

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

La chromatographie:

Procédé **de séparation** et **d'analyse** des constituants d'un mélange à l'aide d'un solvant mobile qui les entraîne à travers une phase fixe.

La chromatographie permet de séparer et d'analyser les constituants d'un mélange en le faisant circuler à travers un milieu fixe inerte (alumine, silice...) à l'aide d'un solvant mobile (gaz, liquide) qui l'entraîne.

Chaque constituant adopte une vitesse de migration qui lui est propre en fonction de sa **solubilité dans la phase mobile** et de **son affinité pour la phase fixe** qui tend à le retenir.

Finalement on obtient donc la séparation des constituants du mélange initial.

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Historique

- En 1906, un botaniste russe **Mikhail Semenovitch TSWETT (1872-1919)** purifie des pigments végétaux, comme la chlorophylle, sur une colonne de craie. Il donne alors à ce phénomène de séparation le nom de **chromatographie** (du grec *chrôma*, couleur et *graphein*, écrire) qu'il définit comme l'enregistrement graphique des couleurs. On assiste alors à la naissance de la chromatographie.
- En 1952, les biochimistes **A. J. P Martin et R. L. M. Synge** reçoivent le prix Nobel de chimie pour leur contribution au développement de la chromatographie moderne.
- En 1967 : Début de la chromatographie liquide haute performance (**HUBER et HUZSMAN**)

La chromatographie a connu un essor important durant ces 50 dernières années dont l'origine tient, dans une large mesure, au fait que se trouvent associés une méthode séparative rapide et performante couplée à des détecteurs sensibles et variés.

Aujourd'hui :

- a) Chromatographie préparative : analyses qualitatives et quantitative (recherche, laboratoire, fabrication)
- b) Chromatographie analytique : (recherche, synthèse).

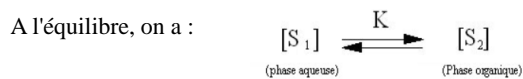
COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Principe de chromatographie

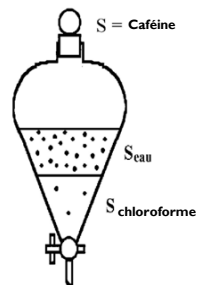
La chromatographie est une méthode basée sur la différence de miscibilité d'un soluté entre deux phases. Cette méthode s'apparente à l'**extraction**.

Le principe de l'extraction est simple :

Soit un soluté **S** réparti entre 2 phases non miscibles (1) et (2).



avec la constante d'équilibre $K = [S_2]/[S_1]$,
K s'appelle aussi le coefficient de partage.



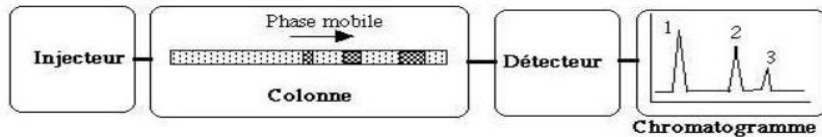
Exemple: extraction de la caféine avec du chloroforme dans une décoction de thé.

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

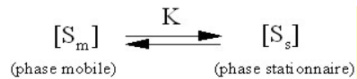
Principe de chromatographie

Comme l'extraction la chromatographie est une méthode basée sur la différence de solvation d'un soluté **S** entre deux phases.

1. une phase mobile (**pm**) qui est un fluide qui traverse la colonne
2. une phase stationnaire (**ps**) qui est une substance fixée sur la colonne



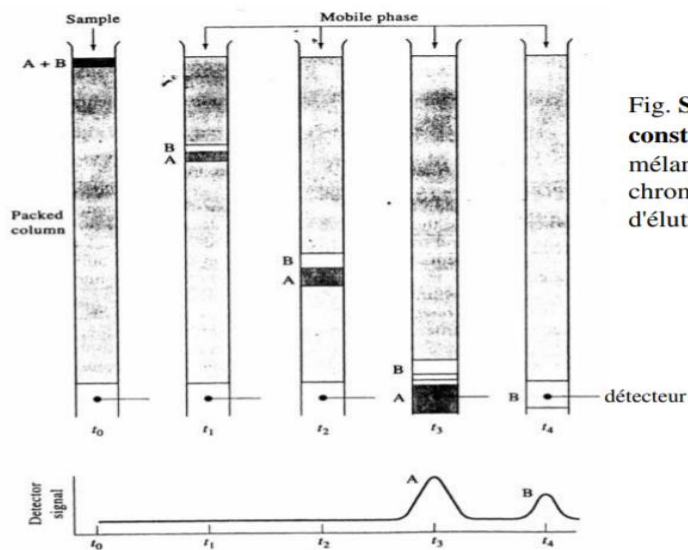
Avec l'équilibre suivant :



L'élution d'un soluté **S** en chromatographie est donc caractérisée par la constante d'équilibre **K**, appelée aussi constante de partition.

Suivant la valeur de **K** le produit sera plus ou moins retenu sur la colonne, il sera "élué" plus ou moins rapidement.

COURS DE CHROMATOGRAPHIE



**Fig. Séparation des
constituants d'un
mélange par
chromatographie
d'élution sur colonne.**

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Principe général de tous les types de chromatographie

Les méthodes chromatographiques, bien que très diverses, mettent en jeu un certain nombre de principes communs :

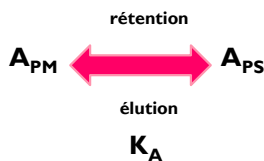
- ☐ les substances se répartissent entre deux phases non miscibles, selon un équilibre lié à un coefficient de partition, qui dépend à la fois de la nature des composés et de celle des deux phases considérées.
- ☐ le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne une succession d'autres équilibres, ce qui se traduit par une migration des substances le long de la phase stationnaire.
- ☐ la séparation est obtenue car chaque composé migre avec une vitesse qui lui est propre et dépend du coefficient de partition.

On peut classer les différents types de chromatographies de plusieurs façons différentes selon que l'on considère la nature des phases utilisées ou les mécanismes de séparation des composés.

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Chromatographie grandeurs de rétention :

Coefficient de distribution: K_A



$$K_A = \frac{[A]_{PS}}{[A]_{PM}}$$

- ✓ Rapport entre la concentration du composé dans la phase stationnaire et la concentration du composé dans la phase mobile
- ✓ Traduit l'importance relative des forces intermoléculaires qui existent entre le composé et les 2 phases

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Classification: selon la nature des phases

- a) la phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz ,soit encore un fluide supercritique
- b) la phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide (fixé sur un support solide).

La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- chromatographie liquide—solide (LSC)
- chromatographie liquide—liquide (LLC)
- chromatographie gaz—solide (GSC ou GC)
- chromatographie gaz—liquide (GLC ou GC)
- la chromatographie supercritique (SFC)

La SFC représente un cas intermédiaire entre LC et GC, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Classification: selon le phénomène chromatographique

Ce dernier dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée. On distinguera donc :

- A. La chromatographie **d'adsorption** (LSC, GSC) (lorsque la phase stationnaire est un solide); par extension on pourrait y rattacher la chromatographie d'affinité, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).
- B. La chromatographie de **partage** (LLC, GLC), lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).
- C. La chromatographie **d'échange d'ions** (IEC), où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.
- D. La chromatographie **d'exclusion** (SEC) où la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel (GPC).

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Classification: selon la nature des phases et processus mis en jeu

PHASE MOBILE	PHASE STATIONNAIRE	METHODE CHROMATOGRAPHIQUE
Gaz	Solide	C.G.S
Gaz	Liquide	C.G.L
Liquide	Solide	C.L.S
Liquide	Liquide	C.L.L

MECANISMES	METHODES CHROMATOGRAPHIQUES
Adsorption	C.G.S et C.L.S
Partition	C.G.L et C.L.L
Echanges d'ions	C.L.S
Perméations	C.L.S

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Classification: selon les procédés utilisés

Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :

- 1) La chromatographie sur colonne
- 2) La chromatographie sur papier
- 3) La chromatographie sur couche mince.

Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera

- 1) La chromatographie par développement (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire)
- 2) La chromatographie d'élution (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Classification: selon les paramètres intervenant dans la séparation

Les paramètres physico-chimiques sur lesquels reposent les principes de séparation sont :

- a) La polarité et/ou l'hydrophobicité : polarité de phase normale ou inversée
- b) La charge électrique : échange d'ions
- c) La taille et la forme (en fait, le volume) : exclusion ou perméation de gel
- d) L'existence de structures particulières qui permettent d'établir des liaisons spécifiques : chromatographie d'affinité

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

LES GELS DE SILICE :

C'est la phase stationnaire la plus utilisée en chromatographie et notamment en C.L.H.P.

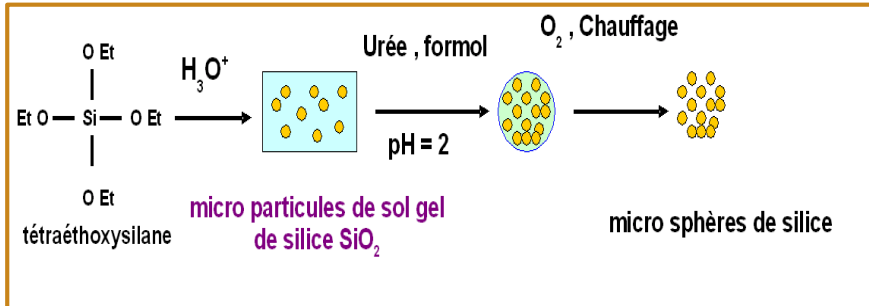
Le gel de silice est constitué de micro sphères de diamètre sensiblement constant pouvant varier de 2 à 5 μm .

Le diamètre doit être le même pour toutes les particules si on veut éviter la création de chemins préférentiels

Ces micro sphères sont obtenues par agglutination en présence d'un liant organique urée/formol de microparticules (appelées sol-gel) elles mêmes obtenues par polymérisation puis hydrolyse contrôlée du tétraéthoxysilane. (voir schéma).

Le traitement final est une pyrolyse qui conduit au micro sphères de silice qui seront utilisées pour le garnissage des colonnes.

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

LES GELS DE SILICE :Remarque :

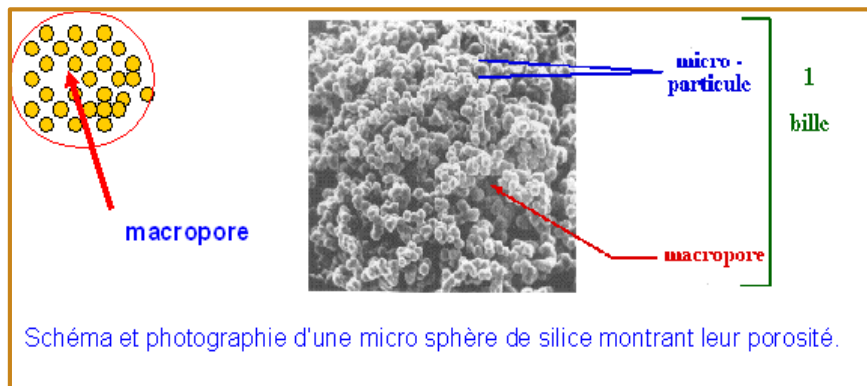
1. Les gels de silice sont stables dans une grande gamme de pH mais ils ne supportent pas des pH trop extrêmes.
2. Il y a des risques de dissolution pour des pH trop acides ou trop basiques, on se limite donc à la gamme $2 < \text{pH} < 12$.
3. Des gels spéciaux existent pour une utilisation à pH extrêmes.

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

LES GELS DE SILICE :

Une vue agrandie d'une micro sphère ressemblerait à la figure suivante où l'on voit que ces sphères ne sont en réalité pas homogènes et régulières et qu'il existe des lacunes appelées pores.

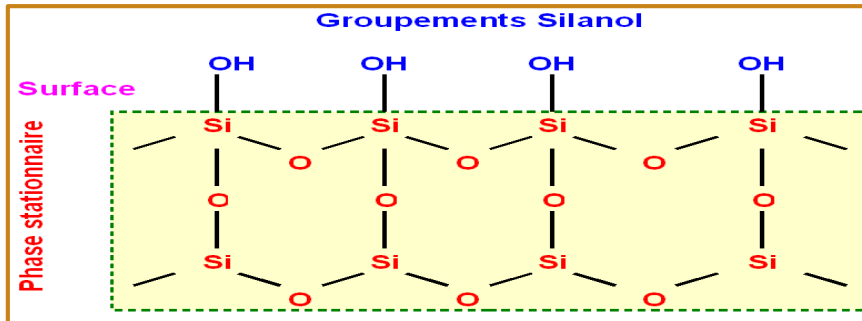
Ces pores jouent un grand rôle car elles constituent des zones d'adsorption préférentielles.



COURS DE CHROMATOGRAPHIE

LES GELS DE SILICE :

La surface des micro sphères de silice comporte des **groupement silanol** : Si – OH qui sont essentiels au phénomènes d'adsorption en particulier parce qu'il permettent la formation de liaisons hydrogène (chimie-sorbtion) et sont responsables de la polarité et de l'acidité de la silice.



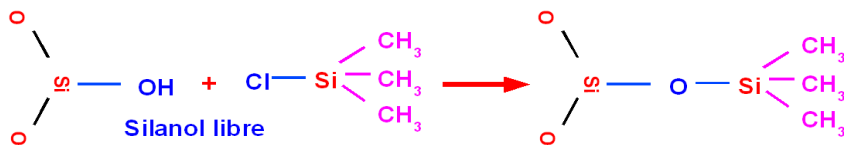
COURS DE CHROMATOGRAPHIE

LES GELS DE SILICE :

Les groupements silanols libres sont des sites préférentiels d'adsorption.

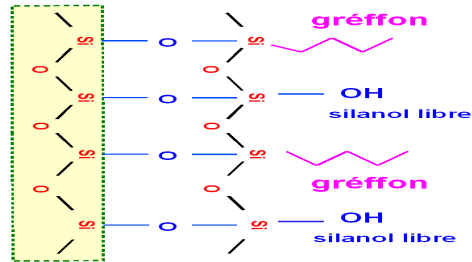
En chromatographie en phase inverse, ils sont très gênants car ils sont très polaires et ont donc une grande affinité avec les solutés polaires, et vont donc les retarder énormément. On doit donc les éliminer au maximum en phase inverse.

On utilise un procédé nommé « end capping » qui consiste à retraiter la phase greffée par un silane porteur de groupements méthyle. Une grande partie des groupements silanols est alors éliminée.

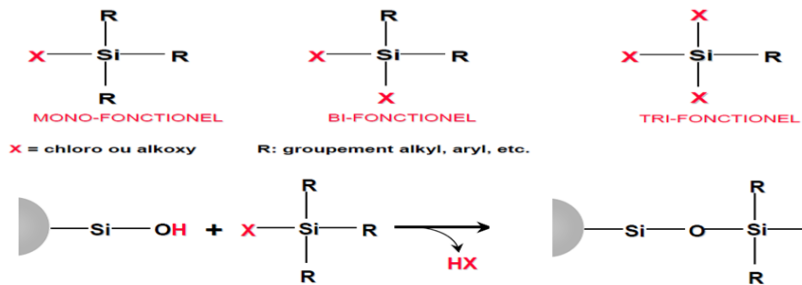


Procédé dit "end capping" : élimination des silanols libre pour la chromatographie en phase inverse

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

LES GELS DE SILICE :

Silice greffée : Les groupements silanols libres et les greffons se répartissent aléatoirement sur environ 40 à 50 % de la surface.



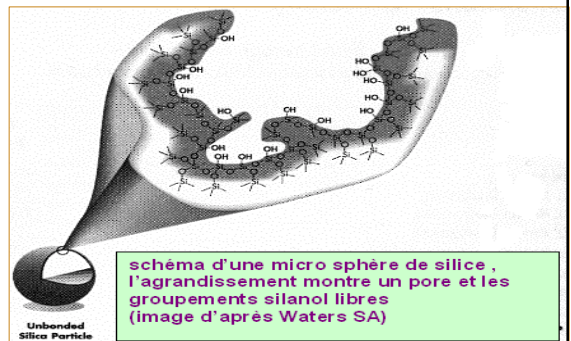
COURS DE CHROMATOGRAPHIE

LES GELS DE SILICE :

La qualité d'un gel dépend de plusieurs paramètres : **taille des grains, porosité ouverte** (dimensions et répartition des pores), **résistance à l'écrasement**, **surface spécifique**...

Les gels courants pour C.L.H.P ont les caractéristiques suivantes :

- diamètre de 2 à 5 µm,
- résistance à l'écrasement sous 1000 bars,
- surface spécifique 350 m²/g, porosité 0,7 mL / g ,
- taille des pores 10 nm.



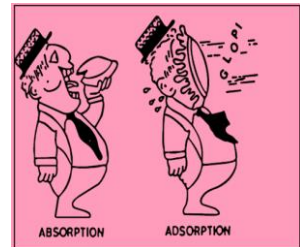
COURS DE CHROMATOGRAPHIE

LES GELS DE SILICE :

Les gels de silice ainsi obtenus sont utilisés tels quels dans la chromatographie d'adsorption



L'adsorption est le phénomène qui consiste en l'accumulation d'une substance à l'interface entre deux phases (gaz-solide, gaz-liquide, liquide-solide, liquide-liquide, solide-solide).



Il a son origine dans les forces d'attraction intermoléculaires, de nature et d'intensité variées, qui sont responsables de la cohésion des phases condensées, liquides ou solides.

Une molécule attirée inégalement par les autres molécules de deux phases trouvera une position énergétiquement favorable à la surface de la phase qui l'attire le plus ; celle-ci sera appelée l'adsorbant, les molécules ainsi adsorbées constituant l'adsorbat.

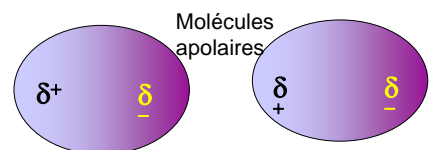
COURS DE CHROMATOGRAPHIE

On distingue deux processus différents selon que l'adsorption est d'origine purement physique : **physi-sorption** ou qu'il y a formation de liaison chimique : **chimie-sorption**.

Les processus de physi-sorption sont due essentiellement à des interactions faibles de type Van der Waals.

➤ **force de dispersion de London** : Interactions entre dipôles instantanés

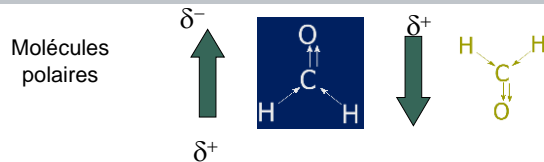
- ❖ interaction entre dipôles instantanés
- ❖ interaction présente dans tous les composés
- ❖ n'intervient qu'à courte distance
- ❖ augmentent avec la *polarisabilité* des molécules



COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Forces de Keesom

- attraction entre dipôles permanents

**Forces de Debye**

- interaction entre dipôles permanents et dipôles instantanés (ou induits)

Ces processus correspondent à des énergies faibles les composés sont alors peu retenus.

Les interactions impliquant la formation de liaison hydrogène (chimi-sorption) sont beaucoup plus fortes et les composés sont alors fortement retenus.

La phase stationnaire est un solide finement divisé et de nature fortement polaire.

En chromatographie liquide classique on utilise essentiellement la silice ou l'alumine.

En H.P.L.C c'est surtout les gels de silice qui sont utilisés.

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Énergie de « liaison »

Forces de London
Forces de Debye
Forces de Keesom
Liaisons hydrogène
Interactions ioniques

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

ORDRE DE POLARITÉ DES MOLÉCULES

- Hydrocarbures R-H
 - alcanes
 - alcènes
 - aromatiques
- Composés halogénés R-X
- Ethers ROR'
- Dérivés nitrés RNO_2
- Esters RCOOR'
- Dérivés carbonylés
 - aldéhydes RCHO
 - cétones RCOR'
- Amines RNH_2
- Alcools ROH
- Dérivés d'acides carboxyliques
 - amides RCONHR'
 - nitriles RCN
 - acides RCOOH
- Eau H_2O

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE OU D'ABSORPTION :

Ce type de chromatographie est basé sur la différence de solubilité d'un soluté entre deux liquides non miscibles, il s'agit d'un équilibre de partage.

Initialement, les phase stationnaires utilisées étaient constituées d'un solide poreux imbibé d'un liquide, cette technique est toujours utilisée en chromatographie gazeuse mais est quasiment abandonnée en chromatographie liquide.

En effet, il se produit un phénomène de lessivage par le solvant et le liquide imbibant le solide poreux est à la longue emporté par l'éluant.

Actuellement on utilise des gels de silice sur lesquels ont à greffé chimiquement une fonction (autre que le groupement silanol déjà présent) fixée par liaison de covalence et qui va se comporter comme un liquide fixé sur la phase stationnaire solide.

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

On distingue deux types différents selon la polarité de la phase stationnaire et celle de la phase mobile :

Chromatographie en phase normale :

- ❑ La phase stationnaire est très polaire (la phase mobile est alors généralement peu polaire), les substances sont alors éluées en sens inverse de leur polarité propre.
- ❑ Les composants peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement les solutés polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement.

Principaux greffons utilisés en phase normale :

Il s'agit de greffons comportant des fonctions de nature polaire :

- ❖ Amine NH_2
- ❖ Nitrile : CN
- ❖ Diols : $\text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$

Remarque : c'est la nature **polaire** de la phase stationnaire qui prime, la polarité de la phase mobile peut être quelconque on sera toujours en **Phase Normale**

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Chromatographie en phase inverse :

La phase stationnaire est peu polaire ou apolaire (la phase mobile est alors généralement polaire), les substances sont alors éluées dans le sens de leur polarité propre.

Les composants polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement les solutés peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement.

Principaux greffons utilisés en phase inverse :

Il s'agit de greffons comportant des fonctions de nature apolaire :

- ❖ C_2 : Diméthylsilyl
- ❖ C_8 : Octylsilyl
- ❖ C_{18} : Octadécylsilyl
- ❖ φ : phénylsilyl

Remarque : c'est la nature **apolaire** de la phase stationnaire qui prime, la polarité de la phase mobile peut être quelconque on sera toujours en **Phase Inverse**

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Chromatographie Planaire Ou Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

PRINCIPE

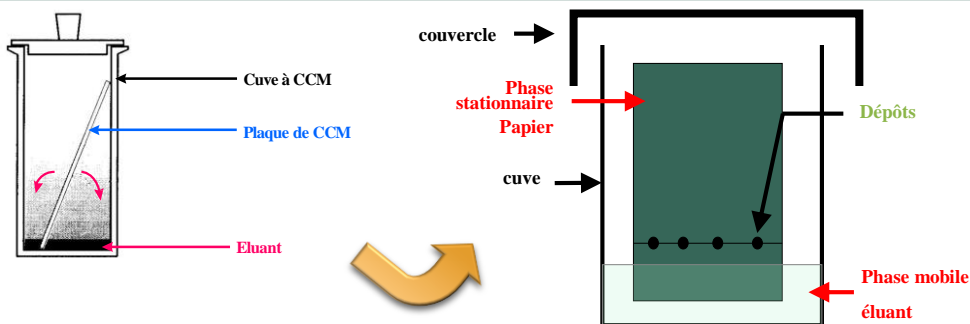
Le mélange est fixé sur un support appelé **phase stationnaire** (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium).

Le mélange est entraîné par un solvant approprié (phase mobile ou **éluant**) **qui migre par capillarité sur la plaque. Les constituants du mélange se séparent par migration** différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins **adsorbé sur la phase stationnaire.**

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

LE MONTAGE

1. Introduire la plaque dans la cuve saturée de solvant: la ligne de dépôt doit se trouver au dessus du niveau de la ligne de solvant.
2. Laisser migrer jusqu'à ce que le front du solvant se trouve à 1 cm du bord supérieur de la plaque (1h30 environ).
3. Sortir le chromatogramme, marquer légèrement la position du front de solvant au crayon de papier (pensez à identifier votre chromatoplaque).
4. Porter 10 min à l'étuve à 100°C.



COURS DE CHROMATOGRAPHIE

RÉVÉLATION

Une fois la migration terminée, l'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes :

- directement si les substances sont colorées ;
- à l'aide de révélateurs si elles sont incolores afin de les transformer en taches colorées :
 1. utilisation de produits chimiques (vapeurs de diiode ou solution de permanganate de potassium)
 2. sous rayonnement UV

Dans tous les cas, il faut noter les positions des taches colorées juste à la fin de la chromatographie en les cerclant au crayon à papier car certains produits disparaissent avec le temps.

L'ensemble des taches apparues à la fin de la chromatographie est appelé **chromatogramme**

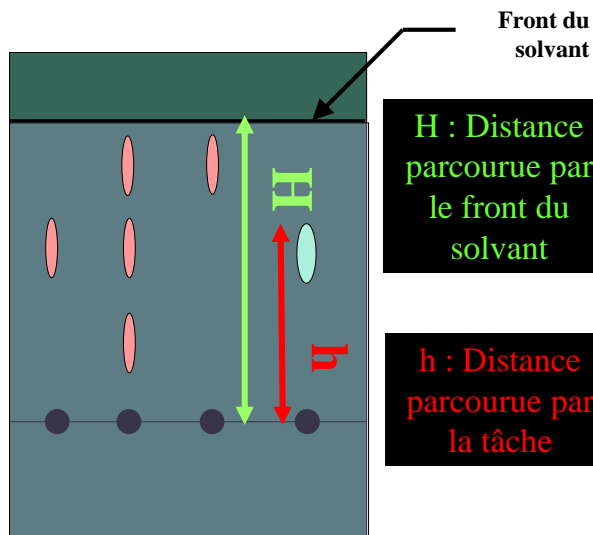
COURS DE CHROMATOGRAPHIE

RAPPORT FRONTAL D'UNE ESPÈCE CHIMIQUE:

Rapport frontal d'une espèce chimique:

$$R_f = \frac{h}{H}$$

NB : Le rapport frontal est caractéristique de l'espèce chimique et l'éluant



H : Distance parcourue par le front du solvant

h : Distance parcourue par la tache

COURS DE CHROMATOGRAPHIE

Interprétation d'un chromatogramme

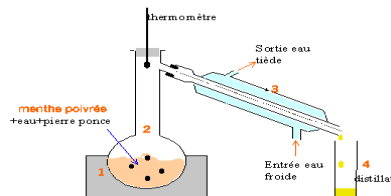
- Si le chromatogramme issu d'un dépôt contient n taches, c'est que le dépôt contenait n espèces chimiques différentes.
- Si les chromatogrammes issus de deux dépôts présentent chacun une tache à la même position c'est qu'ils contiennent la même substance.

La chromatographie permet :

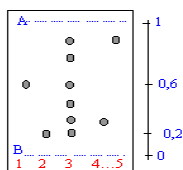
- de déterminer le nombre d'espèces composant un échantillon testé
- d'identifier des espèces contenues dans l'échantillon en comparant les rapports frontaux avec la littérature ou avec d'autres échantillons analysés

Exercice I:

La menthone est un des constituants de certaines espèces de menthe dont la menthe poivrée. L'extraction de l'huile essentielle de la menthe poivrée se fait en utilisant le dispositif expérimental ci-dessous :



1. Donner le nom de cette technique.
2. Nommer les différents éléments numérotés qui constituent ce montage.
3. Pour vérifier la présence de la menthone dans l'huile essentielle extraite, on réalise une chromatographie sur couche mince. L'éluant est un mélange constitué de 75% de chloroforme et de 25% de cyclohexane. Le chromatogramme est donné ci-dessous :



- 1 : menthone
2 : menthol
3 : huile essentielle de menthe poivrée
4 : eucalyptol
5 : menthofuranne

- Que matérialisent les deux traits situés en haut et en bas du chromatogramme et repérés par les lettres A et B ?
- En interprétant ce chromatogramme, nommer les substances contenues dans l'huile essentielle étudiée.
- Calculer pour l'éluant et le support utilisé le rapport frontal R_f de la menthone.

Correction I:

1- hydrodistillation ou entraînement à la vapeur d'eau.

2-

- 1 : chauffe ballon ;
2 : ballon ;
3 : réfrigérant ;
4 : éprouvette graduée.

3-

- Le trait A matérialise le front du solvant.
- Le trait B matérialise la ligne des dépôts.

Le menthol, la menthone, l'eucalyptol et le menthofuranne sont contenus dans l'huile essentielle

Le rapport frontal de la menthone est égal à la distance parcourue par la menthone divisée par la distance parcourue par le solvant ou éluant soit 0,6