

\varnothing moyen des grains \searrow \rightarrow efficacité \nearrow 😊 , pertes de charge \nearrow ☹.

Granulométrie = 60 à 100 mesh (0,25 à 0,15 mm) (mesh x mm = 15)

IV.3.2. Colonnes capillaires

Golay (1957), développées dans les années 70.

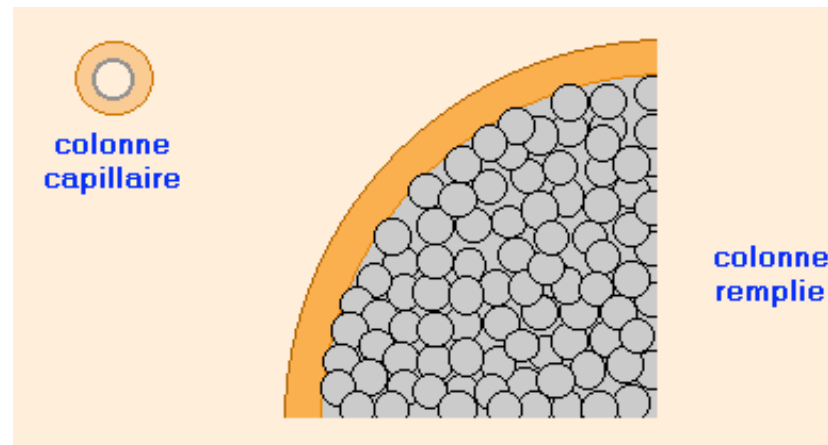
Colonnes tubulaires ouvertes : la phase stationnaire tapisse les parois internes, sous forme d'un **film** (épaisseur 0,05 à 5 μm) : **WCOT** (Wall Coated Open Tubular).

1^{ères} colonnes en acier, puis en **silice fondue** (très pure) (FSOT : Fused Silica Open Tubular) recouvert d'une gaine extérieure en polyimide (thermiquement résistant)

\varnothing intérieur = 0,1 à 0,35 mm, L = 10 à 100 m (**25 m**) enroulée en spirales de $\varnothing \approx 15$ cm

☺ : Grande efficacité → **200000 plateaux** (≈ 1000 pour une colonne remplie). A noter que le terme de remplissage A de l'eqt de Van Deemter est ici nul.

☹ : coût, fragilité (casse, oxydation), faible capacité → **injecteur split-splitless**.



IV.4. La phase stationnaire

- faible tension de vapeur (Eb. au moins 100 °C > à la T_{\max} d'utilisation de la colonne;
- stabilité thermique;
- inertie chimique;
- propriétés telles que les valeurs k et α soient correctes.

Colonnes remplies :

Grand choix de phases stationnaires, facile à mettre en œuvre car simple imprégnation dans les pores du support.

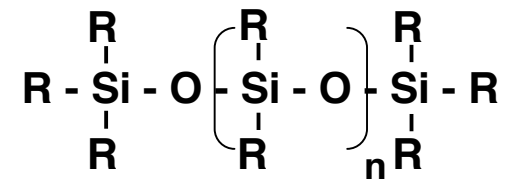
Classement de 200 phases stationnaires (Mc Reynolds) $\rightarrow \Delta I = I_{\text{phase}} - I_{\text{squalane}}$

(I = indice de rétention de Kovats, squalane ($C_{30}H_{62}$) phase stationnaire de référence, la moins polaire)

Colonnes capillaires :

Choix beaucoup plus limité (phases pouvant conduire à la formation d'un film greffé) :

Polysiloxanes :



R = Me : polydiméthylsiloxane (OV1 ou SE30) apolaire.

Possibilité de substituer des groupes Me par R = Ph (5%, 50%,...), C₃H₆CF₃, C₃H₆CN :

polarité ↗

Polyéthylène glycol (PEG) :

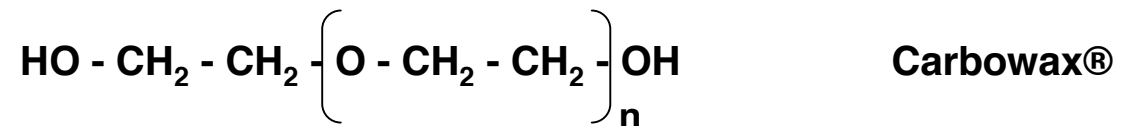


TABLEAU 29-2 Quelques phases stationnaires liquides courantes pour la chromatographie gaz-liquide

Phase stationnaire	Nom commercial	Température maximale/°C	Utilisations habituelles
Polydiméthyl siloxane	OV-1, SE-30	350	Phase non polaire à usage général ; hydrocarbures ; aromatiques polynucléaires ; médicaments ; stéroïdes ; PCB
5% Phényl-polydiméthyl siloxane	OV-3, SE-52	350	Esters méthyliques d'acides gras ; alcaloïdes ; médicaments ; composés halogénés
50% Phényl-polydiméthyl siloxane	OV-17	250	Médicaments ; stéroïdes ; pesticides ; glycols
50% Trifluoropropyl-polydiméthyl siloxane	OV-210	200	Chloroaromatiques ; nitroaromatiques ; alkylbenzènes substitués
Polyéthylène glycol	Carbowax 20M	250	Acides libres ; alcools ; éthers ; huiles essentielles ; glycols
50% Cyanopropyl-polydiméthyl siloxane	OV-275	240	Acides gras polyinsaturés ; acides de la colophane ; acides libres ; alcools

Phase stationnaire solide (chromatographie gaz/solide) :

Matériau adsorbant (silice ou alumine) déposé sous forme de fines particules très fines sur la paroi interne des colonnes capillaires : **PLOT** (Porous Large Open Tubular).

Pour séparation de gaz (N₂, CO, CO₂) et hydrocarbures très légers.

IV.5. Principaux détecteurs

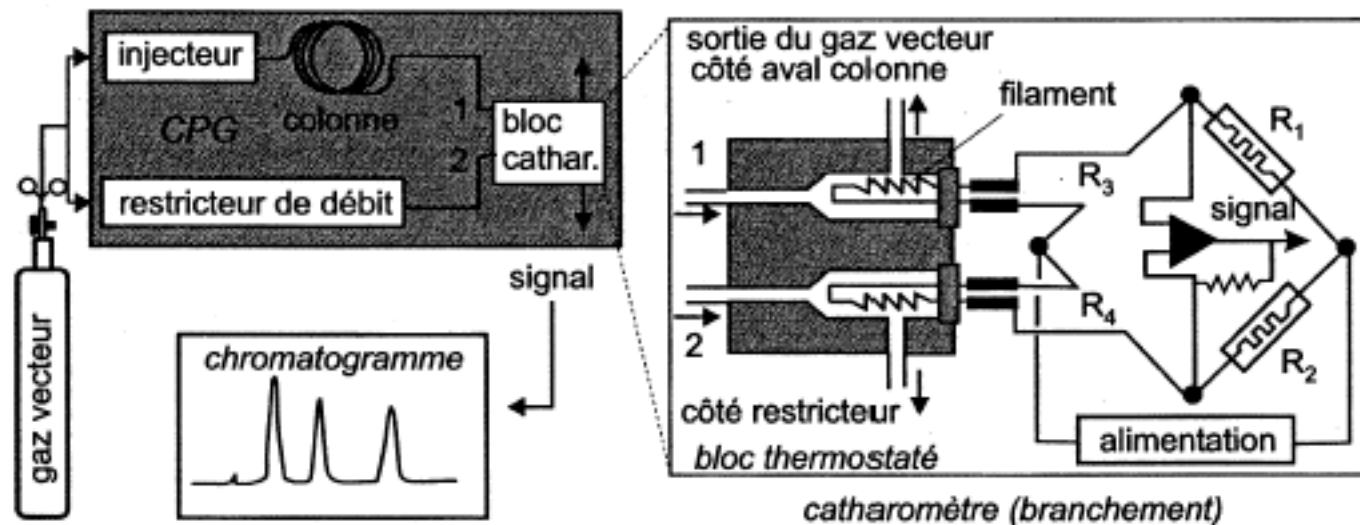
Performances du détecteur :

- **sensibilité** (10^{-8} à 10^{-15} g/s)
- **réponse linéaire** sur plusieurs décades
- **sélectivité** : détecteurs universels ou sélectifs / classe de composés.

IV.5.1. Détecteur à conductivité thermique (TCD) ou catharomètre

Mesure des variations de la conductivité thermique du gaz vecteur (**H₂ ou He**) 6 à 10 x > à la plupart des produits organiques

→ Présence de molécules → ↓ de la conductivité thermique (÷ []) → ↑ de la T° du détecteur (filament Pt, Au ou W) : système différentiel (pont de Wheatstone)



😊 : simple, linéarité 10^5 , universel, non destructif, colonnes remplies ou capillaires

😞 : sensibilité (10^{-8} g/s).

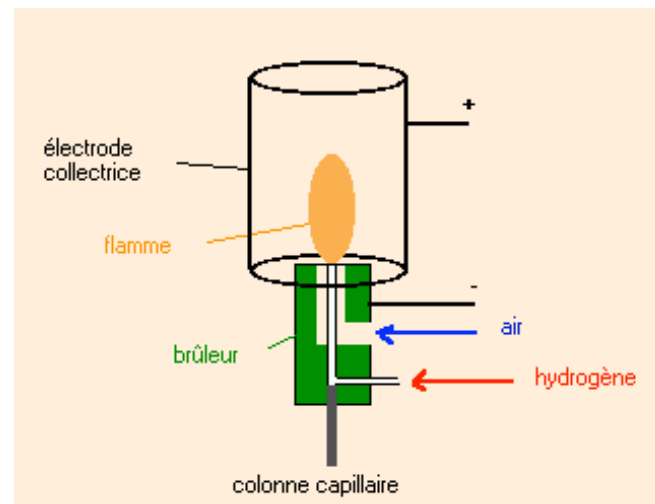
IV.5.2. Détecteur à ionisation de flamme (FID) (le plus utilisé).

La phase mobile pénètre dans un brûleur alimenté par un mélange H_2 + air → combustion, production d'ions et d'électrons → faible courant électrique amplifié par un électromètre.

L'aire du pic est ici ÷ à la masse et non à la [], donc non dépendante des variations de débit de la phase mobile .

😊 : forte sensibilité (10^{-13} g/s), linéarité (10^7 - 10^8), quasi-universel

😞 : destructif (pyrolyse)



IV.5.3. Autres détecteurs

- **Détecteur thermoionique :**

Semblable au FID + céramique en silicate de Rb ou Cs à l'extrémité de la flamme : formation d'un plasma dans lequel se forme un nombre élevé d'ions en présence de molécules phosphorées ou azotées.

→ Sélectif aux composés contenant P et N (applications : pesticides,...)

- **Détecteur à photométrie de flamme :** excitation des éléments par de la lumière à des λ caractéristiques (526 nm pour P, 394 pour S)

- **Détecteur à capture d'électrons** (composés halogénés)

- **Méthodes couplées :** information structurales

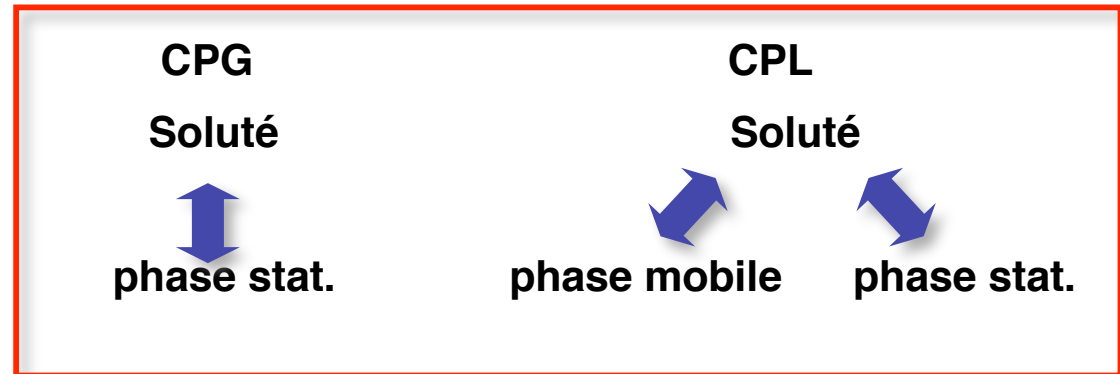
 - Détecteur IR

 - Détecteur de masse : GC-MS : spectromètre de basse résolution (souvent quadripôle)

V. Chromatographie Liquide Haute Performance

≠ CPL / CPG :

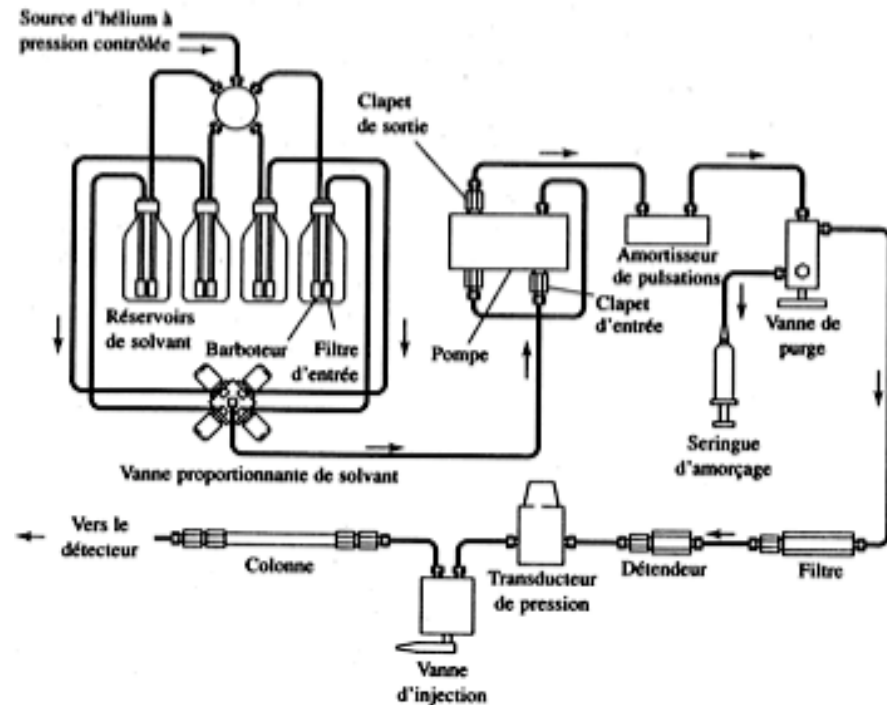
- + général : composés thermosensibles, très polaires (ions), peu volatils (macromolécules)
- efficacité moindre (L + faible)
- + d'interactions :



Ø moyen des grains \searrow → efficacité \nearrow (terme A \searrow), pertes de charge \nearrow .

Ø = 3 à 10 μm : nécessité de "pousser" la phase mobile → **P \approx 400 bars : CLHP (HPLC)**

V.1. Appareillage.



Éléments reliés entre eux par des tubes ($\varnothing = 0,1$ mm) en inox ou PEEK®

V.1.1. Réservoirs de phase mobile (solvants très purs)

Verre ou inox ($V = 0,5$ à 2L)

Filtre (poussières), dégazage (barbotage de gaz inerte)

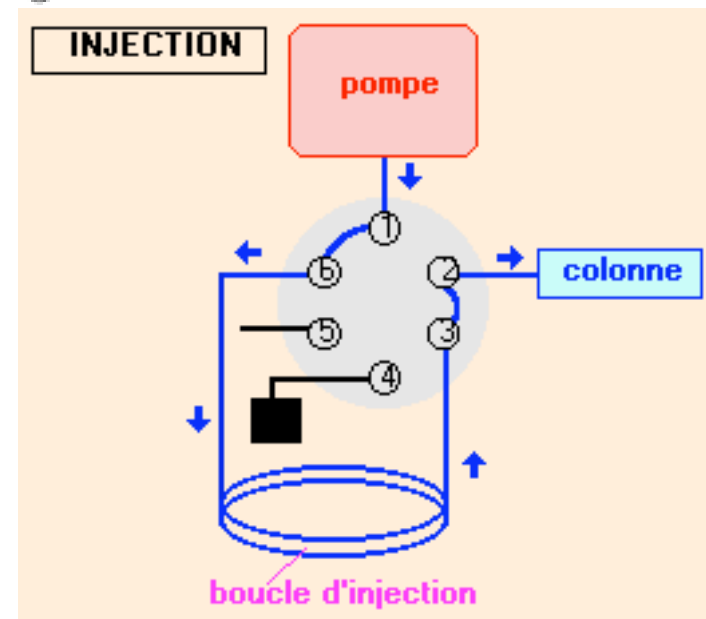
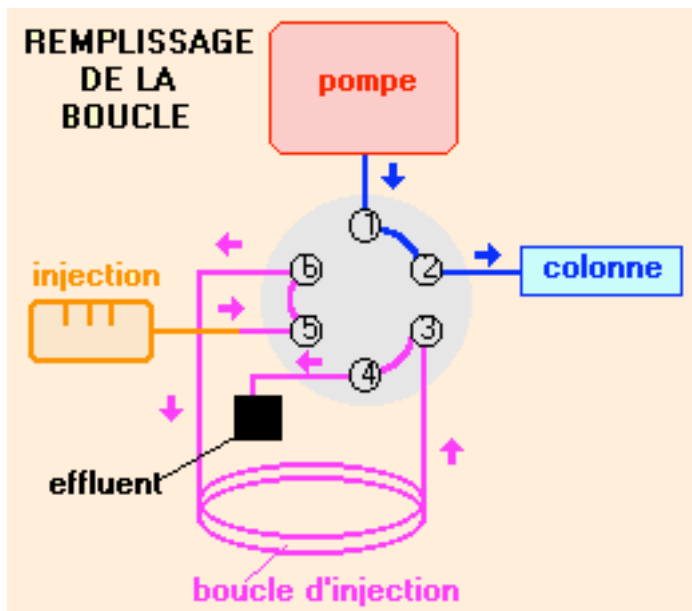
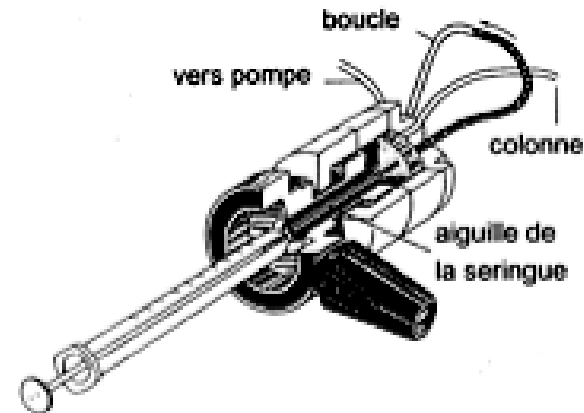
- Mode **isocratique** (éluant unique)
- Mode **gradient d'élution** (mélange de solvants)

V.1.2. Système de pompage

- P → 420 bars
- pas de pulsation : pompes à piston alternatif
- 0,1 < débit < 10 ml/min ($\Delta = 0,5 \%$)
- résistance à la corrosion

V.1.3. Injecteurs

Vanne d'injection à boucle ($5\mu\text{L} < V < 500\mu\text{L}$)

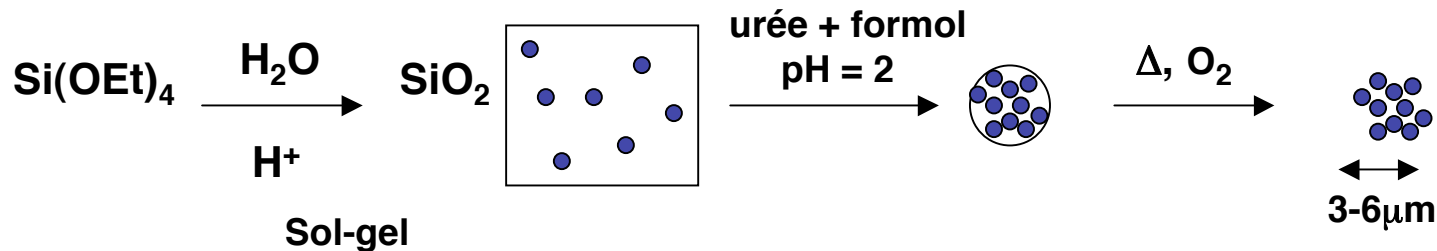


V.1.4. Colonnes

“standard” : **Inox** ($5 \text{ cm} < L < 30 \text{ cm}$, $4 \text{ mm} < \varnothing_{\text{int.}} < 10 \text{ mm}$), efficacité $\approx 50\,000$ plateaux / m

Micro-colonnes ($L \approx 5 \text{ cm}$, $\varnothing_{\text{int.}} \approx 1 \text{ mm}$, $\approx 100\,000$ plateaux / m) : rapidité, faibles volumes de solvants

Matériau de remplissage : **gel de silice** préparé par procédé sol-gel



silice \neq celle utilisée en CPL préparative (sable $\rightarrow \text{Na}_2\text{SiO}_3 \rightarrow \text{Si(OH)}_4 \rightarrow \text{SiO}_2$)

Propriétés et caractéristiques de la silice :

- **polaire** (silanols Si-OH), ≈ 5 silanols / μm^2
- **poreux** : \varnothing moyen des pores, distribution poreuse, surface spécifique ($\approx 350 \text{ m}^2/\text{g}$)
- **adsorbant** : CPL préparative = CLS (chromato d'adsorption),
CLHP = CLL, plus exactement Liquide -Phase greffée (chromato de partage)
 \rightarrow **la silice est donc modifiée.**

V.1.5. Détecteurs

- **sensibilité** : limite de détection (LD) : signal / bruit ≈ 2
- **réponse linéaire** sur un large domaine de []

a. Détecteur spectrophotométrique (absorbance)

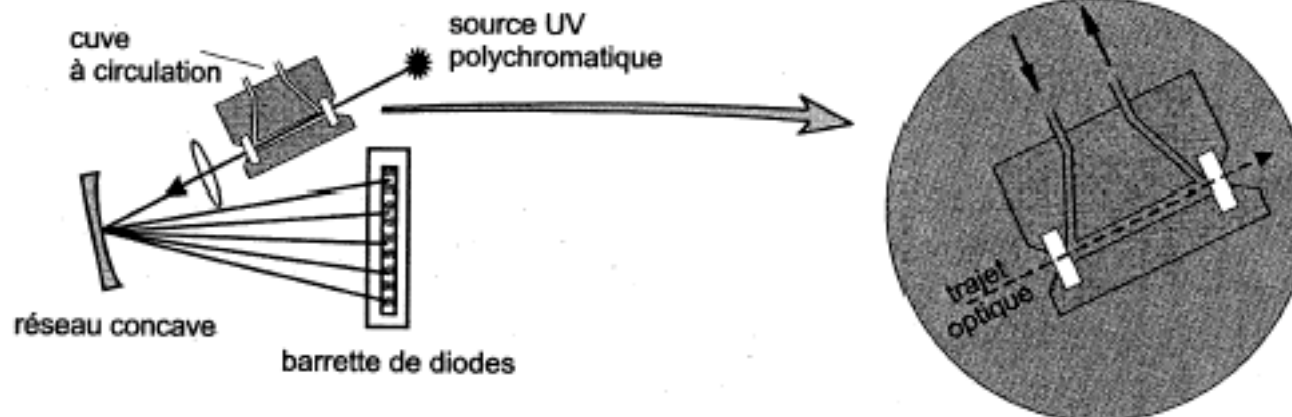
- monochromatique :

source (D ou vapeur de Hg), monochromateur (ex. raie 254 nm du Hg), cellule, PM

Sélectif : la détection dépend de ϵ de chaque espèce à la λ choisie. LD $\approx 0,3$ ng / ml,

linéarité $\approx 10^4$

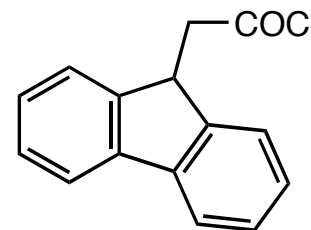
- polychromatique :



b. Détecteur spectrofluorimétrique (fluorescence)

Peu de composés fluorescents naturellement → dérivatisation : ex. Fmoc pour les amines

😊 Très sensible : LD \approx 8 pg / mL, linéarité \approx 10⁴



c. Réfractomètre (indice de réfraction)

Variation de l'indice de réfraction / présence de soluté dans le solvant

😊 Universel

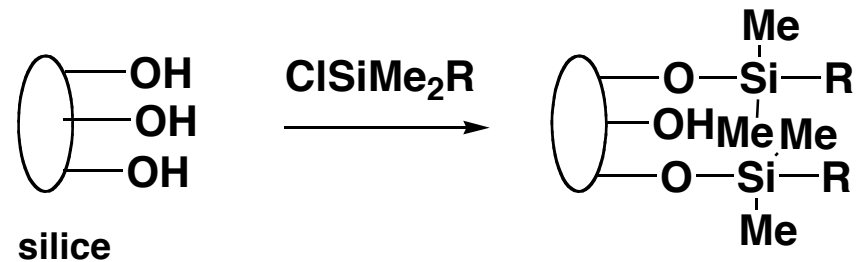
😞 Peu sensible (\approx 1 μ g / mL), Utilisable seulement en mode isocratique.

d. Autres détecteurs

- électrochimiques (mesures potentiométriques, conductimétriques, voltampérométriques)
- couplage / spectromètre de masse (electrospray) voire RMN.

V.2. Phase stationnaire

Phases greffées : silanisation de silices



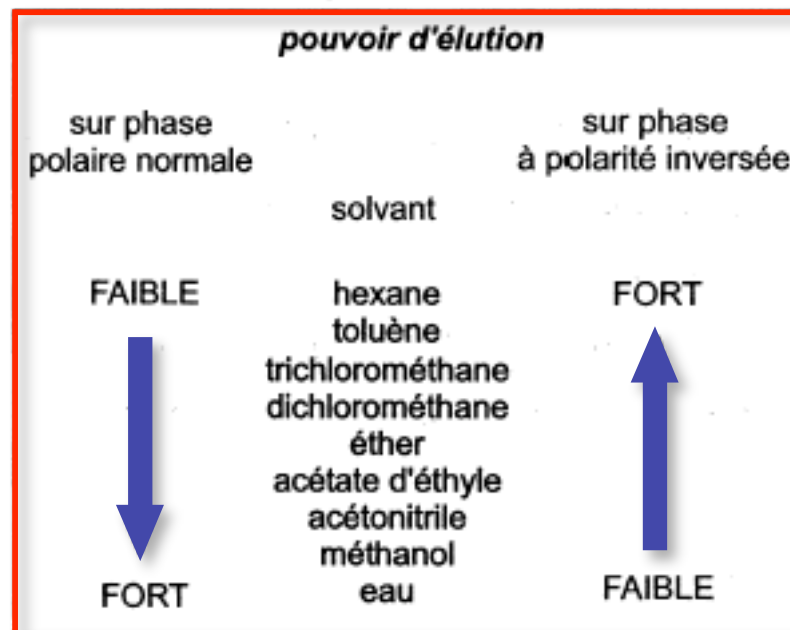
V.2.1. Phases polaires ou "normales"

- fonctions amine : $R = -(CH_2)_n-NH_2$
 $R = -(CH_2)_n-NMe_2$
 $R = -(CH_2)_3-NH-(CH_2)_2-NH_2$
- fonctions diol : $R = -(CH_2)_3-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$
- fonctions nitrile : $R = -(CH_2)_n-CN \quad \dots$

V.2.2. Phases apolaires ou "à polarité inversée" (phases inverses)

- groupes alkyle ou aryle : $R = -(CH_2)_7-CH_3$ RP-8 (diméthyl-octylsilane)
 $R = -(CH_2)_{17}-CH_3$ RP-18 (diméthyl-octadécylsilane)
 $R = -(CH_2)_n-Ph \quad \dots$

V.3. Phase mobile



Chromatographie “normale” :

Les composés les plus polaires
sont davantage retenus

Chromatographie “inverse” :

Les composés les plus polaires
sont élués en premier

polarités de quelques familles de composés

peu polaire -----> très polaire

hydrocarbures

aldéhydes et cétones

alcools

phénols

acides

hydroxyacides

amines tertiaires

amines secondaires

amines primaires

polarités de quelques types de phases stationnaires

C18 - C8

phényl (- C6H5)

nitrile (CN)

silice (SiO2...)

amine (NH2)

diol

VI. Chromatographie par échange d'ions

Phase stationnaire = résine (polymère organique, ex styrène-DVB) échangeuse d'ions

Résine anionique (échangeuse de cations) :



forts : acide sulfonique ($\text{G}^- = \text{SO}_3^-$)

faibles : acide carboxylique ($\text{G}^- = \text{COO}^-$)

Résine cationique (échangeuse d'anions) :



forts : ammonium ($\text{G}^+ = \text{N}(\text{CH}_3)_3^+$)

faibles : amines II ou III

Applications :

- deionisation d'eau (adoucisseurs)
- séparation
- dosage d'ions

TABLEAU 28-1 Classification des méthodes chromatographiques sur colonne

Classification générale	Méthode spécifique	Phase stationnaire	Type d'équilibre
Chromatographie en phase liquide (CPL) (phase mobile liquide)	Liquide-liquide (CLL) ou partage	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre liquides non miscibles
	Liquide-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre liquide et surface greffée
	Liquide-solide (CLS) ou adsorption	Solide	Adsorption
	Échange d'ions	Résine échangeuse d'ions	Échange d'ions
Chromatographie en phase gazeuse (CPG) (phase mobile : gaz)	Liquide-gel (CLG) ou perméation	Liquide dans les interstices d'un solide polymérique	Partage/tamisage
	Gaz-liquide (CGL)	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre gaz et liquide
	Gaz-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre gaz et surface greffée
Chromatographie en fluide supercritique (CFS)(phase mobile : fluide supercritique)	Gaz-solide (CGS)	Solide	Adsorption
		Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre fluide supercritique et surface greffée