

LES METHODES DE SEPARATION ET CHROMATOGRAPHIE

I-Aspects généraux

1-Introduction:

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants de mélanges variés, utilisée en analyse à des fins d'identification et de quantification.

La principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support plan et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Par un bon choix des deux phases, les composés présents dans un mélange sont généralement entraînés à des vitesses différentes ce qui provoque leur séparation.

2-Définition:

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation, au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux.

3-Classification des techniques chromatographiques:

3-1-classification selon la nature des phases:

A-selon la nature de la phase mobile on distingue:

- La chromatographie en phase gazeuse CPL.
- La chromatographie en phase gazeuse CPG.
- La chromatographie en phase gazeuse super critique (C.P.S).

B-selon la nature de la phase stationnaire on distingue:

- La chromatographie (gaz/solide (C.G.S)).
- La chromatographie (gaz/liquide (C.G.L)).
- La chromatographie (Liquide/solide (C.L.S)).
- La chromatographie (Liquide/liquide (C.L.L)).

3-2-Classification selon la technique mis en jeu:

Selon la technologie mise en jeu on distingue:

- La chromatographie sur colonne.
- La chromatographie de surface (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

3-3-Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu:

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

- - La chromatographie d'adsorption, de partage, d'exclusion et d'échange d'ions.
- -La chromatographie d'adsorption (L S C, G S C) lorsque la phase stationnaire est un solide.

La chromatographie de partage (LCC, GLC):

Lorsque la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels, acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.

-La chromatographie d'exclusion (S.E.C): ou la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille.

4- La chromatogramme:

C'est une courbe qui traduit la variation ou cours du temps d'un paramètre relié à la concentration ou à la quantité, du soluté en sortie de colonne, un constituant est caractérisé par son temps de rétention t_R , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié.

-un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_m appelé "temps mort". La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé (t'_R).

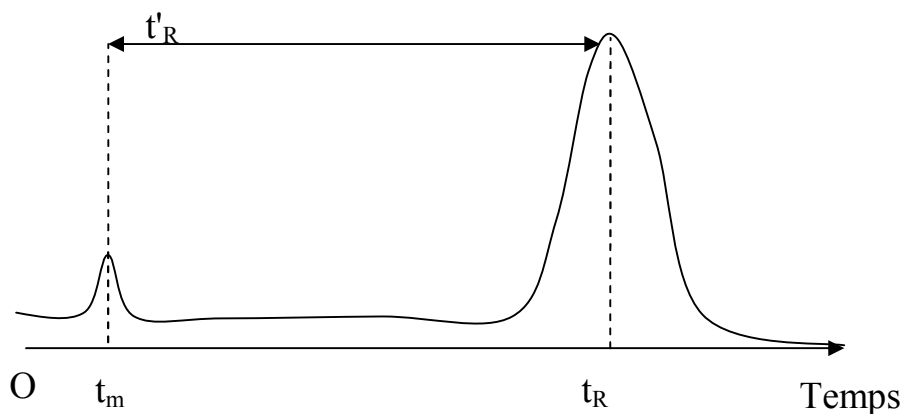


fig01: courbe d'éluion en chromatographie.

5-Grandeurs de rétention:

5-1-temps de rétention:

La définition du temps de rétention a été précédemment donnée dans le paragraphe précédant.

5-2-Volume de rétention V_R : (volume d'éluion de soluté).

Le volume de phase mobile nécessaire pour faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum de pic si le début (D) est stationnaire, ou a:

$$V_R = t_R * D$$

5-3-Volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort V_M):

-Le volume interstitiel accessible. Il peut être calculé à partir du chromatogramme d'un soluté non retenu par la phase stationnaire.

$$V_M = t_M * D$$

5-4-Facteur de rétention K (ou de capacité):

Quand un composé de masse totale m_T est introduit dans la colonne, il se répartit en deux quantités.

m_M dans la phase mobile est m_S dans la phase stationnaire si on change pas les conditions opératoires, ces deux quantité demeurent constant au cours de sa migration dans la colonne leur rapport appelé: facteur de rétention.

$$K = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S * V_S}{C_M * V_M} = K \frac{V_S}{V_M}$$

Le facteur de rétention K encore appelé facteur de capacité: "- L'expression facteur de capacité: présente une possibilité de confusion avec la capacité d'une colonne qui est la mesure maximale de soluté que peut retenir la colonne sans être saturée.

$$K = \frac{T_R}{T_M}$$

***Facteur de séparation (sélectivité):**

La facteur de séparation (α) permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents 1 et 2 sur un chromatogramme. Il est défini par la relation suivantes:

$$\alpha = \frac{T'_R2}{t'_R1} \quad \text{ou} \quad \alpha = \frac{K_2}{K_1}$$

***Facteur de résolution:**

Pour traduire numériquement la plus ou moins bonne séparation entre deux composées, on utilise le facteur de résolution R qui est calculé à partir du chromatogramme

$$R = 2 \frac{T'_{R2} - T_{R1}}{W_1 + W_2}$$

***Chromatographie liquide-classique:**

I-chromatographie sur couche mince (CCM):

1-1-Introduction:

La chromatographie planaire, ou sur couche mince (CCM), est une technique de chromatographie liquide dont la phase stationnaire recouvre un support plan; la phase mobile progressant dans la phase stationnaire sous l'effet, des forces de capillarité.

-La vitesse de migration d'une espèce chimique est la résultante de:

- 1- la force d'entraînement par solvant (solubilité).
- 2- La force de rétention par le gel (adsorption).

Ces deux forces dépendent à leur tour de la nature du composé, de la nature des phases et de la température.

-La séparation par (CCM) est réalisée sur une fine couche (100-200 um) de phase stationnaire généralement à base de gel de silice déposée sur une plaque rectangulaire de verre de plastique ou d'aluminium.

-On distingue trois étapes:

1- Le dépôt de l'échantillon.

2-Le développement de la plaque.

3-La révélation.

1-Dépôt de l'échantillon:

On commence par déposer par capillarité un petit volume de l'échantillon en solution dans un solvant convenable, à proximité du bord inférieur, de la plaque. Le dépôt par capillarité est réalisé soit manuellement, soit de manière automatique avec un capillaire à extrémité plane.

2-Développement de la plaque:

La plaque, ainsi préparée, est introduite dans une cuve de développement il s'agit d'une cuve munie d'un couvercle, au fond de la quelle se trouve un peu de la phase mobile servant d'éluant.

L'endroit où l'échantillon à été déposé doit être situé ou dessus du niveau d'immersion. La phase mobile migre verticalement par capillarité à travers la phase stationnaire en équilibre avec différentes constituants à séparer.

Quand le front de solvant a parcouru une distance considéré comme suffisante (quelque centimètres) on retire la plaque de la cuve, on repère la position limite atteinte par la phase mobile et on évapore cette dernière.

3-Révélation post chromatographique:

Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque: dans le cas contraire on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches sont ensuite encerclées en crayon. Les méthodes de révélation sont (iode . radiation UV.etc).

*Les flavonoïdes sont revêtés par (vaniline, acide sulfurique). Réactif de neuve, $FeCl_3$...etc.

Les sucres sont révélés par le réactif de molisch les acides aminés sont révélés par le minhydrine "couleur bleu vert".

***Paramètres de séparation et de rétention:**

a-Rapport frontal:

*Chaque composé est défini par son R_f .

"Retardation factor" qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant.

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance par courue par le front de solvant}}$$

$$R_f = \frac{x}{y} \dots (1.1)$$

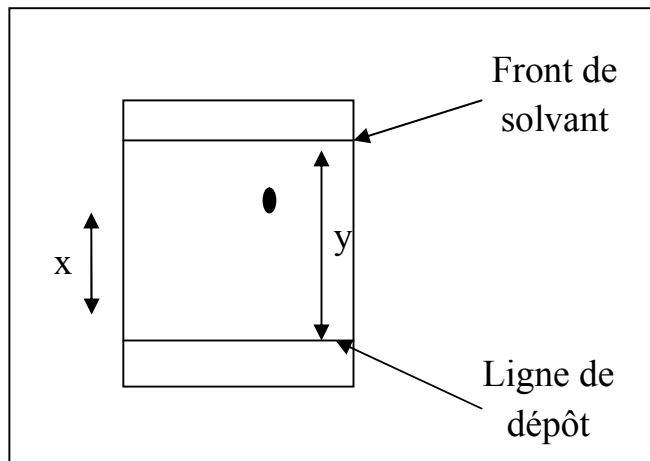


Fig1: Plaque CCM.

b-L'efficacité N de la plaque:

(en définit l'efficacité (N) d'une plaque (CCM)).

*On définit l'efficacité (N) d'une plaque pour un composé dont la distance de migration est x et le diamètre du spot (w) par la relation (1-c).

$$N = 16 \cdot \frac{x^2}{w^2}$$

-L'auteur de plateau théorique H

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

La résolution est exprimée par la relation:

$$R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_2 + w_1}$$

-Le facteur de rétention $K = \frac{1}{R_f} - 1$

$$R = \frac{x}{y} = \frac{\mu}{\mu_0} = \frac{1}{K + 1}$$

μ et μ_0 : vitesse de migration.

***L'application:**

La chromatographie sur couche mince (CCM) permet de contrôler la pureté d'un composé, purifier une petite quantité de produit (CCE).

En synthèse organique, des CCM sont utilisées pour suivre l'évolution d'une réaction.

II-La chromatographie sur papier:

Dans le cas de la chromatographie sur papier, la phase stationnaire est un liquide adsorbé ou fixé à la surface d'un solide inerte (comme du papier: par exemple): l'eau retenue naturellement par la cellulose (15 à 22% de son poids).et la phase mobile est un solvant organique saturé d'eau progressant dans la feuille de papier par capillarité. Les solutés sont séparés selon deux mécanismes:

Le partage et l'adsorption.

Le partage est le phénomène recherché de différence d'affinité des produits entre les phases stationnaire et mobile.

La phase stationnaire est généralement de l'eau, la phase mobile non polaire migre par capillarité. La séparation, des solutés s'effectue par partage entre les deux solvants de polarité différente et de par leur non miscibilité. Cette technique peut être ascendante ou descendante.

III-La chromatographie sur colonne: (CCL)

1-Définition :

La chromatographie (CCL) est une méthode préparatrice, elle permet la séparation des constituants, d'un mélange et leur isolement à partir d'échantillons.

-Selon la nature de la phase stationnaire, on peut distinguer 4 types de chromatographie:

- 1- Chromatographie d'adsorption.
- 2- Chromatographie de partage.
- 3- Chromatographie par échange d'ions.
- 4- Chromatographie par exclusion de taille.

La chromatographie d'adsorption sur colonne est la chromatographie standard. La colonne peut être en verre en pyrex. La dimension de la colonne doit être adaptée à la quantité à chromatographier (largeur et hauteur).

2-Les facteurs de séparation :

- 1-l'adsorbant
- 2-l'éluant
- 3-la dimension de la colonne
- 4-la vitesse d'élution

3-Remplissage de la colonne :

- 1-Remplissage par voie humide
- 2-Remplissage par voie sèche

4-Application :

La chromatographie sur colonne est utilisée pour purifier des produits de synthèse organique et aussi pour séparer les composants d'extraits de plantes « phytochimie ».