

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
Université Mohamed Boudiaf - M'sila

Faculté Des Sciences

Département SNV

N°



DOMAINE : SNV

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : BIOTECHNOLOGIE

VEGETALE ET AMELIORATION DES

PLANTES

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par : ALILI Ibtissem

BOUDISSA Amel

THEME

Techniques de séparation-chromatographies-

Le jury composé de :

Dr. BELKASSEME Abd elwahab	MCB	Université de M'sila	Président
Dr. SMAILI El Taher	MCA	Université de M'sila	Examineur
Dr. SAOUDI Ouarda	MAA	Université de M'sila	Encadreur

Année universitaire : 2019 /2020

Remerciements

Nous remercions Dieu tout puissant clément et miséricordieux de m'avoir soigné et aidé.

Nous tenons, avant tout, à exprimer nos profondes gratitude à monsieur Saoudi Warda enseignant à l'université de-Msila qui a assumé la direction de ce travail. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos reconnaissances pour son dévouement, sa patience sa disponibilité, ses conseils et son aide constant qu'il nous apportés tout au long de ce travail.

Nous remercions vivement au président et membres du jury pour avoir bien vouloir accepter de faire partie du jury de soutenance. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos gratitude respect.

Nous adressons nos vifs remerciements à tous les enseignants du l'université de-Msila qui ont contribués à nos formations durant toutes nos études.

Nous tenons également à remercier tous nos collègues des études pour leurs soutiens et leur motivation.

Que tous nos amis sans exception, ils sont nombreux, nous ne pouvons tous les citer mais nous ne les oublions.

Enfin, que toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, soient chaleureusement remerciées.

Je dédie ce travail

A toute ma famille,

A tous mes amis,

*... A tous ceux qui
veulent savoir ...*

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Classification de méthodes chromatographie sur colonne	17
Tableau 2.1 : propriétés et caractéristiques de colonne de chromatographie gazeuse	48
Tableau 2.2 : quelques phases stationnaires liquides courantes pour la chromatographie Gaz-liquide	49
Tableau 3.1 : performances des détecteurs pour la CLHP.....	61
Tableau 3.2 : Application de la CLHP de partage	65
Tableau 3.3 : Adsorbant couramment utilisés en chromatographie d'adsorption.....	66
Tableau 3.4 : Eluants utilise comme phase mobile en chromatographie d'adsorption.....	67
Tableau 3.5 : principales caractéristiques des liquides, des gaz et des fluides supercritiques.....	80

Liste des figures

Figure 1.1 schéma montrant la séparation d'un mélange des constituants A et B par chromatographie l'élution sur colonne.....	19
Figure 1.2 exemple de chromatogramme pour un mélange à deux constituants.....	21
Figure 1.3 définition de la hauteur équivalente à un plateau théorique.....	24
Figure 1.4 contribution à H des divers coefficients de transfert de masse	25
Figure 1.5 Effet de la vitesse d'écoulement de la phase mobile sur la hauteur équivalente à un plateau théorique.....	27
Figure 1.6 Exemple du trajet de deux molécules pendant l'élution.....	29
Figure 1.7 Effet de granulométrie sur la hauteur équivalente à un plateau théorique.....	30
Figure 1.8 séparation pour trois résolutions.....	31
Figure 1.9 Effet du facteur de capacité K'_B sur la résolution R_s et sur le temps d'élution $(t_R)_B$ et le temps d'élution $(t_R)_B$	33
Figure 1.10 Effet de modification de solvant sur des chromatogrammes.....	34
Figure 1.11 vanne à boucle d'échantillonnage.....	39
Figure 2.1 Schémas sur La chromatographie en phase gazeuse	41
Figure 2.2 schéma d'un appareil de chromatographie gazeuse.....	45
Figure 2.3 Colonne remplies.....	45
Figure 2.4 Effet de la température sur des chromatogrammes en phase gazeuse ...	46
Figure 2.5 Détecteur à conductivité thermique.....	46
Figure 2.6 Exemple de chromatogramme sur colonnes capillaires tapissées	51
Figure 2.7 Exemple de chromatogramme gaz-solide sur une colonne PLOT.....	52
Figure 3.1 principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC.....	54
Figure 3.2 Les organes d'une chaîne HPLC.....	56
Figure 3.3 Effet du débit et de la granulométrie du support sur la valeur de H en chromatographie liquide.....	56
Figure 3.4 Domaine d'application de la chromatographie liquide	57
Figure 3.5 Schéma d'un appareil de chromatographie liquide a haute Performance.....	57
Figure 3.6 Une pompe alternative pour CLHP.....	58
Figure 3.7 une boucle d'échantillonnage pour CLHP.....	59

Figure 3.8 séparation isocratique à grande vitesse.....	60
Figure 3.9 détecteur UV pour CLHP.....	62
Figure 3.10 détecteur ampérométrique pour CLHP.....	62
Figure 3.11 chromatographie liquide à phase greffée d'additifs de limonade.....	65
Figure 3.12 chromatographie liquide à phase greffée d'insecticides organophosphorés.....	65
Figure 3.13 structure d'une résine échangeuse d'ion en polystyrène réticulé.....	69
Figure 3.14 chromatographie ionique d'un mélange de cations.....	72
Figure 3.15 chromatographie ionique d'anion.....	72
Figure 3.16 la chromatographie d'exclusion.....	74
Figure 3.17 chromatogramme par filtration gel du glucose.....	76
Figure 3.18 Séparation par perméation de gel de constituants d'une résine époxy..	76
Figure 3.19 séparation de fullerènes.....	76
Figure 3.20 photo du système de chromatographie en phase supercritique.....	80
Figure 3.21 comparaison entre l'efficacité d'une colonne de CLHP et celle d'une colonne de CFS.....	84
Figure 3.22 Schémas de la chromatographie sur couche mince.....	85
Figure 3.23 séparation du pyrène et du bi phényle le par (a) CLHP et (b) CFS (D'après D.R.Gere, science, 1983, 222,255.Avec autorisation.....	88
Figure 3.24 chambre de développement par courant ascendant.....	89
Figure 3.25 chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (gel de silice) de quelque acide aminé.....	90

Liste des abréviations

P_m :	Phase mobile
P_s :	Phase stationnaire
C.P.L :	Chromatographie en phase liquide
C.P.G :	Chromatographie en phase gazeuse
C.P.V :	Chromatographie en phase vapeur.
CCM :	La chromatographie sur couche mince
CFS :	Chromatographie en Fluide supercritique
CLL :	Chromatographie Liquide – liquide
CLS :	Chromatographie Liquide –solide
CLG :	Chromatographie Liquide –gel
CGL :	Chromatographie Gaz –liquide
CGS :	Chromatographie Gaz –solide
R_s :	La résolution de la colonne
t_R :	Le temps de rétention
t'_R :	Temps de rétention réduit : $t_R - t_0$.
t_N :	Temps de rétention net $t'_R \times J_1$.
J :	Facteur de compressibilité de la phase mobile.
t₀ :	Temps mort
K' :	Facteur de capacité
K_{ou} D :	Les coefficients de distributions en chromatographie
N :	Le nombre de plateaux théoriques
H :	La hauteur à un plateau théorique
B/u :	Le terme de diffusion longitudinale
DM :	Coefficient de diffusion

CM_m :	Le terme de transfert de masse dans la phase mobile
TCD :	Détecteur à conductibilité thermique
FID :	Détecteur à ionisation de flamme
NPD :	Détecteur thermoïonique
ECD :	Détecteur à capture d'électrons
PID :	Détecteur à photo- ionisation
WCOT :	Wall coated open tubulaire column ou colonne capillaire à film mince
FSOT :	Fused silica open tubular
PLOT :	Porous layer open tubular column
SCOT :	Support coated open tubular column
HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance
UV :	l'ultraviolet
UV/Vis :	l'ultraviolet/visible

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX.....	4
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	12

Chapitre 01 généralité sur la chromatographie

1.1. INTRODUCTION AUX METHODES CHROMATOGRAPHIQUES.....	14
1.2. HISTORIQUE.....	14
1.3. CLASSIFICATION DES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.....	15
1.4. CHOIX DE TECHNIQUE.....	16
1.5. DESCRIPTION D'ENSEMBLE DE LA CHROMATOGRAPHIE.....	16
1.5.1. CLASSIFICATION DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES.....	16
1.5.2. L'ELUTION.....	18
1.6. GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES ET FACTEURS D'IDENTIFICATION DES SOLUTES.....	20
1.6.1. TEMPS DE RETENTION ET LARGEUR DU PIC.....	20
1.6.2 LA VITESSE DE DEPLACEMENT DE SOLUTE (LE FACTEUR DE CAPACITE).....	21
1.6.3. RELATION ENTRE VITESSE DE DEPLACEMENT ET COEFFICIENT DE DISTRIBUTION.....	21
1.6.4. FACTEUR DE SELECTIVITE.....	22
1.6.5. LES COEFFICIENTS DE DISTRIBUTIONS EN CHROMATOGRAPHIE.....	22
1.7. L'ELARGISSEMENT DES BANDES ET L'EFFICACITE DES COLONNES	23
1.7.1 THEORIE CINETIQUE DE CHROMATOGRAPHIE.....	23
1.7.2 EFFICACITES D'UNE COLONNE .NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES.....	23
1.7.3 LES PARAMETRES QUI CONTROLENT L'EFFICACITE D'UNE COLONNE.....	25
1.8. LA RESOLUTION DE LA COLONNE.....	30
1.8.1. EFFET DES FACTEURS DE CAPACITE ET DE SELECTIVITE SUR LA RESOLUTION.....	31
1.8.2. EFFET DE LA RESOLUTION SUR LE TEMPS DE RETENTION.....	32
1.8.3. LES METHODES D'OPTIMISATION.....	32
1.8.4. LA RESOLUTION DES MELANGES COMPLEXES.....	35
1.9. APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE.....	36
1.9.1. ANALYSE QUALITATIVE.....	36
1.9.2. ANALYSE QUANTITATIVE.....	37

Chapitre 02 la chromatographie en phase gazeuse

2.1. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	41
2.2. LES COLONNES DE CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE ET LA PHASE STATIONNAIRE	47
2.2.1. LES COLONNES REMPLIES.....	47
2.2.2. LES COLONNES CAPILLAIRES.....	47
2.3. APPLICATIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE.....	51
2.3.1. ANALYSE QUALITATIVE.....	51
2.3.2. ANALYSE QUANTITATIVE.....	51

Chapitre 03 la Chromatographie liquide à haute performance

3.1. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE.....	54
3.2. PRINCIPE DE LA SEPARATION	55
3.3. L'APPAREILLAGE.....	55
3.3.1. LES RESERVOIRS DE PHASE MOBILE ET LE TRAITEMENT DU SOLVANT	58
3.3.2. LES DISPOSITIFS DE POMPAGE	58
3.3.3. LES DISPOSITIFS D'INJECTION DE L'ECHANTILLON.....	59
3.3.4. LES COLONNES.....	59
3.3.5. LES DETECTEURS.....	61
3.4. LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE	62
3.4.1. SUPPORTS A PHASE GREFFEE	63
3.4.2. SUPPORTS A PHASE NORMALE ET A PHASE INVERSEE.....	63
3.4.3. CHOIX DES PHASES MOBILES ET STATIONNAIRES.....	64
3.4.4. APPLICATIONS.....	65
3.5. LA CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION.....	66
3.5.1. APPLICATIONS	68
3.6. CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE D'IONS.....	68
3.6.1. LESEQUILIBRES D'ECHANGE D'IONS.....	69
3.6.2. APPLICATION DES RESINES ECHANGEUSES D'IONS A LA CHROMATOGRAPHIE.....	69
3.6.3. CHROMATOGRAPHIE IONIQUE.....	70
3.6.4. LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE A COLONNE AVEC NEUTRALISATION.....	72
3.7. LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE A COLONNE AVEC NEUTRALISATION.....	73
3.7.1. LES SUPPORTS.....	74
3.7.2. APPLICATIONS.....	75

3.7.3. COMPARAISON ENTRE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE	77
CHROMATOGRAPHIE GAZ –LIQUIDE.....	77
3.8. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE SUPERCRITIQUES.....	78
3.8.1. APPAREILLAGE ET PARAMETRES OPERATIONS.....	79
3.8.2. COMPARAISON ENTRE LA CHROMATOGRAPHIE PAR FLUIDE SUPERCRITIQUE ET D'AUTRES METHODES SUR COLONNE.....	82
3.8.3. APPLICATIONS.....	84
3.9. LA CHROMATOGRAPHIE PLANAIRE.....	84
3.9.1. LE CHAMP D'APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	86
3.9.2. LES PRINCIPES DE LA CHROMATOGRAPHIE.....	86
3.10. LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.....	90
3.11. CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE D'IONS	91
3.11.1. LES MECANISMES DE CHROMATOGRAPHIE.....	91
3.11.2. CHROMATOGRAPHIE DE PARTITION.....	91
3.11.3. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.....	91
3.11.4. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (C.C.M).....	92
3.11.5. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION MOLECULAIRE.....	92
3.11.6. CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS.....	92
3.11.7. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (C.P.G).....	92
3.11.8. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE.....	93
3.11.9. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (C.L.H.P).....	93
CONCLUSION	94
Référence.....	96
Résumé.....	99

Introduction :

La chimie analytique est la branche de la chimie qui a pour but l'identification, la caractérisation et la quantification des substances chimiques ainsi que le développement des méthodes nécessaires à cette analyse

Depuis les années 50, le domaine de la biologie a beaucoup évolué. Grâce à la mise au point et à l'utilisation systématique de techniques comme la chromatographie, l'électrophorèse et les méthodes optiques, l'approche physico-chimique – le réductionnisme - s'est avérée particulièrement féconde. Ainsi a-t-on assisté à une explosion de connaissances concernant la structure et le fonctionnement de la cellule et du matériel biologique (enzymes, en particulier). Ainsi, il a été possible de justifier, d'expliquer, puis de rationaliser et donc d'améliorer des pratiques anciennes (**Coutouly, G.S.D.**)

Selon Feinberg, 1996. Toute analyse, chimique, biologique ou autre, nécessite la mise au point de méthodes de séparation, d'identification et de dosage des analytes avec des résultats qui doivent être les mêmes pour tout opérateur procédant à l'analyse en question comme la chromatographie.

La chromatographie est une technique de séparation, d'analyse quantitative et qualitative. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration des composés entraînés entre deux phases non miscibles dont l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, qui se déplace au contact de la première. L'échantillon doit impérativement être soluble dans la phase mobile (solvant d'élution)

Techniques analytiques sélectives et sensibles sont utilisées pour le profilage métabolique des extraits de plantes. Les techniques chromatographiques sont les plus utilisées, telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie liquide (LC), chromatographie en phase gazeuse (GC), l'électrophorèse capillaire (CE), qui sont associés à différentes méthodes de détection : absorption dans l'ultra-violet (UV), fluorescence, diffusion de la lumière (ELSD), d'aérosol chargé (CAD), spectrométrie de masse (MS) et résonance magnétique nucléaire (RMN). Le développement de la spectrométrie de masse et son couplage aux techniques chromatographiques, fait que GC/MS

HPLC/MS et CE/MS sont les techniques couramment utilisées dans le profilage métabolique des plantes médicinales (**Nisaine ,2013**)

L'objectif de ce travail est savoir la généralité de la chromatographie, l'étude des différents types de la chromatographie, les applications utilisées dans cette domaine, les appareils de cette technique, grandeur chromatographique, d'excription d'ensemble de la chromatographie, classification des méthodes chromatographiques.

La classification des techniques chromatographiques se base soit sur la nature de la phase stationnaire ou de la phase mobile, soit sur le mécanisme utilisé pour la séparation, la phase mobile peut être liquide (chromatographie en phase liquide), gaz (chromatographie en phase gazeuse) ou fluide (chromatographie en phase supercritique). (**Tiabi et Tires, 2014**)

CHAPITRE 01

1.1. Introduction aux méthodes chromatographiques :

En général la chromatographie est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange, les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile, ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur. L'origine du mot chromatographie vient la séparation de composés colorés puisque chroma en grec, signifie couleur et graphein signifie écrire. (**Bidlingmeyer, 1992**).

1.2. Historique :

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 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 redis sous dans bon nombre d'autres solvants et en particulier dans l'éther de pétrole (on dirait maintenant des solvants polaires ou non polaires). Ce pendanse 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, 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 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 pigment.

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 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, 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 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. J'appelle une telle préparation un chromatogramme et la méthode correspondante la méthode chromatographie » (**Rouessac et al, 2004**).

1.3. Classification des techniques chromatographiques :

Selon (**MAROUF, 2001 – 2002**) il existe plusieurs variantes de techniques chromatographiques, classées de plusieurs manières différentes :

- selon la nature des phases utilisées : la phase mobile être un fluide liquide ou gazeux. Dans le premier cas, on parle de chromatographie en phase liquide (C.P.L). La phase mobile doit présenter des propriétés physico-chimiques (pH, force ionique, viscosité ou absorbance) compatible avec la phase stationnaire, le cas échéant avec le type d'interaction recherchée ainsi qu'avec le système de détection utilisé. Le mélange à analyser est alors en solution dans l'eau ou dans un solvant organique. Dans le deuxième cas, on parle de chromatographie en phase gazeuse (C.P.G) ou en phase vapeur (C.P.V).

- selon la technologie de la séparation : la technologie en phase liquide comprend la chromatographie sur papier, la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie sur colonne. Dans cette dernière, la phase mobile peut être un liquide approprié qui circule à travers les colonnes par gravité ou qui traverse la colonne sous pression constante et assez élevée. Dans le premier cas, on peut aussi utiliser une pompe péristaltique délivrant une pression faible et permettant de contrôler le débit de passage de la phase mobile.

- selon la nature du facteur déterminant la séparation : La chromatographie liquide sur colonne permet de réaliser tous les types de chromatographie. Dans cette technique, la colonne peut être remplie par un adsorbant (chromatographie d'adsorption), un solide inerte imprégné d'un liquide hydrophile (chromatographie de partition en phase normale) ou hydrophobe (chromatographie de partition en phase

inverse), un solide portant des groupes ionisables (chromatographie d'échange d'ions), un solide de porosité calibrée (Chromatographie d'exclusion moléculaire) ou un solide portant des groupements caractéristiques spécifiques (chromatographie d'affinité).

1.4. Choix de technique :

Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes. Le choix de l'une ou l'autre dépend :

De la nature de soluté : gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule espèce organique, polaire, ionique ...

Du but de l'analyse : identification, contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparative), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages, quantification ...

1.5. Description d'ensemble de la chromatographie :

Il est difficile de définir rigoureusement le terme "chromatographie" parce qu'il s'applique à une grande diversité de système et de techniques. Cependant, toutes la méthode ont en commun l'utilisation simultanée d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. Les constituants de l'échantillon à analyser sont entraînés à travers la phase stationnaire par le flux d'une phase mobile gazeuse ou liquide, et les séparations résultent de la différence entre les vitesses de progression des techniques des diverses substances (Skoog *et al*, 2006).

En chromatographie, la phase stationnaire est une phase qui reste en place soit dans une colonne, soit sur une surface plane.

1.5.1. Classification des méthodes chromatographies :

On distingue deux types de méthodes chromatographies. En chromatographie sur colonne, la phase stationnaire est maintenue dans un tube étroit et la phase mobile y progresse par gravité ou sous l'action d'une différence de pression. En chromatographie planaire, la phase stationnaire est présente à la surface d'un support plat (chromatographie sur couche mince) ou immobilisé à l'intérieur des pores d'une feuille de cellulose (chromatographie sur papier). Dans ce cas, la phase mobile se

déplace à travers la phase stationnaire qui capillarité ou sous l'effet de la graffité. (Skoog *et al*, 2006)

Comme la montre la première colonne du tableau, les méthodes se classent en trois catégories selon la nature de la phase mobile : liquide, gaz ou fluide supercritique. La deuxième colonne de tableau répertorie 5 types de chromatographie en phase gazeuse qui par la nature de la phase stationnaire et le type d'équilibre qui s'établit entre la phase (Skoog *et al*, 2006)

Tableau1.1 : Classification de méthodes chromatographie 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		
	Echange d'ions	Résine échangeuse d'ions	Echange d'ions partage /tamisage
	Liquides –gel (CLG) Ou perméation	liquides dans les interstices d'un solide polymérique	
Chromatographie en phase gazeuse (CPG) (phase mobile : gaz)	Gaz –liquide (CGL)	Liquide immobilisé sur un solide	
	Gaz –phase greffé	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre gaz et liquide Partage entre gaz et surface greffée Adsorption
Chromatographie en fluide supercritique (CFS) phase mobile : fluide supercritique	Gaz –solide (CGS)	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre fluide supercritique et surface greffée

(Skoog *et al*, 2006)

1.5.2 : L'élution :

Le mélange à résoudre est disposé au sommet d'une colonne remplie de phase stationnaire (étape 1). On fait circuler la phase mobile dans la colonne, les constituants du mélange migrent avec des vitesses différentes (étape 2).

Chaque composé est récupéré (on dit qu'il est élué) en sortie de colonne à des instants différents. **(Burgot et Burgot, 2011)**

-Le chromatogramme :

D'après **(Rouessac et Rouessac, 2011)**, tous les instruments, appelés chromatographes, comportent une colonne renferme la phase stationnaire ainsi qu'un détecteur situé en aval pour repérer les changements de composition de la phase mobile au cours de son élution.

À chaque séparation correspond un enregistrement appelé chromatogramme. Le passage de chaque composé au niveau du détecteur se traduit par un pic sur cet enregistrement.

Les chromatographes actuels permettent de contrôler de manière très précise tous les paramètres pouvant influencer sur la migration (température, débits, composition de la phase mobile et stationnaires). On atteint ainsi une parfaite reproductibilité des temps de migration pour un soluté donné au cours d'analyse successive même s'il est présent dans des échantillons différents.

De ce fait, la chromatographie est devenue en soi une méthode d'analyse en se basant uniquement sur la mesure de temps de migration des composés pour les identifier.

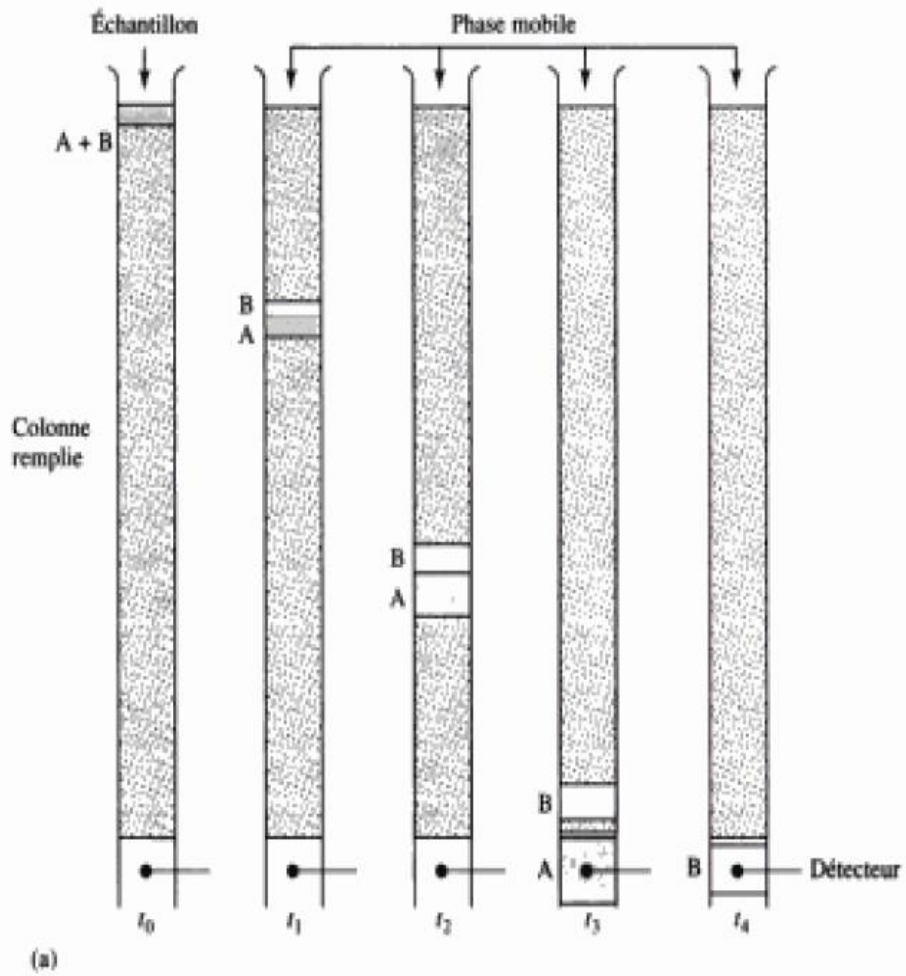


Figure 1.1 schéma montrant la séparation d'un mélange des constituants A et B par chromatographie d'élution sur colonne

-Influence de la vitesse relative de déplacement et l'élargissement du pic sur la résolution :

Selon (**Rosset et al, 1991**). Le problème pratique le plus important et la recherche d'une résolution assurant une séparation suffisante des solutés du mélange.

Reprenons l'équation générale de la résolution établie précédemment en supposant les largeurs des pics à la base égales (pics très voisins)

$R_s = 1/4 \cdot \alpha - 1 / \alpha \cdot K'_2 / 1 + k'_2 \cdot \sqrt{N_2}$ Pour accroître R_s on peut augmenter l'un quelconque des trois facteurs (sélectivité), (rétention des solutés), (efficacité de la colonne).

De même, si pour diminuer la durée d'une séparation on augmente la vitesse de la phase mobile il en résulte une perte en efficacité, en détectabilité et un accroissement de la pression nécessaire.

1.6. Grandeurs chromatographique et facteurs d'identification des solutés :

1.6.1. Temps de rétention et largeur du pic :

Selon (**Burgot et Burgot, 2011**), en chromatographie d'élution, on distingue le pic correspondant à la phase mobile suivi par le ou les pic (s) des différents solutés. Les symboles utilisés usuellement correspondent aux définitions suivantes :

t_0 temps mort : temps de passage de la phase mobile dans la colonne. Avec une vitesse u cm. s⁻¹ il vient :

$$t_0(s) = L \text{ (cm)} / u \text{ (cm.s}^{-1}\text{)}$$

t_R temps brut de rétention : temps écoulé entre l'introduction du composé dans la colonne et le moment où substance sort à sa concentration instantanée maximale.

t'_R temps de rétention réduit : $t_R - t_0$.

t_N temps de rétention net $t'_R \times J_1$.

J facteur de compressibilité de la phase mobile.

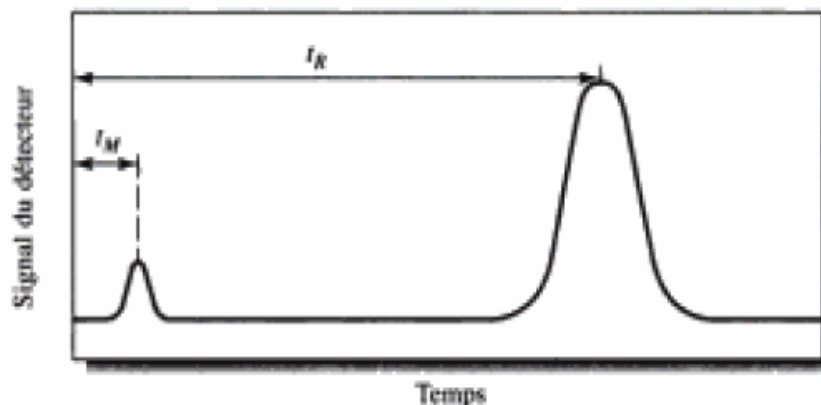


Figure 1.2 : exemple de chromatogramme pour un mélange à deux constituants. Le petit pic à gauche correspond à un soluté qui n'est pas retenu sur la colonne et qui atteint le détecteur pratiquement à la même vitesse que l'éluant.

1.6.2. La vitesse de déplacement de soluté (le facteur 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 et m_s dans la phase stationnaire. Si on ne change pas les conditions opératoires, ces deux quantités demeurent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Leur rapport, appelé facteur de rétention, est indépendant de m_T :

$$K = m_s / m_M = C_s \cdot V_s / C_M \cdot V_M = K \cdot V_s / V_M$$

Le facteur de rétention, encore appelé facteur de capacité K , est un paramètre très important de la chromatographie. Il est défini en régime isocratique. Ce n'est pas une constante, bien qu'il ne varie pas avec le débit ou la longueur de la colonne, car il dépend des conditions opératoires. Pour cette raison il est quelque fois désigné par K' au lieu de K . (Rouessac et al, 2004)

1.6.3. Relation entre vitesse de déplacement et coefficient de distribution :

Selon (Skoog et al, 2006) $V = u \times$ fractions de temps passé par le soluté dans la phase mobile

Cette fraction est nécessairement égale à la quantité moyenne de soluté présente dans la phase

Mobile à tout instant, divisé par la quantité totale de soluté dans la colonne.

$$V = U \times \text{quantité de soluté dans la phase mobile} / \text{Quantité totale de soluté}$$

$$\text{Quantité de soluté dans la phase mobile} = C_M V_M$$

$$\text{Quantité totale de soluté} = C_M V_M + C_s V_s$$

1.6.4. Facteur de sélectivité :

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs 1 et 2, on utilise la sélectivité (ou rétention relative) définie par la relation (**Rosset et al, 1991**)

$$\alpha = t_{R2} - t_0 / t_{R1} - t_0 = K_2 / K_1 = K_2 / K_1$$

La sélectivité α mesure la différence de distribution thermodynamique des deux composés.

D'après ($\ln K = -\Delta G^\circ / RT$) on a :

$$\ln \alpha = \ln K_2 / K_1 = -\Delta(\Delta G^\circ) / RT$$

$\Delta(\Delta G^\circ)$ représentant la différence des enthalpies libres de distribution des deux composés

$$\Delta(\Delta G^\circ) = \Delta G_2^\circ - \Delta G_1^\circ$$

Ces différences dans la distribution des solutés entre les deux phases résultent de l'ensemble des interactions spécifiques ioniques ou moléculaires, auxquelles ils sont soumis de la part de la phase stationnaire et de la phase mobile.

1.6.5. Les coefficients de distributions en chromatographie :

est le rapport de sa concentration analytique dans la phase à sa concentration analytique dans la phase mobile. selon les traités, le symbole utilisé pour cette grandeur peut être K ou D.

$$K = C_s / C_M \text{ (Skoog et al, 2006)}$$

1.7. L'élargissement des bandes et l'efficacité des colonnes :

La colonne : une colonne est tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. (Achour et Djellal, 2019)

Les paramètres qui contrôlent l'efficacité d'une colonne :

Le choix d'une colonne est lié aux paramètres suivants :

Type de la phase stationnaire, longueur, diamètre des particules et la phase mobile

1.7.1. Théorie cinétique de chromatographie :

L'aspect cinétique de la chromatographie concerne la largeur ou « finesse » pic chromatographique qui souvent exprimée par le nombre des plateaux théorique de la colonne. (Bouhajib ,1992)

1.7.2. Efficacités d'une colonne .Nombre de plateaux théoriques :

Efficacités d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateau théoriques N contenue dans la colonne.

Le cadre de cet ouvrage ne nous permet pas d'entrer dans le détail de la théorie des plateaux d'où est née de la recherche d'un modèle statique permettant de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique comme on l'avait fait auparavant pour les colonnes à distiller.

Au lieu de considérer le déplacement réel, continu, de la phase mobile, on admet que celle –ci progresse par transferts successifs et se met en découpant fictivement la colonne en un certain nombre de zones où équilibres sont réalisés et que l'on appelle plateau théoriques .ce faisant, on peut calculer le profil de répartition des espèces, de proche en proche, après chaque transfert et dans chaque plateau. Une colonne réelle est alors dite comporter N plateau si, dans des conditions données, elle a la même efficacité qu'une colonne fictive de N plateau théoriques. (Rosset et al, 1991).

Selon (Bouhajib ,1992) Cette notion de plateau théorique, bien qu'elle repose sur un modèle parfaitement théorique, est d'un usage général car elle reflète très bien la

finesse des pics. Aussi on peut l'utiliser pour s'assurer qu'une colonne ne représente pas de défaut de fabrication ou qu'elle est encore en bonne pour utiliser.

Définition de H :

La hauteur à un plateau théorique : $H = L / N$ (Rouessac et Rouessac, 2004)

Détermination expérimentale du nombre de plateau théorique dans une -colonne :

Selon (Rouessac et Rouessac, 2004) N est un paramètre relatif, puisqu'il dépend à la fois du soluté et des conditions opératoires suivies. On choisit généralement un constituant qui apparaît en fin ce chromatogramme pour avoir une valeur repère, à défaut de savoir si la colonne permet de réussir une séparation donnée

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2} \quad N = 5.54 \frac{t_R^2}{\delta^2}$$

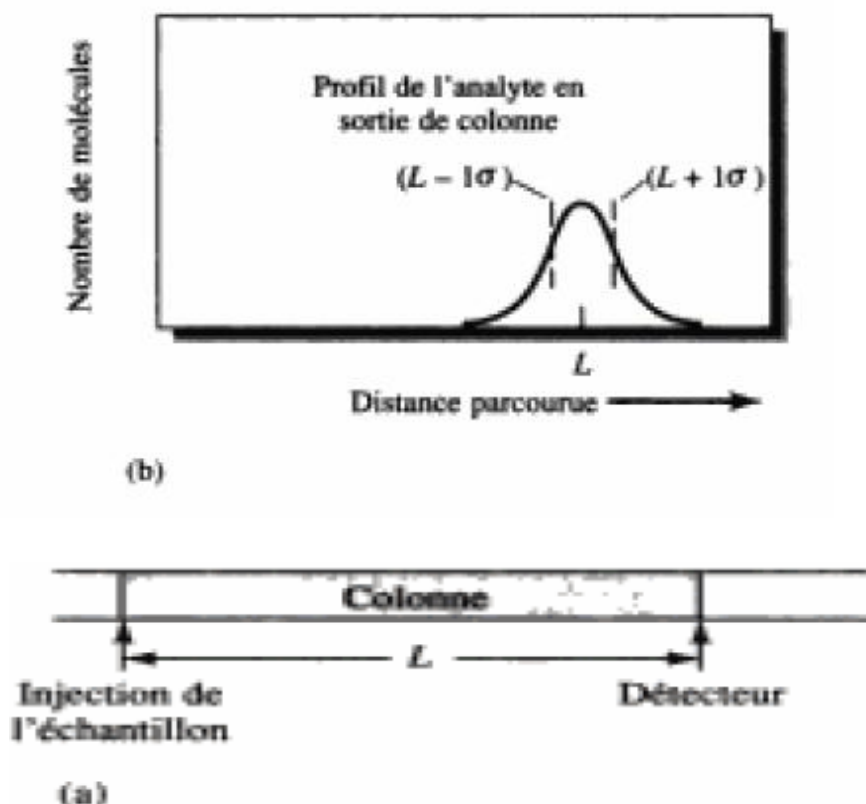


Figure 1. 3 : définition de la hauteur équivalente à un plateau théorique

1.7.3. Les paramètres qui contrôlent l'efficacité d'une colonne :

-Effet de la vitesse d'écoulement de la phase mobile :

Dans tout ce qui précède, en particulier dans les différentes expressions caractérisant les séparations, la vitesse de la phase mobile dans la colonne n'est pas prise en compte.

Or, de toute évidence, cette vitesse doit avoir une incidence sur la progression des analytes dans la colonne, donc sur leur dispersion, en bref sur la qualité de l'analyse en cours.

-Effet de la vitesse d'écoulement de la phase mobile sur le terme de l'équation :

L'influence de la vitesse de la phase mobile a été mise en évidence par Van Déméter qui a proposé la première équation cinétique, dans le cas des colonnes remplies en chromatographie en phases gazeuses. (Rouessac et Rouessac, 2004).

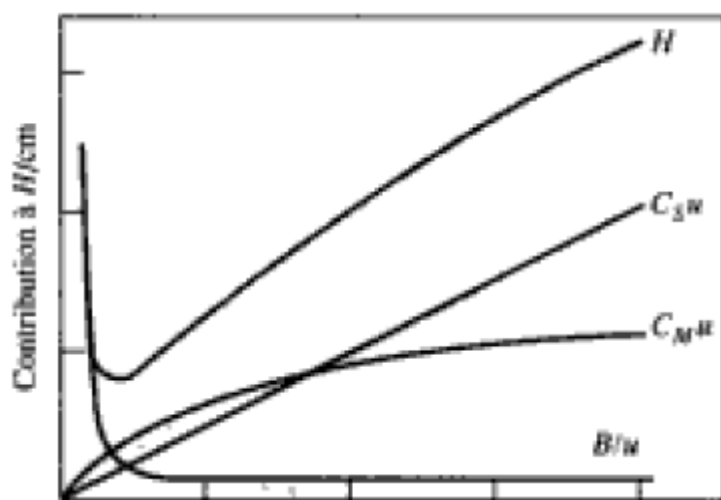


Figure 1.4 : contribution à H des divers coefficients de transfert de masse.

(Skoog et al, 2006)

-Théorie de l'élargissement du pic :

Au cours des 40 dernières années, de très nombreuses études théoriques et expérimentales ont été consacrées au développement de relations quantitatives qui décrivent les effets des paramètres expérimentaux sur les valeurs de H de différents types de colonnes. On a proposé et appliqué avec plus ou moins de succès au moins une douzaine d'expressions pour calculer H. aucune d'entre elles ne permet

d'expliquer parfaitement les interactions physiques complexes et leurs effets sur l'élargissement des pics, et donc leur rôle sur l'efficacité des colonnes. Quelques – unes de ces équations, bien qu'imparfaites sont cependant d'une très grande utilité car elles indiquent comment on peut améliorer les performances des colonnes. Nous nous bornerons à en présenter ici l'une d'entre elles.

L'efficacité de la plupart des colonnes chromatographiques peut être explicitée par une expression de forme :

$$H = B / u + C_{su} + C_{Mu}$$

Où H s'exprime en cm et u, la vitesse linéaire de la phase mobile, en cm/s. (**Hawkes, Chem, 1983**)

-Le paramètre **B** est le coefficient de diffusion longitudinal.

-Cs et CM sont les coefficients de transfert de masse respectivement pour la phase stationnaire et la phase mobile.

-Le terme de diffusion longitudinale B/u :

Selon **Skoog et al, 2006**-.En chromatographie, la diffusion longitudinale résulte de la tendance du soluté à se déplacer du centre de sa bande (ou sa concentration est la plus élevée) vers les régions plus diluées situées en amont et en aval (c'est-à-dire dans le sens de l'écoulement et dans l'autre sens).

La diffusion longitudinale est la cause principale d'élargissement des pics en chromatographie en phase gazeuse parce que la vitesse de diffusion des molécules est très élevée dans les gaz. Cet effet est beaucoup moins important en chromatographie en phase liquide. La valeur du terme B dans l'équation de (H) dépend principalement du coefficient de diffusion DM de l'analyse dans la phase mobile : il est proportionnel à cette constante.

Comme le montre l'équation (H) la contribution de la diffusion longitudinale à la HEPT est inversement proportionnelle à la vitesse linéaire de l'éluant.

Cette relation n'a rien de surprenant, puisque l'analyte séjourne moins longtemps dans la colonne lorsque la vitesse d'écoulement est élevée. Ce fait limite l'étalement du pic

La diminution initiale des valeurs de HEPT que montrent les deux courbes de figure suivante résulte de la diffusion longitudinale. Noter que l'effet est beaucoup moins prononcé en chromatographie en phase liquide du fait que la vitesse de diffusion y est beaucoup plus faible. La différence frappante entre l'ordre de grandeur des valeurs de H indiquées par les deux courbes de la figure suivante peut également s'expliquer en comparant les vitesses relatives de diffusion longitudinale dans les deux phases mobiles. En effet, les coefficients de diffusion dans les deux phases mobiles. En effet, les coefficients de diffusion dans les milieux gazeux sont plus élevés que dans les liquides de plusieurs puissances de dix. L'élargissement du pic est donc de loin le plus important en phase gazeuse.

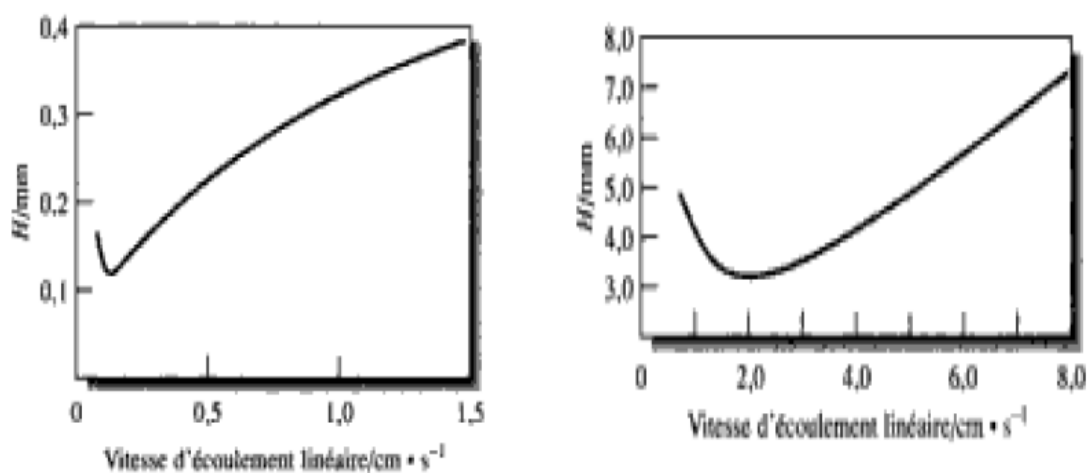


Figure 1.5 : Effet de la vitesse d'écoulement de la phase mobile sur la hauteur équivalente à un plateau théorique pour (a) la chromatographie en phase liquide et (b) la chromatographie phase gazeuse sur

-Le terme de transfert de masse dans la phase mobile C_{M} :

Selon (Skoog *et al*, 2006) -Le terme de transfert de masse qui se produit dans la phase mobile est trop complexe pour permettre une analyse complète et rigoureuse. Néanmoins, on dispose d'une bonne compréhension qualitative des paramètres liés à ces processus qui affectent l'élargissement des pics, un fait qui a conduit à d'importantes améliorations dans la conception et l'utilisation des colonnes chromatographiques.

On sait que C_M , le coefficient de transfert de masse dans la phase mobile, est inversement proportionnel à D_M , le coefficient de diffusion de l'analyte dans cette phase.

La contribution du transfert de masse dans la phase mobile à H est le produit du coefficient de transfert de masse C_M (qui dépend de la vitesse du solvant), et de la vitesse du solvant elle-même. Dès lors, la contribution globale de C_{Mu} à H n'est pas une fonction linéaire de u (voir la courbe de C_{Mu} de la figure suivante (6) mais dépend du solvant d'une manière beaucoup plus complexe.

L'élargissement du pic dans la phase mobile est dû notamment à la multitude de trajets qu'une molécule (ou un ion) peut suivre en cheminant par les interstices d'une colonne remplis. Comme le montre la figure (1.5), la longueur de ces trajets peut varier de manière importante ; dès lors, le temps de séjour dans la colonne pour de molécules de même espèce est lui-même également variable. Les molécules de soluté atteignent donc la sortie de la colonne durant un certain intervalle de, ce qui conduit pic. Cet effet, qu'on appelle parfois diffusion turbulente devrait être indépendante de la vitesse du solvant, s'il n'était partiellement

Compensé par la diffusion ordinaire qui a pour effet faire passer les molécules d'un chemin à un autre, Si la vitesse d'écoulement est très faible, un grand nombre de ces transferts se produisent et, au cours de sa progression dans la colonne, chaque molécule suit de nombreuses lignes de flux, en ne passant que peu de temps dans chacune. Par conséquent, la vitesse de progression de chaque molécule dans la colonne est proche d'une valeur moyenne. Dès lors, aux faibles vitesses de la phase mobile, les molécules ne sont pratiquement pas dispersées à cause de la diversité de leurs trajets. Par contre, pour des vitesses moyennes ou élevées, la correction apportée par la diffusion n'a pas le temps de s'effectuer, et on observe un élargissement du pic aux différents longueurs de trajet. Aux vitesses les plus élevées, l'effet de la diffusion turbulente devient indépendant de la vitesse d'écoulement.

La diffusion turbulente s'ajoute un autre effet qui résulte de la présence de zones stagnantes de phase stationnaire, ses pores sont remplis de volumes statiques de phases mobiles. De molécules de soluté doivent diffuser à travers zones stagnantes avant qu'un transfert puisse se produire entre la phase mobile en mouvement et la phase stationnaire. Cette situation se rencontre non seulement avec les phases stationnaires solides, mais également avec les phases stationnaires liquides immobilisées sur des solides poreux que le liquide immobilisé ne remplit généralement pas totalement les pores.

La présence de zones stagnantes ralentit le processus d'échange et se traduit par une augmentation de H qui est directement proportionnelle à la vitesse de la phase mobile et inversement proportionnelle au coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

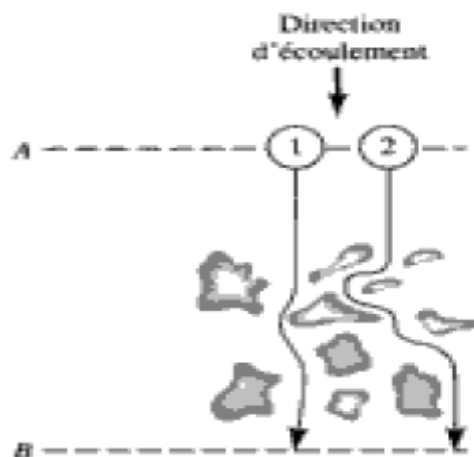


Figure 1.6 : Exemple du trajet de deux molécules pendant l'élution. Notez que la distance parcourue par la molécule le 2 est supérieure à celle de la molécule 1. Dès lors, la molécule 2 arrivera en B

-Résumé des méthodes permettant de réduire l'élargissement des pics :

Le diamètre des particules qui remplissent la colonne ou, dans le cas des colonnes capillaires, le diamètre de la colonne, sont deux paramètres importants dont le contrôle permet d'améliorer l'efficacité de la colonne. L'effet de la granulométrie est illustré par la donnée représentée sur la figure suivante (1.7). Par ailleurs, pour tirer parti de l'effet du diamètre de la colonne, on tend actuellement à réduire le diamètre des colonnes.

Si la phase mobile est gazeuse, la vitesse de diffusion longitudinale, et donc la valeur de H , peut être réduite de manière appréciable en abaissant la température et donc le coefficient de diffusion D_M . En chromatographie en phase liquide, l'effet de température est habituellement

insignifiant car le terme de diffusion longitudinale influence peu la valeur globale de H .

Lorsqu'on utilise des phases stationnaires liquides, l'épaisseur de la couche liquide stationnaire doit être minimisée car C_s est proportionnel à d^2 , soit le carré de ce paramètre.

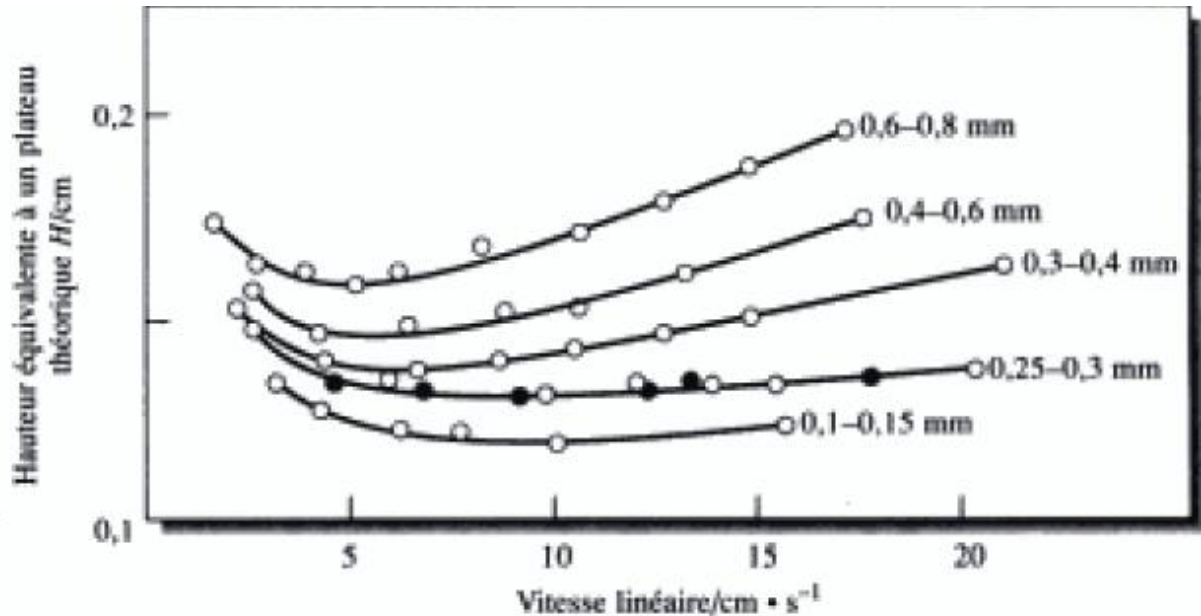


Figure 1.7 : Effet de granulométrie sur la hauteur équivalente à un plateau théorique. Les nombres à droite sont les diamètres particuliers. (D'après J.Boheman et J.H.Purnell, dans Gas Chromatography 1958, D.H.Desty, Ed. New York: Academic Press, 1958. Avec autorisation de Butterworths, Stoneham, MA)

1.8. La résolution de la colonne :

La résolution R_s entre deux pics est définie par la relation :

$$R_s = 2 \frac{(tR2 - tR1)}{\omega2 + \omega1}$$

Étant les largeurs à la base, déterminées comme précédemment par l'intersection des tangents aux points d'inflexion des pics avec la ligne de base.

$R_s = 1$ la séparation est pratiquement complète.

$R_s < 0.8$ la séparation est généralement insuffisante. (Rosset et al, 1991)

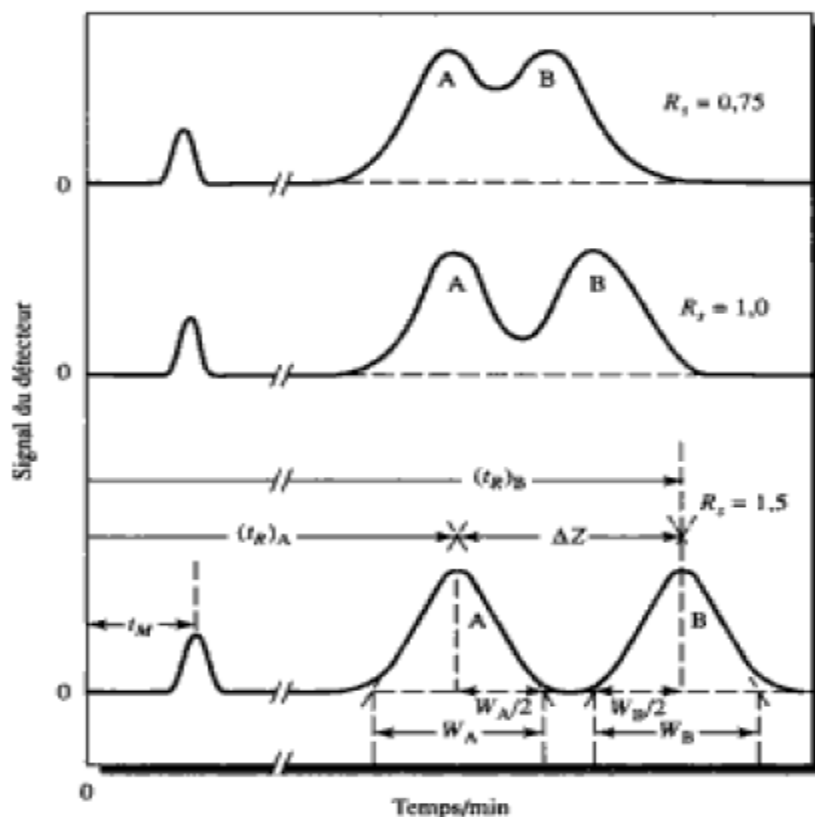


Figure 1.8 : séparation pour trois résolutions. (Skoog et al, 2006)

1.8.1. Effet des facteurs de capacité et de sélectivité sur la résolution :

On établit facilement l'équation qui lie la résolution d'une colonne et le nombre de ses plateaux théoriques ainsi que les facteurs de capacité et de sélectivité de deux solutés sur la colonne. on peut ainsi montrer (Skoog et Leary, 1992) que pour les deux solutés A et B de figure (1.8), la résolution est donnée par l'équation

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{K'B}{1+K'A} \right)^2$$

Où K'_B est le facteur de capacité de l'espèce la plus lente et α le facteur de séparation.

Cette équation peut être reformulée pour exprimer le nombre de plateaux théorique nécessaires pour obtenir une résolution.

1.8.2. Effet de la résolution sur le temps de rétention :

Comme on l'a mentionné précédemment, le but de la chromatographie est d'obtenir la meilleure résolution possible en un minimum de temps. Toutefois, ces deux objectifs sont généralement incompatibles, et un compromis entre les deux doit être trouvé.

$$(t_R)_B = \frac{16R^2sH}{U} \left(\frac{\alpha}{\alpha-1}\right)^2 \left(\frac{1+K'B}{K'B}\right)^2$$

Où est la vitesse linéaire d'écoulement de la phase mobile.

1.8.3. Les méthodes d'optimisation :

Les équations de R_s et $(t_R)_B$ guident le choix des conditions qui conduisent au degré de résolution souhaité en un minimum de temps. Chacune d'entre elles contient trois termes. Le premier lie l'efficacité de la colonne à \sqrt{N} ou H . Le deuxième, le quotient qui contient α , est un terme de séparation qui dépend des propriétés des deux solutés. Le troisième, le terme de capacité, est un quotient qui contient K'_B ; paramètre dépend à la fois des propriétés du soluté et de la colonne.

-Modification de la hauteur équivalente à un plateau théorique H :

Comme le montre l'équation R_s , la résolution d'une colonne est proportionnelle à la racine carrée de la hauteur de plateaux théoriques qu'elle contient.

Les méthodes permettant de minimiser H sont exposées aux paragraphes C; elles comprennent la diminution du diamètre des particules du support, du diamètre de la colonne, de la température de la colonne (chromatographie en phase gazeuse) et de l'épaisseur du film liquide (chromatographie en phase liquide) on peut également optimiser la vitesse d'écoulement de la phase mobile.

-Modification du facteur de capacité :

Une séparation peut souvent être améliorée de manière significative en modifiant le facteur de capacité K'_B . L'augmentation de K'_B améliore généralement la résolution (mais au détriment de la durée d'élution). Pour déterminer le domaine optimal des valeurs de K'_B , on reformule l'équation de R_s

$$R_s = Q \left(\frac{K'_B}{1+K'_B}\right)$$

Et l'équation de $(t_R)_B$

$$(t_R)_B = \dot{Q} \left(\frac{1+K'_B}{K'_B} \right)^3$$

Où Q et \dot{Q} contiennent le reste des termes des deux équations. La figure suivante (1.9)

Représente un graphique de R_s/Q et $(t_R)_B/Q$ en fonction de K'_B , en admettant que Q et \dot{Q} restent pratiquement constants.

Il est clair qu'il faut écarter les valeurs de K'_A supérieures à 10 car elles n'entraînent qu'une faible augmentation de la résolution au détriment d'un allongement considérable des durées de séparation. Le minimum de la courbe de temps d'élution correspond à $k'_B \approx 2$. Les valeurs optimales de k'_B sont généralement comprises entre 1 et 5.

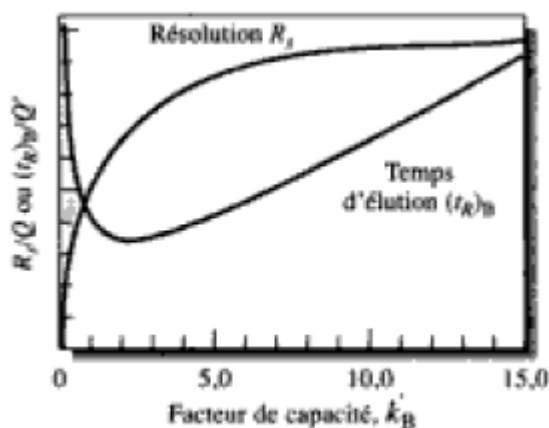


Figure 1.9 : Effet du facteur de capacité K'_B sur la résolution R_s et sur le temps d'élution $(t_R)_B$ et le temps d'élution $(t_R)_B$. On a admis que Q et \dot{Q} restent constants lorsque K'_B varie

Le moyen le plus usuel d'améliorer la résolution est d'optimiser K' . Pour les phases mobiles gazeuses, K' peut souvent être contrôlé en modifiant la température. Pour les phases mobiles liquides, des changements de composition du solvant permettant souvent d'agir sur K' de manière à obtenir de meilleures séparations la figure suivante (1.10) montre un exemple de l'effet spectaculaire qui peut résulter de modifications de solvants relativement simples. Dans ce cas, de faibles variations du rapport méthanol / eau transforment des chromatogrammes très peu satisfaisants (a et b) en courbes les pics de chaque constituant sont bien séparé (c et d). Tout bien considéré, le chromatogramme (c) est le meilleur puisqu'il combine une bonne résolution et un minimum de temps.

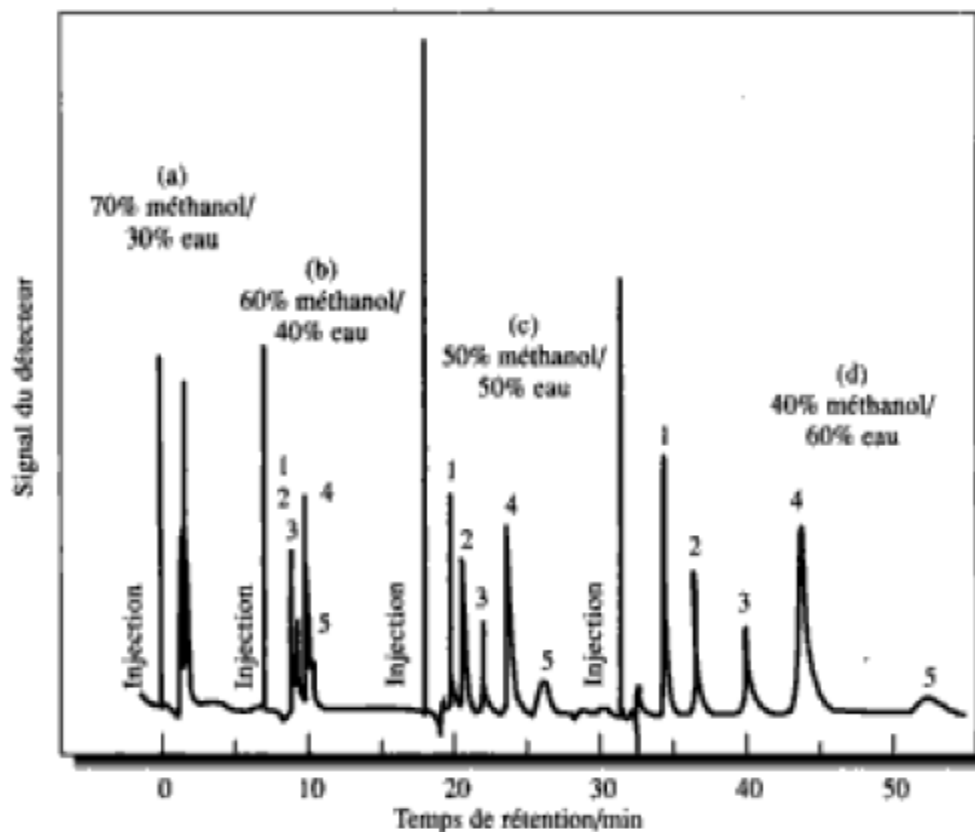


Figure 1.10 : Effet de modification de solvant sur des chromatogrammes.

(Document de DuPont Biotechnology Systems, Wilmington, DE.)

-Modification du facteur de sélectivité :

L'optimisation de K' et l'augmentation de N ne suffisent pas pour donner une bonne séparation de deux solutés en un temps raisonnable si α est proche de 1. dans ce cas, on doit rechercher le moyen d'augmenter α tout en maintenant K' entre 1 et 10. Plusieurs options sont possibles : par ordre de préférence décroissant, on peut modifier la composition de la phase mobile (chromatographie en phase liquide), modifier la température de la colonne, modifier la composition de la phase la composition de la phase stationnaire et utiliser des effets chimiques spéciaux.

La séparation de l'anisole ($C_6H_5OCH_3$) et du benzène (Snyder et Kirkland, 1979) est un exemple de l'option 1.

Avec une phase mobile qui est un mélange à 50% d'eau et d'éthanol, K' vaut 4,5 pour l'an isolé et 4,7 pour le benzène, tandis que α ne vaut que 1,04. En utilisant une phase mobile aqueuse contenant 37% de tétrahydrofurane, les valeurs de k' sont égales respectivement à 3,9 et 4,7 et α vaut 1,20. Le chevauchement des pics est important avec le premier solvant et négligeable avec le deuxième.

1.8.4. La résolution des mélanges complexes :

Selon **Skoog et al, 2006** La figure 1.10 présente les chromatogrammes hypothétiques d'un mélange de six constituants groupés en trois paires dont les coefficients de distribution, et donc les facteurs de capacité, sont extrêmement différents. Dans le chromatogramme (a), les conditions ont été ajustées pour que les facteurs de la capacité des constituants 1 et 2 (K_1' et K_2') aient des valeurs optimales comprises entre 1 et 5.

Toutefois, les facteurs des autres constituants sont beaucoup plus grands que cet optimum. Dès lors, les pics des constituants 5 et 6 n'apparaissent qu'après un temps extrêmement long ; en outre ces pics sont tellement larges qu'il devient difficile de les identifier sans ambiguïté.

Comme montre le chromatogramme (b), on peut modifier les conditions pour optimiser la séparation des constituants 5 et 6, mais cela entraîne un regroupement des pics des quatre premiers constituants à un point tel que leur résolution est insuffisante. C'est dans ce cas que la durée totale d'élution est la plus courte.

Le comportement illustré sur la figure 1.10 se rencontre assez souvent lors de la résolution de mélanges complexes. Une solution à ce problème consiste à modifier les conditions qui déterminent les valeurs de K' au cours même de la séparation. Ces modifications peuvent être effectuées de manière discontinue ou continue. Ainsi, pour le mélange montré sur la Figure 1.10 les conditions au début de l'élution doivent être celles qui produisent le chromatogramme (a). Immédiatement après l'élution des constituants 1 et 2, on modifie les conditions pour se placer dans la situation optimale de séparation des constituants 3 et 4, comme dans le chromatogramme (c). Dès la sortie des pics de ces substances, l'élution doit se poursuivre.

Dans les conditions que l'on a utilisés pour obtenir le chromatogramme (b). Une telle procédure permet souvent d'obtenir une bonne séparation de tous les constituants d'un mélange en un minimum de temps.

Pour la chromatographie en phase liquide, les optimisations s'obtiennent changeant la composition de la phase mobile pendant l'élution (gradient de composition ou programmation de solvant). Pour la chromatographie en phase gazeuse, l'accroissement de la température E (programmation de température) permet d'optimiser les conditions de séparation.

1.9. Application de la chromatographie :

La chromatographie est un outil puissant et polyvalent pour séparer des espèces chimique très voisines. Elle peut également être utilisée tant pour l'identification qualitative que pour l'analyse quantitative d'espèces individuelles.

1.9.1. Analyse qualitative :

La chromatographie est couramment utilisée pour mettre en évidence la présence ou l'absence de substances dans des mélanges qui contiennent un nombre limité d'espèces de nature connue. Ainsi, dans un hydrolysate de protéine, on peut détecter au moins 30 acides aminés avec une faible probabilité d'erreur à l'aide d'un chromatogramme. Par contre, puisqu'un chromatogramme ne fournit qu'une seule information sur chaque espèce dans un mélange (son temps de rétention), l'utilisation de cette technique pour l'analyse qualitative d'échantillons complexes de composition inconnue est fortement limitée. On a remédié à cette limitation en couplant directement la sortie des colonnes chromatographiques à des spectromètres ultraviolets, infrarouge ou à des spectromètres de masse. Ces appareillages hydriques constituent de puissants outils pour l'identification complète des constituants de mélanges complexes.

Il est important de noter que, bien qu'un chromatogramme ne permette pas d'identifier à coup sûr toutes les espèces présentées dans un échantillon, il permet souvent de s'assurer de l'absence d'une espèce donnée. En effet, si un échantillon ne donne pas de pic au même temps de rétention qu'un étalon injecté dans les mêmes conditions expérimentales, c'est la preuve que le composé en question est absent (ou qu'il est présent à une concentration inférieure à la limite de détection du système) (Skoog *et al*, 2006).

1.9.2. Analyse quantitative :

La chromatographie doit son impressionnant développement à sa rapidité, sa simplicité, son coût relativement peu élevé et l'ampleur de son domaine d'application en tant que méthode de séparation. Toutefois, il est peu probable que son utilisation soit devenue à ce point répandue elle n'avait pu également fournir des informations quantitatives sur les espèces individuelles.

Selon (Skoog *et al*, 2006), la chromatographie quantitative se base sur la comparaison de l'aire ou de la hauteur du pic de l'analyte avec celle d'un ou plusieurs étalons. Si les conditions sont soigneusement contrôlées, ces deux paramètres varient linéairement avec la concentration.

-Dosages basés sur la hauteur du pic :

La hauteur d'un pic chromatographique s'obtient en joignant par une droite les lignes de base de et d'autre du pic et en mesurant la longueur de la verticale abaissée sur cette droite depuis le sommet du pic. Cette mesure peut habituellement s'effectuer avec une bonne précision et elle conduit à des résultats exacts, à moins que des variations de fonctionnement de la colonne ne modifient la largeur du pic pendant le laps de temps nécessaire à l'obtention des chromatogrammes de l'échantillon et des étalons. Les paramètres qui doivent être contrôlés

Soigneusement sont la température de la colonne, la vitesse d'écoulement de l'éluant et l'injection de l'échantillon. De plus, il faut prendre soin d'éviter de surcharger la colonne. L'influence de la vitesse d'injection de l'échantillon est particulièrement critique pour les premiers pics d'un chromatogramme. Des erreurs relatives de 5 à 10% ne sont pas rares lorsque l'injection se fait à l'aide d'une seringue. (Skoog *et al*, 2006)

-Dosages basés sur la l'aire du pic :

Pour déterminer les aires des pics, on utilise les fonctions spécialement prévues des logiciels de chromatographie, qui assurent non seulement le pilotage de la chromatographie, mais qui

Peuvent, en plus de l'acquisition des chromatogrammes, analyser les données, quantitative préprogrammées. **(Rouessac et Rouessac ,2004).**

-Étalonnage à l'aide de solution connue :

Selon **Skoog et al, 2006** La méthode la plus directe d'analyse quantitative par chromatographie consiste à préparer une série de solutions étalons dont la composition est proche de la solution inconnue. À partir des chromatogrammes des solutions étalons, on établit un graphique des aires des pics ou de leur hauteurs en fonction de la concentration. La fonction ainsi obtenue doit être une droite qui passe par l'origine ; les analyses sont basées sur ce graphique. Il faut fréquemment répéter l'étalonnage pour obtenir la meilleure exactitude.

La source d'erreur la plus importante propre à cette méthode d'étalonnages est généralement liée à l'incertitude sur le volume d'échantillon ; il arrive aussi que la vitesse d'injection y contribue. Le volume des échantillons est habituellement petit ($\approx 1\mu\text{l}$) et les incertitudes relatives associées à l'injection de volumes reproductibles de cette taille à l'aide d'une micro seringue peuvent être de l'ordre de plusieurs pourcent. La situation est encore plus difficile en chromatographie gaz – liquide où l'échantillon doit être injecté dans un sas porté à haute température. Dans le cas, l'évaporation qui se produit à l'orifice de l'aiguille peut entraîner de grandes variations du volume injecté.

les erreurs relatives sur le volume de l'échantillon peuvent être réduites à une environ 1 ou 2% à l'aide d'une vanne à boucle d'échantillonnage comme celle qui est représentée sur la figure suivante (1.11) la boucle d'injection de l'échantillon ACB est d'abord remplie de liquide (configuration a) ; lorsqu'on fait tourner la vanne (configuration b) , son contenu est entraîné sur la colonne . On a ainsi injecté dans la phase mobile un volume reproductible d'échantillon (le volume qui était contenu dans la boucle).

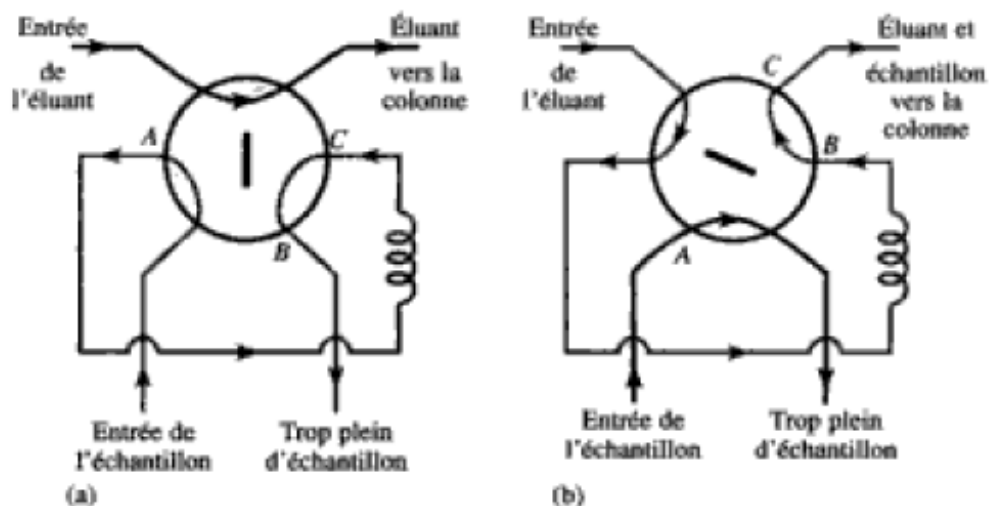


Figure 1.11 : vanne à boucle d'échantillonnage :

(a) position de remplissage de la boucle d'échantillon ;

(b) position d'injection de l'échantillon dans la colonne. (Skoog et al, 2006)

-Méthode de l'étalon interne :

La meilleure précision en chromatographie quantitative s'obtient en utilisant des étalons internes, car on minimise ainsi les incertitudes introduites par l'injection de l'échantillon, la vitesse d'écoulement et les variations d'état de la colonne. Dans cette méthode, une quantité soigneusement mesurée d'un étalon interne (constituée d'une substance non présente dans le mélange à analyser) est introduite dans chaque étalon et dans chaque échantillon ; le rapport de l'aire (ou la hauteur) du pic de l'analyte à l'aire (ou la hauteur) du pic de l'étalon interne constitue le paramètre analytique. Pour que cette méthode fournisse de bons résultats, il faut que le pic de l'étalon interne soit bien séparé des pics de tous les autres constituants présents dans l'échantillon, mais il doit être proche du pic de l'analyte. L'utilisation d'un étalon interne bien adapté peut conduire à des précisions relatives de 0.5% à 1%. (Skoog et al, 2006)

CHAPITRE 02

2.1. La Chromatographie en phase gazeuse:

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)



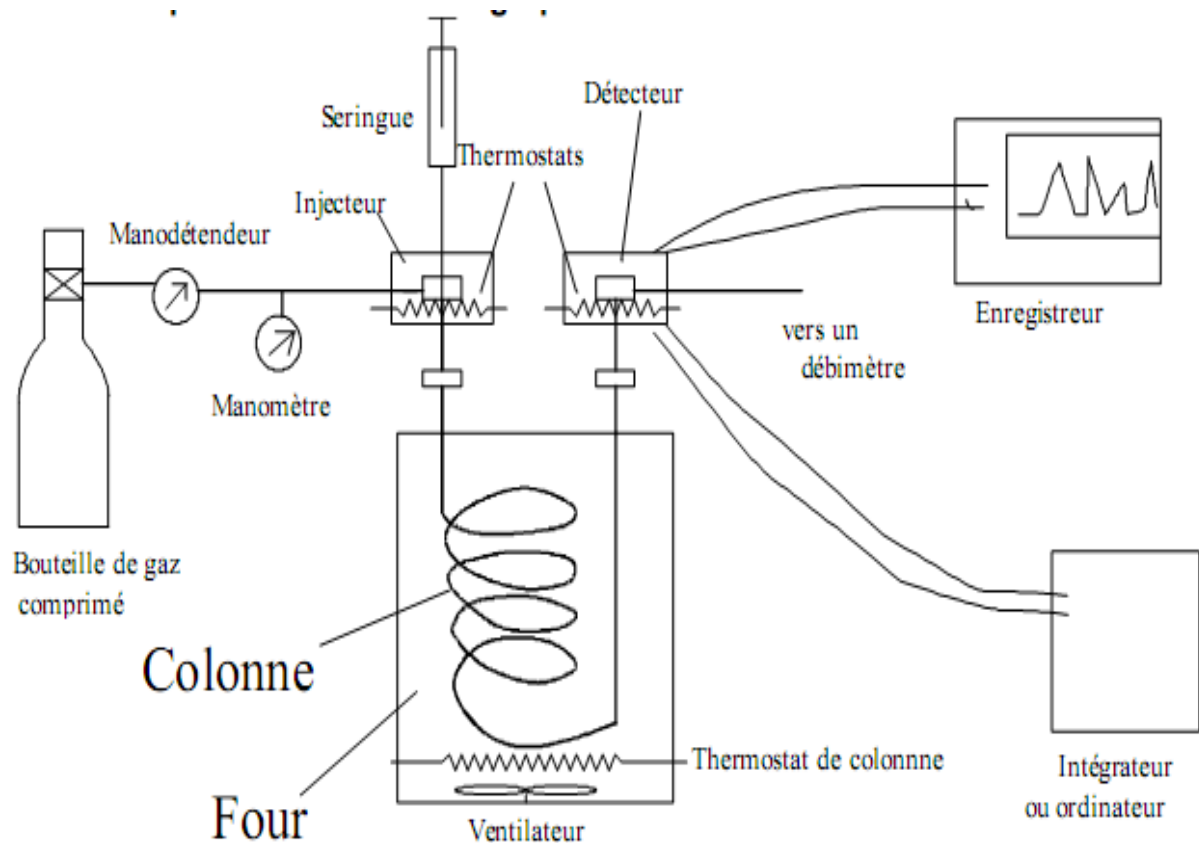
Figure 2.1 Schémas La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est la transposition de la chromatographie sur colonne dans laquelle la phase mobile liquide est remplacée par un gaz. C'est une méthode analytique très pratique, facile à mettre en œuvre. La séparation exige des quantités de l'ordre de la dizaine de microgrammes (1 mg dans 1mL de solvant, seringue d'injection de 10 μ L). (Bourguet et Augé ,2008)

-La chromatographie gaz- solide : utilise une phase stationnaire solide sur laquelle la rétention des analytes résulte d'une adsorption physique, La chromatographie gaz- solide n'a que des applications limitées à cause de trop fort rétention des molécules polaires et de la présence de traînées importantes dans les pics d'élution (une conséquence de caractère non linéaire des processus d'adsorption). Il s'ensuit que cette technique se limite à la seule séparation de quelques espèces gazeuses de faible masse molaire.

-La chromatographie gaz-liquide : basée sur le partage de l'analyte entre une phase gazeuse mobile et une phase liquide immobilisée sur la surface d'un support inerte. Le concept de

la chromatographie gaz-liquide a été formulée en 1941 par un Martin et Syngé, qui furent également à la base de développement de la chromatographie gaz-liquide (**Jones et Martin, 1952**) Trois ans plus tard, en 1955. Selon (**Willet, 1987**) Le premier appareil commercial de chromatographie gaz-liquide est apparu sur le marché. Depuis lors, le développement de cette technique a été phénoménal. On estime qu'actuellement plus de 200000 chromatographies sont couramment utilisées de par le monde. (**Schill et Freeman, (S.D)**)



Le Un chromatographe est constitué en première approximation de trois organes essentiels : l'injecteur, la colonne, le détecteur.

Les appareils :

Les appareils de chromatographie en phase gazeuse sont généralement équipés de différents compartiments qui sont :

-la chaîne se compose de :

Système d'injection manuel

Colonne Simplicity-Wax 30m*0.25mm*0.25 μ m

Four

Détecteur Mass DSQ II

Système d'acquisition

-Injecteur :

Il permet d'introduire l'échantillon à analyser. L'injection peut se faire d'une manière manuelle avec une seringue ou à l'aide d'un passeur automatique d'échantillons.

Il existe trois principaux modes d'injections : split, splitless et on-column. Au cours de nos analyses, nous avons utilisé le mode split.

L'injection en mode split est utilisée pour les échantillons concentrés. L'échantillon est vaporisé et mélangé avec le gaz vecteur, puis le mélange est divisé en deux parties. . **(Hmaida Dorra, 2016)**

-Détecteur :

Il permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne. La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes. Le détecteur le plus utilisé en CPG est celui à conductibilité thermique appelé catharomètre. (Cas de notre chromatographe) Sa température est généralement la même que celle de l'injecteur. **(Hadjadj et Massaoudi, 2010).**

Le détecteur utilisé au cours de nos analyses est un spectromètre de masse.

Une partie de l'échantillon est transformée en ions.

Ionisation : L'échantillon est porté à l'état gazeux ou liquide, il est ionisé dans la source de l'appareil.

Séparation : Les ions sont séparés par l'analyseur selon le rapport m/z.

Détection : Après séparation, les ions terminent leur trajet vers le détecteur. (Hmaida Dorra, 2016). Il y'a plusieurs types de détecteurs :

- Détecteur à conductibilité thermique (TCD).
- Détecteur à ionisation de flamme (FID).
- Détecteur thermoïoniques (NPD).
- Détecteur à capture d'électrons (ECD).
- Détecteur à photo- ionisation (PID).
- Détecteurs conduisant À des données structurales.
- Détecteur à émission atomique.

Autres détecteurs :

- Détecteur de masse (spectromètre de masse).
- Détecteur infrarouge.
- Détecteur ultraviolet.

-Colonne :

La colonne utilisée est une colonne polaire, Simplicity-Wax de géométrie 30m x 0.25mm x 0.25µm. . (Hmaida Dorra, 2016)

- Four :

Il permet de réaliser la programmation de température lors de l'analyse. Il est équipé d'un système de refroidissement rapide. (Hmaida Dorra, 2016)

-Alimentation en gaz vecteur :

Pour faciliter la détection d'un soluté, le gaz vecteur doit posséder des caractéristiques chimiques différentes de celles du soluté. On utilise :

L'azote R rectifié et privé d'oxygène de détection peu sensible ;

L'hydrogène de détection sensible mais très diffusible, très inflammable, dangereux, et non inerte chimiquement. Il peut être responsable d'hydrogénation au contact des filaments de platine ou d'une façon plus générale métalliques de l'appareil.

L'hélium et l'argon de détection sensible et inertes chimiquement. Mais ces deux gaz restent coûteux. (Burgot et Burgot, 2011).

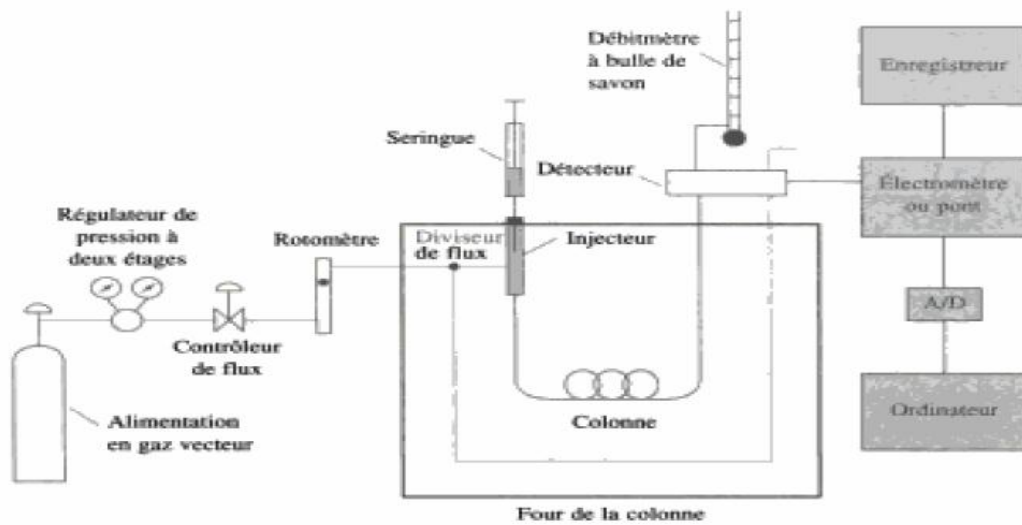


Figure 2.2 : Schéma d'un appareil de chromatographie gazeuse

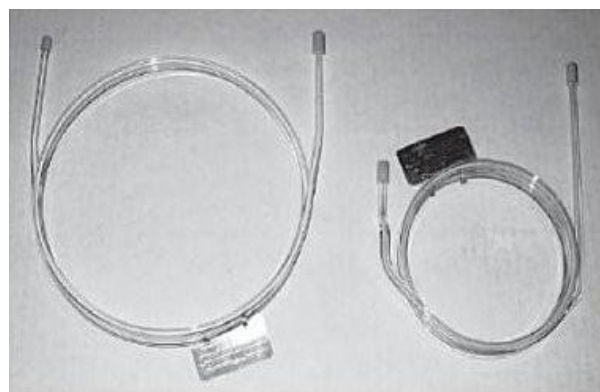


Figure 2.3 : Colonnes remplies : Réf E. Barry 2007 livre et site

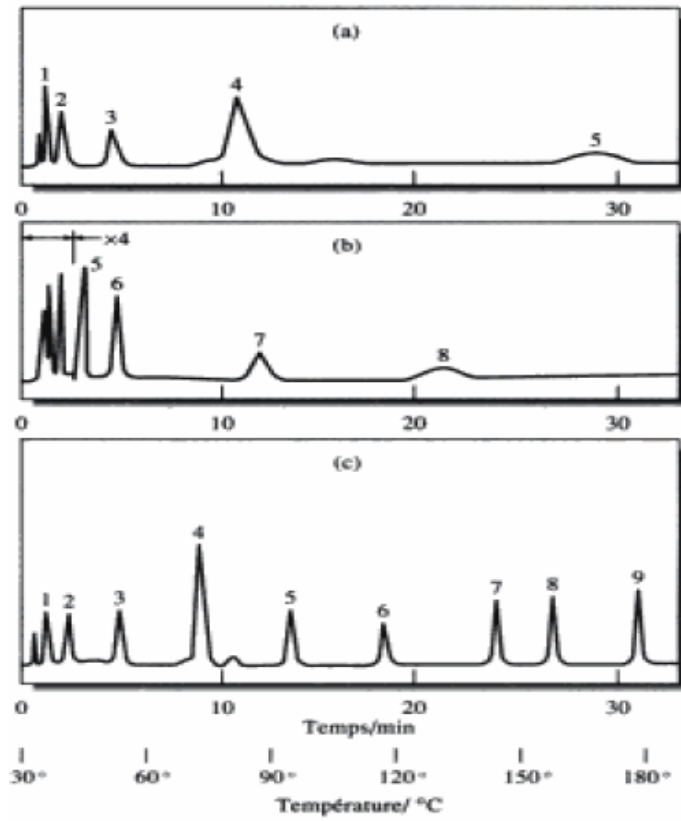


Figure 2.4 : Effet de la température sur des chromatogrammes en phase gazeuse

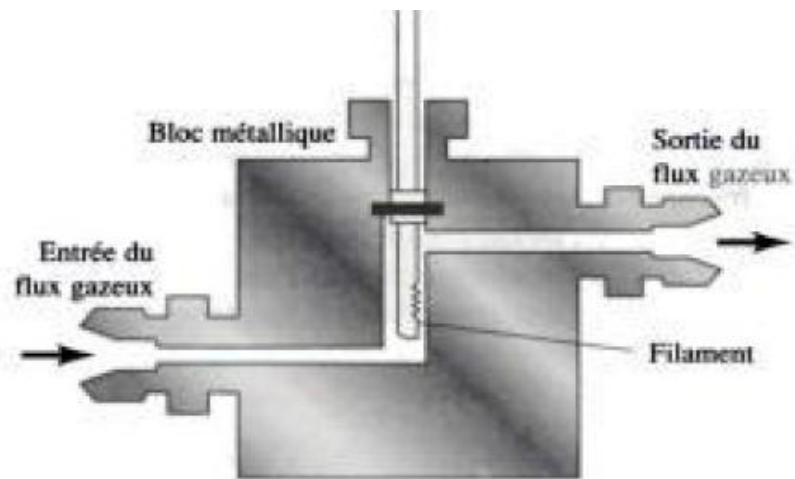


Figure 2.5 : Détecteur à conductivité thermique.

(Document de Varian Instrument Division, Palo Alto, CA.)

2.2. Les colonnes de chromatographie gazeuse et la phase stationnaire :

2.2.1. Les colonnes remplies de diamètre intérieur de l'ordre de 4 mm et de 1 à 5 m de long. Leur résolution est moyenne mais elles restent utiles pour des séparations préparatives ;

2.2.2. Les colonnes capillaires ou creuses dites de golay de diamètre intérieur varient de 0.10mm à 0.32 mm

Elles sont constituées d'un tube très fin en métal, verre ou polymère de 10 à 100 mètres de 0.10mm à 0.32 mm

Elles permettent des séparations extrêmement fines sur des quantités très minimes de mélange, inférieures à 1 µg. Leur haute efficacité est due au fait qu'avec une hauteur de plateau théorique inférieure à 1mm, elles possèdent un très grand nombre de plateaux.

Plusieurs colonnes de ce type sont actuellement disponibles sur le marché

-WCOT (Wall coated open tubular column ou colonne capillaire à film mince) : la phase stationnaire liquide est déposée en film mince sur la surface interne du capillaire en verre. Ces colonnes sont remplacées par des nouvelles colonnes très flexibles ou **FSOT** (fused silica open tubular) à base de silice fondue recouverte de polyimide ;

- colonne à couche mince :

-PLOT (porous layer open tubular column) : la phase stationnaire solide est déposée en couche mince directement sur la paroi de la colonne ;

-SCOT (support coated open tubular column) : le support inerte solide est déposé en couche mince et est imprégné de phase stationnaire liquide.

Ces colonnes capillaires courtes de 10 à 20 m et de faible diamètre interne inférieur à 100µm permettent de diminuer par 3 le temps d'analyse mais la capacité de charge réduite ne permet pas de les utiliser pour l'analyse de traces dans une matrice très chargée. (**Burgot et Burgot, 2006**)

Tableau 2.1 : propriétés et caractéristiques de colonnes de chromatographie gazeuse

	Type de colonne			
	FSOT	WCOT	SCOT	Remplie
Longueur, m	10-100	10-100	10-100	1-6
Diamètre interne, mm	0.1-0.3	0.25-0.75	0.5	2-4
Efficacité, plateaux/m	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Taille de l'échantillon, ng	10-75	10-1000	10-1000	10-10 ⁶
Pression relative	Faible	Faible	Faible	Élevée
Vitesse relative	Rapide	Rapide	Rapide	Lente
Inertie chimique	Le meilleur	→		La moins bonne
Flexibilité mécanique	Oui	Non	Non	Non

-Phases stationnaires :

Pour les remplir, 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 type de composés :

Les polysiloxanes et les polyéthylènes glycols, chaque catégorie pouvant faire l'objet de modifications structurales mineures. On peut y ajouter les phases particulières à base de cyclodextrines pour l'étude des composés optiquement actifs.

-phases stationnaires solides

Ces phases sont constituées par des matériaux adsorbants divers : silice ou alumine désactivées par des sels minéraux, tamis moléculaires, verres ou polymères. (**Rouessac et Rouessac,1992**)

Tableau 2.2 : Quelques phases stationnaires liquides courantes pour la chromatographie Gaz-liquide

Phase stationnaire	Nom commercial	Température Maximale/°C	Utilisations habituelles
Polydiméthyl siloxane	OV-3,SE-52	350	Phase non polaire à usage général ; médicaments ; stéroïdes ; PCB
5%phényl-poly-diméthyl siloxane	OV-3 ,SE-52	350	Esters méthyliques d'acides gras ; alcaloïdes ; médicaments ; composés halogénés
50% phényl-poly-diméthyl siloxane	OV-17	250	Médicaments ; stéroïdes ; pesticides ; glycols Un chromatographe est constitué en première approximation de trois : organes essentiels l'injecteur • le détecteur • la colonne •
50%Trifluoropropyl-polydiméthylène siloxane	OV-210	200	Chloroaromatique ; nitroaromatique ; Alkylbenzène substitué
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

-La phase stationnaire liquide :

La phase liquide immobilisée dans une colonne de chromatographie gaz-liquide doit présenter les propriétés suivantes : faible tension de vapeur (idéalement, le point d'ébullition

du liquide doit être au moins à 100C° au –dessus de la température maximale d'utilisation de la colonne), stabilité thermique, inertie chimique, propriétés de solvant telles que les valeurs de K' et α se situent dans le domaine optimale pour les solutés à séparer.

-Phases stationnaires greffées et réticulées :

Selon **Skoog et al, 2006**, Des firmes commerciales proposent des colonnes dont les phases stationnaires sont greffées et/ou réticulées. Le greffage et la réticulation ont pour but d'augmenter la durée de vie de la phase stationnaire qui peut être rincée à l'aide d'un solvant s'il y a eu contamination.

-Épaisseur du film :

Les colonnes commerciales ont des phases stationnaires dont l'épaisseur varie de 0,1 à 5 μm . l'épaisseur du film affecte surtout le pouvoir de rétention et la capacité de la colonne. On utilise des films épais pour les analytes très volatils parce que de tels films retiennent les solutés pendant un temps plus long, ce qui améliore la séparation. Les films minces sont utilisés pour séparer des espèces peu volatiles en un temps raisonnable. Dans la plupart du cas, on 0,32 mm de diamètre. Avec les colonnes mégabores, on utilise souvent des films de 1 à 1,5 μm d'épaisseur. Actuellement, on vend également des colonnes tapissées de films de 8 μm .

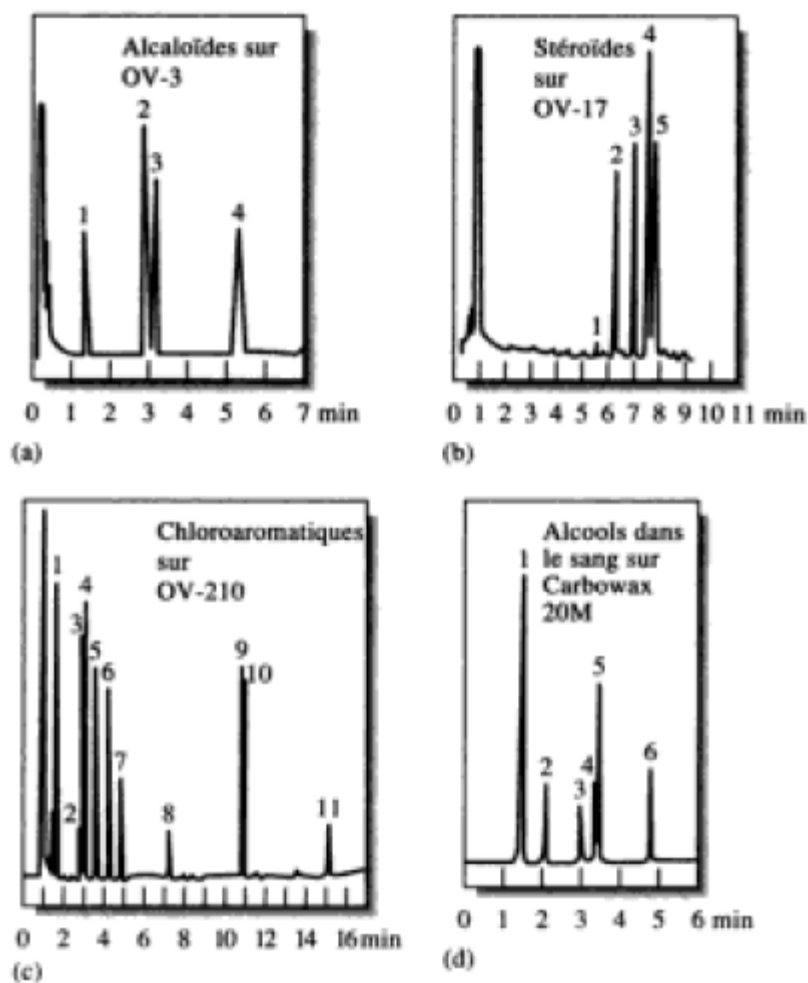


Figure 2.6 : Exemple de chromatogramme sur colonnes capillaires tapissées

2.3. Applications de la chromatographie gazeuse :

2.3.1. Analyse qualitative : identification, détermination du bon déroulement d'une réaction, efficacité du procédé de purification. Par co-injection, on augmente la surface du composé à identifier et on voit ainsi le bon rapport de composé que l'on veut dans un mélange réactionnel. Elle permet de voir la pureté d'un composé.

2.3.2. Analyse quantitative : analyse d'un grand nombre de substances organiques gazeuses (liquides dilués dans un solvant ou solide dissous dans un solvant). La surface du pic correspond à chaque composant d'un mélange et est proportionnelle à la quantité de composant. Chaque composé répond à un temps de rétention :

Il est possible de faire une courbe d'étalonnage pour chaque composé et de doser un échantillon. (Bourguet et Augé, 2008)

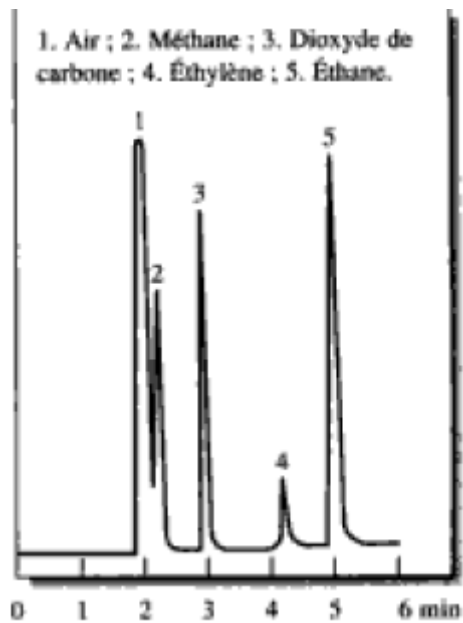


Figure 2.7 : Exemple de chromatogramme gaz-solide sur une colonne PLOT.

CHAPITRE 03

3.1. La Chromatographie liquide à haute performance :

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une méthode populaire et couramment utilisée pour l'analyse des médicaments traditionnels à base de plantes, car elle est facile à utiliser et n'est pas limitée par la volatilité ou l'instabilité thermique des constituants des échantillons contrairement à la GC. Aussi plusieurs types de phase stationnaire sont utilisés et cette méthode chromatographique peut être associée à de nombreux détecteurs (UV, ELSD, CAD, IR-TF, MS et RMN) offrant ainsi beaucoup de possibilités pour l'analyse de différentes classes de composés chimiques. (Kamboj, 2011 ;Liang et al ,2009 ; Makambila et al, 2011et Deschamps et al ,2001).

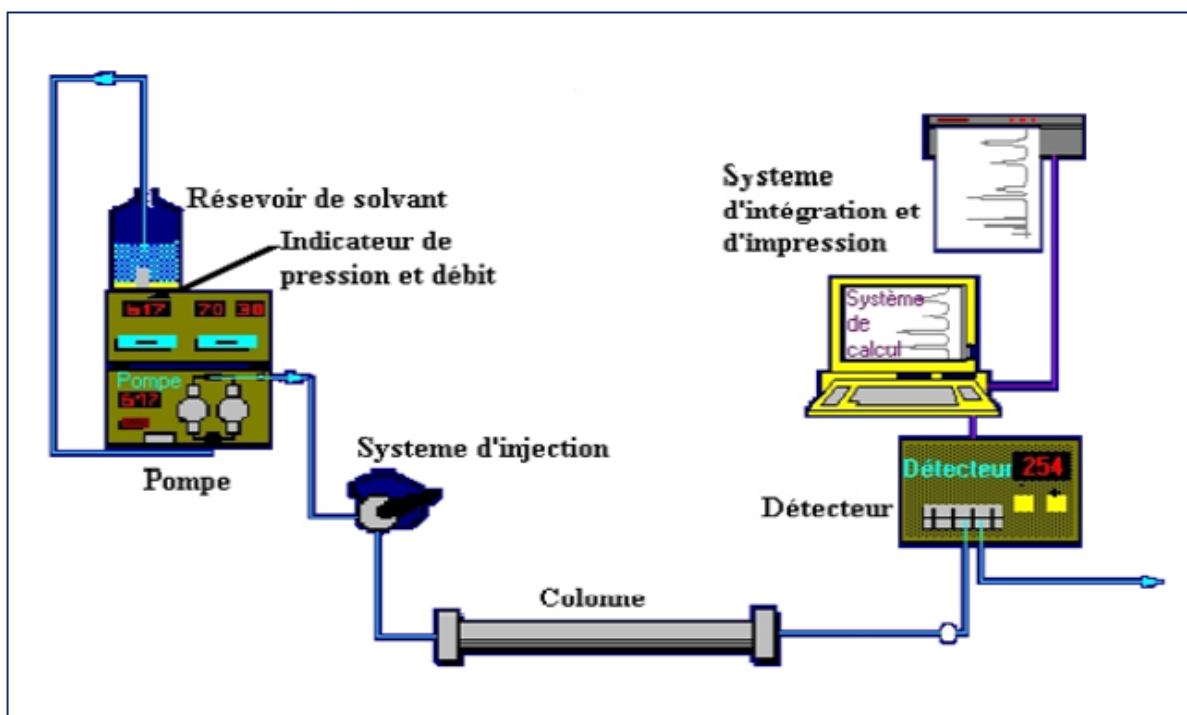


Figure3.1 : principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC

3.2. Principe de la séparation :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. Á la sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. (ANONYME10, 2010).

3.3. L'appareillage :

Les différentes composantes d'une chaîne HPLC sont présentées sur le schéma suivant (figure3.2). Tous les organes du système sont liés à un micro-ordinateur qui pilote tous les processus.

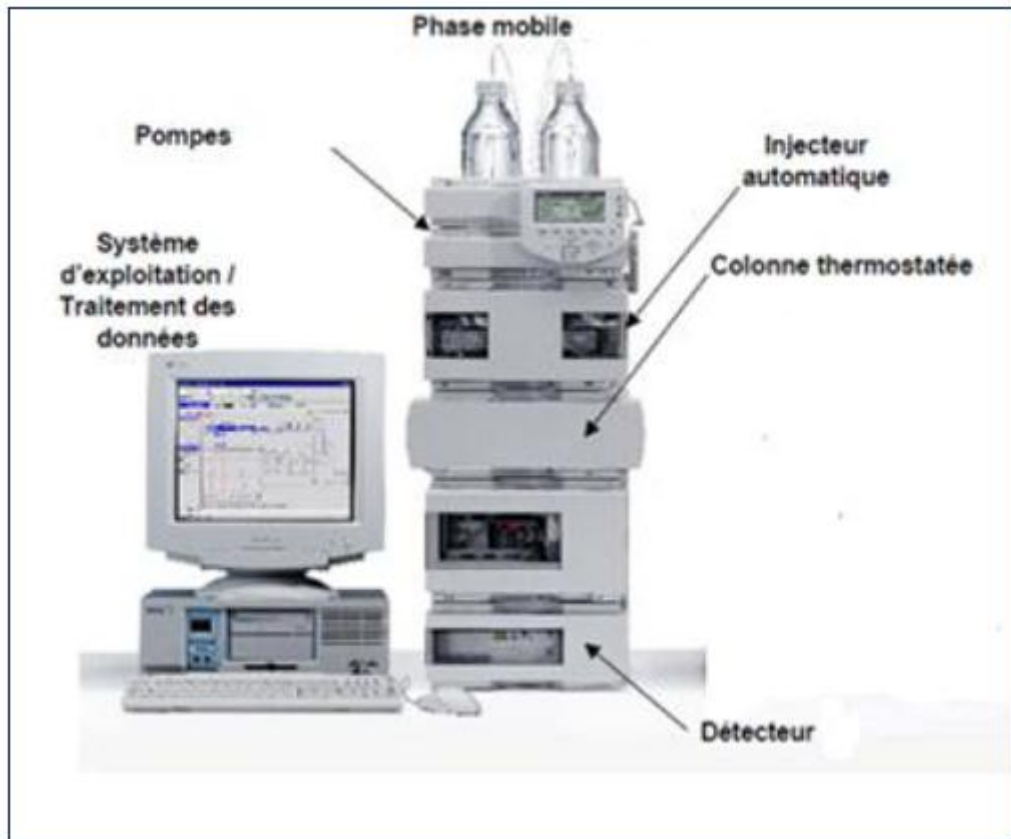


Figure 3.2 : Les organes d'une chaîne HPLC

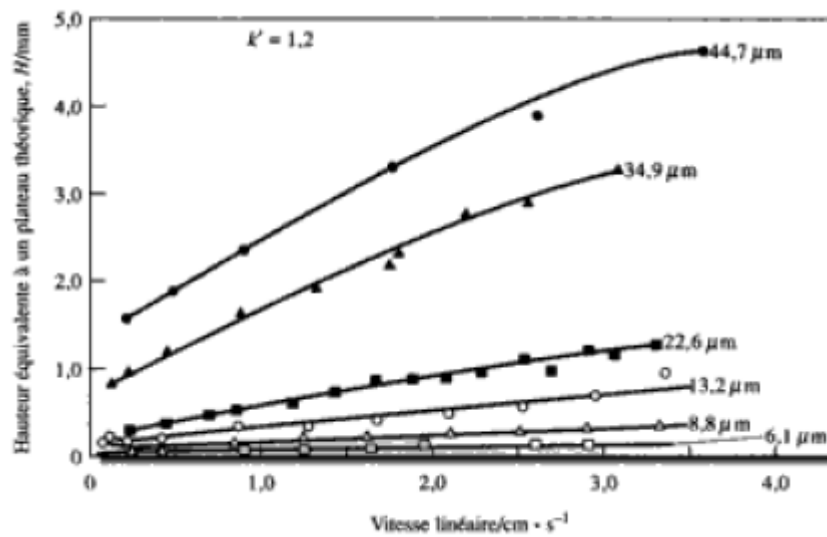


Figure 3.3 : Effet du débit et de la granulométrie du support sur la valeur de H en chromatographie liquide.

Dimension de la colonne : 30cm×2,4 mm

(Majors et chromatogr, 1973)

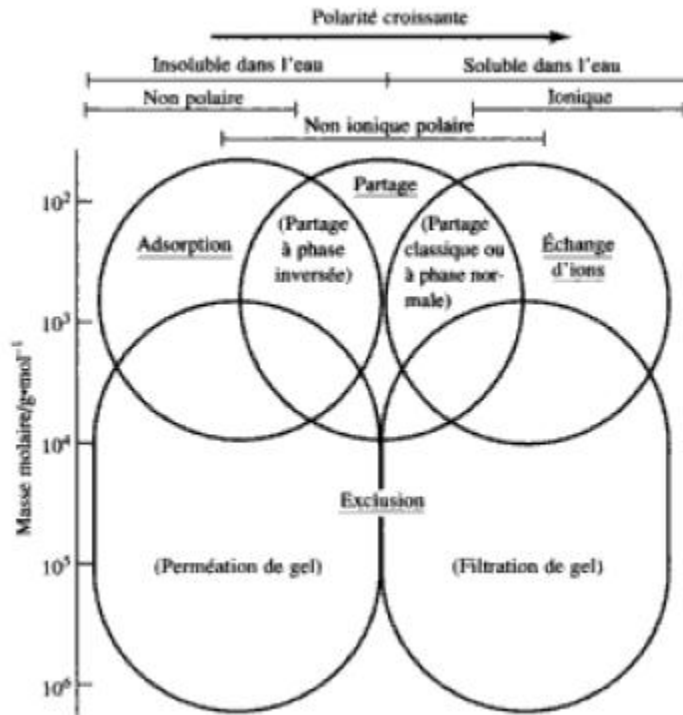


Figure 3.4 : Domaine d'application de la chromatographie liquide

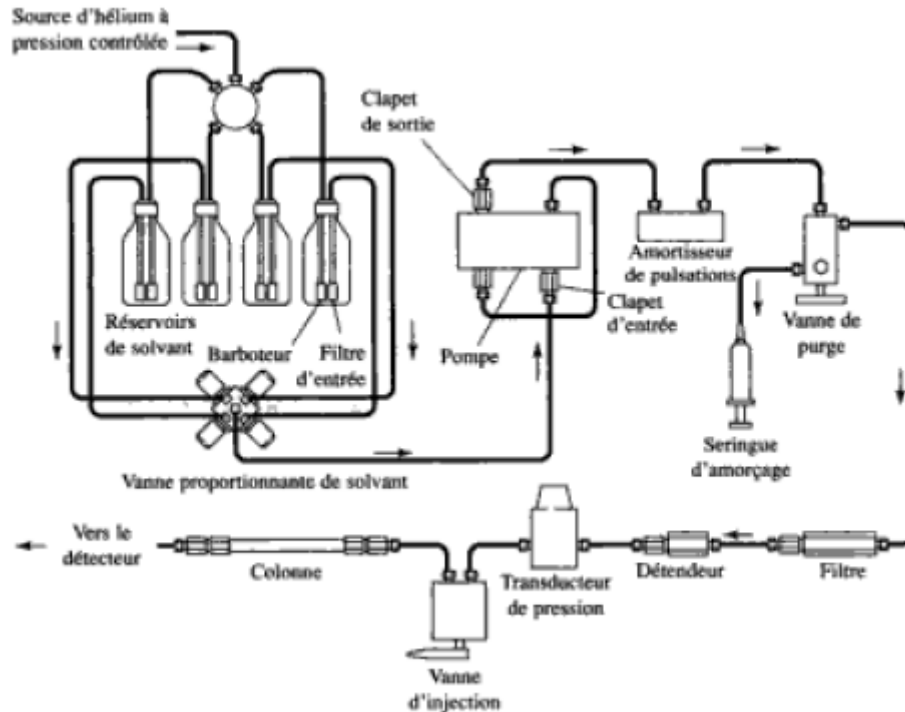


Figure 3.5 : Schéma d'un appareil de chromatographie liquide a haute Performance.

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostaté), D'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel pour traiter les signaux).

3.3.1. Les réservoirs de phase mobile et le traitement du solvant :

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs façons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser de gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé. (Dgraeve et Berthou, 1986).

3.3.2. Les dispositifs de pompage :

Le système de pompage est la partie du chromatographe qui permet de prélever l'éluant, d'en réguler le débit et de maintenir la pression de l'ensemble. Sur une chaîne HPLC classique, le système de pompage est capable de refouler jusqu'à une pression de 400 bars, En pratique, la pression de travail est généralement comprise entre 100 et 250 bars.

La plupart des constructeurs ont équipé leurs systèmes de pompage de pompes à pistons avec un mouvement alternatif. (Nicaise ,2013)

On utilise deux types de pompes mécaniques : une seringue commandée par vis et une pompe alternative.

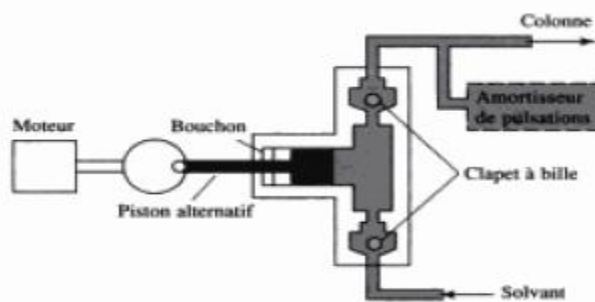


Figure 3.6 : Une pompe alternative pour CLHP

(Skoog et al, 2006)

3.3.3. Les dispositifs d'injection de l'échantillon :

En CLHP, on injecte souvent l'échantillon à l'aide d'une seringue à travers un septum en élastomère ; toutefois, cette procédure n'est pas très reproductible et reste limitée aux pressions inférieures à environ 100 bars. En injection à écoulement bloqué, on arrête momentanément le flux de solvant, on ouvre un ajustage au-dessus de la colonne et on y injecte directement l'échantillon à l'aide d'une seringue. La méthode d'introduction de loin la plus utilisée emploie des boucles d'échantillonnage (Figure 3.5). Ces dispositifs font généralement partie intégrante de l'appareillage de CLHP moderne qui possède des boucles interchangeables permettant de choisir des volumes d'échantillon compris entre 5 et 500 μl . Avec ce système, la reproductibilité des volumes injectés est de quelques dixièmes de pourcent. (Skoog *et al*, 2006).



Figure 3.7 : une boucle d'échantillonnage pour CLHP.

(Document de Beckman Instrumentes, Fullerton, CA.)

3.3.4. Les colonnes :

Les colonnes de CLHP sont usuellement en acier inoxydable, quoiqu'on utilise parfois de tubes de verre à paroi épaisse dans le domaine des basses pressions (< 40 bars). La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 mm, avec des

tailles particulières de 5 à 10 μm . ce type de colonne offre souvent de 40 000 à 60 000 plateaux par mètre. Depuis peu, existent de microcolonnes à haute performance qui ont un diamètre intérieur de 1 à 4,6 mm et une longueur de 3 à 7,5 cm. Ces colonnes, qui sont remplies de particules de 3 à 5 μm , offrent jusqu'à 100000 plateaux par mètre et présentent les avantages de la rapidité et d'une consommation minimale de solvant. Cette dernière propriété est d'une importance considérable car les solvants de haute pureté requis pour la CLHP sont très coûteux. La(Figur3.6) illustre le fonctionnement de ce type de colonne : huit composés différents ont pu être séparés en quelque 15 s. La colonne mesure 4 cm de long et a un diamètre intérieur de 4 mm ; elle est remplie de particule de 3 μm .

Le matériau de remplissage le plus courant employé en CLHP est de la silice, préparé en agglomérant des particules submicronique de silice sous la forme d'agrégats plus gros, de diamètre extrêmement uniforme. Ces micrograins sont souvent recouverts d'un mince film organique qui est physiquement ou chimiquement lié à la surface. Parmi les autres matériaux utilisés, figurent des particules constituées d'alumine, de polymères poreux ou de résines échangeuses d'ions.

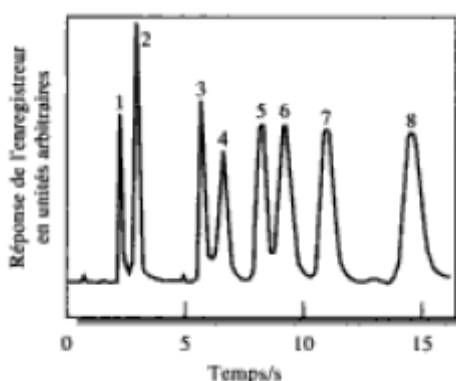


Figure 3.8 : séparation isocratique à grande vitesse

(Scott, 1984)

On place souvent une courte colonne de protection en amont de la colonne analytique afin d'en augmenter la durée de vie, en éliminant les poussières et les contaminants contenus dans les solvants. Dans le cas de la chromatographie liquide, la colonne de garde sert également à saturer la phase mobile avec une portion de la phase stationnaire afin de minimiser les pertes en phase stationnaire de la colonne analytique. La composition de la colonne de garde doit

être semblable à celle de la colonne analytique ; toutefois, ses dimensions particulières sont usuellement plus grandes afin de minimiser la perte de charge. (Skoog *et al*, 2006).

3.3.5. Les détecteurs :

Les détecteurs les plus utilisés sont les spectrophotomètres dans l'ultraviolet/visible (UV/Vis), ceux qu'on a utilisés. Ils mesurent l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. On trouve aussi les détecteurs à barrette de diodes, la fluorimétrie, la réfractométrie différentielle, des méthodes électrochimiques, la spectrométrie de masse, la dispersion de la lumière, la radioactivité...etc. Les détecteurs absorptiométriques dans l'ultraviolet ou le visible et le réfractomètre différentiel sont les plus utilisés. Ces détecteurs sont les plus couramment utilisés en HPLC car ils sont peu sensibles aux fluctuations de débit et de température et un grand nombre de solvants ont une bonne transparence dans l'UV. (JACOB, 2010).

Tableau 3.1 : Performances des détecteurs pour la CLHP

Détecteur CLHP	Disponible sur le marché	Limite de détection détecteurs commerciaux)	Limite de détection (limites actuelles)
Absorbance	Oui	100pg-1 ng	1 pg
Fluorescence	Oui	1-10 pg	10 fg
Electrochimique	Oui	10 pg-1 ng	100 fg
Indice de refraction	Oui	100 pg-1 µg	10 ng
Conductivité	Oui	500 pg-1 ng	500 ng
Spectrométrie de masse	Oui	100 pg-1 ng	1 pg
IR à transformée de Fourier	Oui	1 µg	100 ng
Diffusion de la lumière	Oui	10µg	500 ng
Activité optique	Non	-	1 ng
Sélectif par element	Non	-	10 ng
Photoionisation	Non	-	1 pg – 1 ng

(Yeung *et al*, 1986)

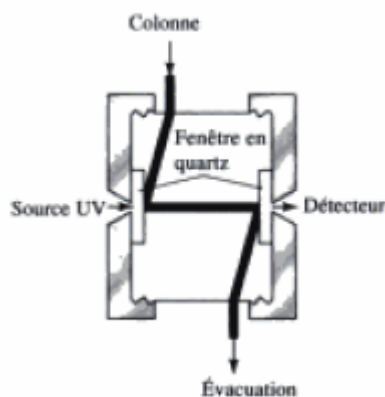


Figure 3.9 : détecteur UV pour CLHP.

Un autre détecteur largement utilisé mesure la variation d'indice de réfraction du solvant due à la présence des molécules d'analyte. Contrairement à la plupart des autres détecteurs cités dans le tableau 3.1, le réfractomètre n'est pas sélectif et répond à tous les solutés ; sa sensibilité est par ailleurs quelque peu limitée. On peut également utiliser divers détecteurs électrochimiques qui effectuent des mesures potentiométriques, conductométriques ou voltampérométriques. La figure 3.10 montre l'exemple d'un détecteur ampérométrique.

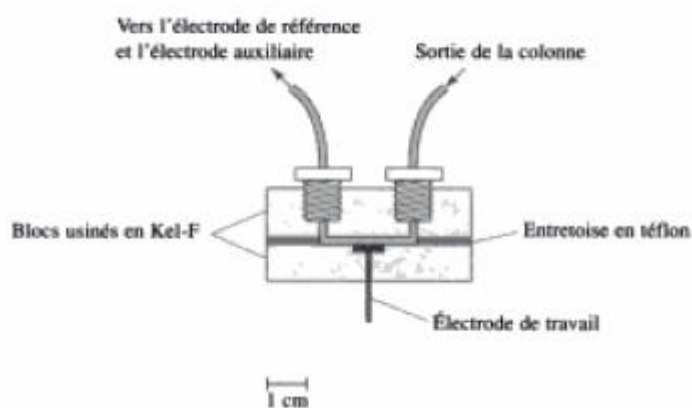


Figure 3.10 : détecteur ampérométrique pour CLHP

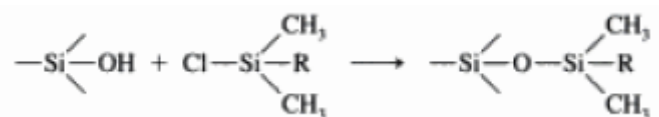
3.4. La chromatographie de partage :

De toutes les méthodes de chromatographie en phase liquide, la plus utilisée est la chromatographie de partage qui peut être subdivisée en chromatographie liquide-liquide et liquide-phase greffée, la différence réside dans la manière dont on fixe la phase stationnaire

sur les particules du support. Pour le partage liquide-liquide, il s'agit d'adsorption physique, alors que la phase greffée implique des liaisons covalentes. A l'origine, les chromatographies de partage étaient exclusivement du type liquide-liquide, alors que se sont actuellement les supports à phase greffée qui prédominent en raison de leur plus grande stabilité. Les séparations liquide-liquide ne sont plus réservées qu'à certaines applications particulières. (Skoog *et al*, 2006).

3.4.1. Supports à phase greffée :

La plupart des supports à phase greffée sont préparés par la réaction d'un organochlorosilane avec les groupements –OH préalablement formés sur la surface de particules de silice par hydrolyse dans l'acide chlorhydrique dilué et chaud. Le produit obtenu est un organosiloxane. La réaction peut s'écrire.



Où R est usuellement un groupement n-octyle ou n-octadécyle. D'autres groupements fonctionnels organiques ont été greffés sur des surfaces de silice, notamment des amines aliphatiques, des éthers, des nitriles et des hydrocarbures aromatiques. On dispose ainsi de toute une gamme de polarités pour la phase stationnaire.

Les supports à phase greffée sont nettement plus stables que ceux où la phase stationnaire est retenue par simple imprégnation. Pour de tels supports, il faut régulièrement retraiter les surfaces solides parce que la phase stationnaire en est progressivement éliminée par la phase mobile. Pour cette même raison, la technique du gradient d'élution ne peut pas y être appliquée. L'inconvénient majeur des supports à phase greffée consiste en ce que leur capacité est relativement limitée.

3.4.2. Supports à phase normale et à phase inversée :

On peut distinguer deux types de chromatographie de partage selon la polarité relative des phases mobiles et stationnaire. Les premiers travaux de chromatographie liquide utilisaient des phases stationnaires très polaires, telles que le triéthylèneglycol ou l'eau ; un solvant relativement non polaire, tel que l'hexane ou l'éther i-propylique, servait de phase mobile. Pour des raisons historiques, ce type de chromatographie est appelé actuellement chromatographie classique ou normale. En chromatographie en mode inversé, c'est la phase stationnaire qui est non polaire (souvent un hydrocarbure), et la phase mobile est un solvant

relativement polaire. (**Krstulovic et Brown, 1982**). En chromatographie en mode normal, le constituant le moins polaire est élué le premier ; l'augmentation de polarité de la phase mobile réduit donc son temps d'éluion. Par contre, dans la méthode en mode inversé, le constituant le plus polaire est élué le premier et l'augmentation de polarité de la phase mobile allonge son temps d'éluion.

On estime que plus des trois quarts des séparations par CLHP s'effectuent actuellement sur des supports de silice greffée octyle ou octadécyle en mode inversé. Sur ces colonnes, les longues chaînes hydrocarbonées sont alignées parallèlement les unes aux autres et perpendiculairement à la surface des particules, ce qui produit une surface hydrocarbonée hérissée, non polaire. La phase mobile utilisée pour de tels supports est souvent une solution aqueuse contenant diverses concentrations d'autres solvants tels que le méthanol, l'acétonitrile ou le tétrahydrofurane. (**Skoog et al, 2006**).

3.4.3. Choix des phases mobiles et stationnaires :

Pour être efficace, la chromatographie de partage requiert un équilibre judicieux entre les forces intermoléculaires qu'impliquent les trois acteurs du processus de séparation : l'analyte, la phase mobile et la phase stationnaire. Ces forces intermoléculaires peuvent être qualitativement classées en termes de polarité relative. En général, la polarité des groupements fonctionnels organiques usuels augmente dans l'ordre : hydrocarbures aliphatiques < oléfines < hydrocarbure aromatique < halogénures < sulfures < éthers < nitrodérivés < esters \approx aldéhydes \approx cétones < alcools \approx amines < sulfones < sulfoxydes < amides < acides carboxyliques < eau.

En règle générale, la plupart des séparations chromatographiques s'effectuent en adaptant la polarité de la phase stationnaire à celle de l'analyte ; on utilise par contre une phase mobile dont la polarité est extrêmement différente. Cette procédure est généralement plus efficace que celle où les polarités de l'analyte et de la phase mobile sont voisines, mais différentes de celle de la phase stationnaire. Dans ce dernier cas, la phase stationnaire ne peut guère retenir l'analyte et les temps de rétention deviennent trop courts. A l'autre extrême, si les polarités de l'analyte et de la phase stationnaire sont trop voisines, les temps de rétention requis deviennent prohibitifs. (**Skoog et al, 2006**)

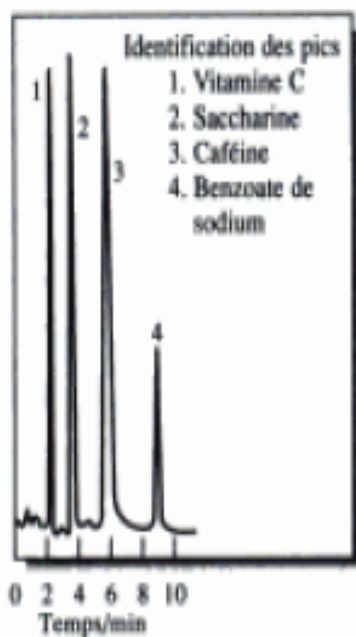


Figure 3.11 : chromatographie liquide à phase greffée d'additifs de limonade.

(Document de Du Pont Instrument Systems, Wilmington, DE)

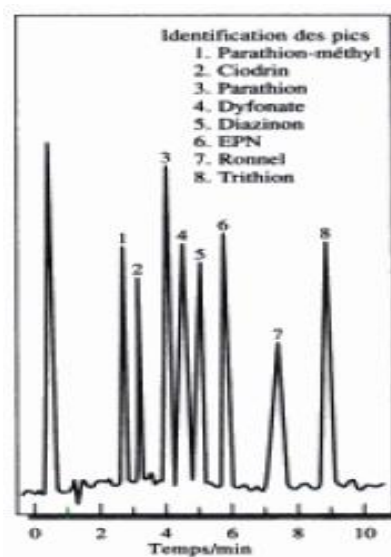


Figure 3.12 : chromatographie liquide à phase greffée d'insecticides organophosphorés.

(Document de IBM Instrumentes, INC, Danbury, CT.)

3.4.4. Applications :

Les figures 3.9 et 3.10 montrent des exemples d'application de chromatographie de partage liquide-phase greffée. Le tableau 3.2 illustre la grande variété d'échantillons que cette technique permet d'étudier.

Tableau 3.2 : Application de la CLHP de partage (Skoog et al, 2006).

Domaine	Exemples de mélanges
Pharmaceutique	Antibiotique, sédatifs, stéroïde, analgésiques
Biochimique	Acide aminés, protéines, hydrates de carbone, lipides
Alimentaire	Edulcorants artificiels, antioxydants, aflatoxines, additives
Industrie chimique	Aromatique condensés, surfactants, combustibles pour fusée, colorants
Pollution	Pesticides, herbicides, phénols, PCB
Chimie légale	Médicaments, poisons, alcool dans le sang, stupéfiants
Analyse médicale	Acides biliaires, métabolites de médicaments, extraits d'urine, œstrogènes

3.5. La chromatographie d'adsorption :

La chromatographie d'adsorption met en œuvre des phases stationnaires solides finement divisées appelées adsorbants et pour cette raison, cette chromatographie est souvent synonyme de chromatographie liquide –solide .c'est la plus ancienne des méthodes chromatographiques (expérience de Tswett, 1903).Elle s'applique aussi bien à la séparation des composés présentant des groupements fonctionnels différents qu'à celle d'isomères. Elle ne convient pas à la séparation de molécules très polaires souvent adsorbées de manière irréversible sur la phase stationnaire.

L'adsorption est mise à profit aussi bien en chromatographie d'élution qu'en chromatographie de développement. **(Burgot et Burgot ,2011)**

La chromatographie d'adsorption se pratique soit sur couche mince, soit sur colonne, en phase liquide ou en phase gazeuse. Dans le cas de la chromatographie sur colonne, celle-ci (en verre ou en acier inoxydable) est remplie de particules solides, à des granulométries, porosités et activités adaptées au cas à résoudre. En couche mince régulière (0,25 à 2 mm, généralement).

Les adsorbants les plus largement employés sont l'hydroxylapatite, l'alumine ou le gel de silice (tableau 3.3). Ces phases doivent être activées avant la séparation, en les mettant à l'étuve pour enlever les molécules d'eau qui saturent les sites d'adsorption. **(Marouf, 2001 – 2002).**

Tableau3.3: Adsorbant couramment utilisés en chromatographie d'adsorption.

(Marouf, 2001-2002)

Carbonate de calcium

Sulfate de calcium

Hydroxylapatite (phosphate tricalcique)

Carbone de magnesium

Oxyde de calcium

Gel de silice

Charbon active

Oxyde de magnesium

Alumine (oxyde d'aluminium)

La phase mobile (éluant) est constituée par des mélanges de solvants organiques non aqueux de polarité variable. Ces derniers sont classés en séries éluotropes en fonction de leur capacité à désorber les molécules adsorbées sur un gel donné (tableau 3.4). Quelques microlitres de la solution à analyser sont introduits au sommet de colonne. L'éluion des molécules adsorbées se fait généralement par augmentation progressive de la polarité de la phase mobile. Au cours de cette éluion par gradient, les composés qui ont l'affinité la plus faible avec la phase stationnaire apparaissent en premier dans l'éluat et ceux ayant l'affinité la plus forte en dernier (Marouf, 2001 – 2002).

Tableau 3.4 : Eluants utilisés comme phase mobile en chromatographie d'adsorption (classés par ordre de polarité croissante). (Marouf, 2001 – 2002).

Hexane, heptanes**Cyclohexane****Tétrachlorure de carbone****Benzène****Toluène****Diéthyl ether****Chloroforme****Dichlorométhane****Acétate d'éthyle****Butanol-1****Pyridine*****n*-Propanol****Ethanol****Méthanol****Eau****Acide organique****Acides in organiques et bases**

La chromatographie d'adsorption est principalement utilisée pour la séparation des substances polaires non ioniques ou des substances non polaires, tels que les lipides. (Marouf, 2001-2002)

3.5.1. Applications :

La CLHP liquide-solide s'utilise surtout pour séparer des composés organiques relativement non polaires, insoluble dans l'eau, et dont les masse molaires sont inférieures à environ 5000. La chromatographie d'adsorption l'emporte sur les autres méthodes notamment par sa capacité à fractionner des mélanges d'isomères, tels que les dérivés du benzène substitués en méta et en para. (Skoog et al, 2006).

3.6. La chromatographie par échange d'ions :

D'après (Rouessac et al, 2004) Cette techniques de la chromatographie est orientée vers la séparation des ions et des composés polaires. Pour cela on utilise des colonnes contenant des phases stationnaires comportant des sites ioniques pour qu'il se crée des interactions dipolaires avec les analytes à séparer. Plus grande est la charge portée par un soluté, plus ce dernier est retenu par la phase stationnaires. Ce processus d'échange est lent. Comparé à ceux qui régissent les autres types de chromatographie. Pour les composés organiques, il se superpose au mécanisme précédant les effets déjà décrits en CLHP avec les colonnes à polarité inversée.

Parmi les composés séparable en CI on trouve les mono ou polysaccharide, les nucléosides et nucléotides, les acides carboxyliques les anions et cations organiques ou minéraux divers (métaux de transition, terres rares)

Les appareils sont constitués de modules identiques à ceux déjà rencontrés en CLHP. Les parties au contact de la phase mobile doivent être en matériaux inertes compte tenu de l'agressivité des solutions aqueuses acides ou basiques qui servent d'éluants.

La progression et la séparation des composés de l'échantillon reposent sur des phénomènes d'échanges ioniques. On distingue deux situations :

- 1- si on cherche à séparer des espèces cationiques (type M^+), on choisit une colonne, appelée *cationique*, dont la phase stationnaire comporte des sites aptes à échanger les cations.
- 2- si on cherche à séparer des anions (type A^-) on choisie une colonne dite *anionique*. Celle-ci est obtenue par exemple à partir d'un polymère comportant des groupements ammonium). (Rouessac et Rouessac, 2004).

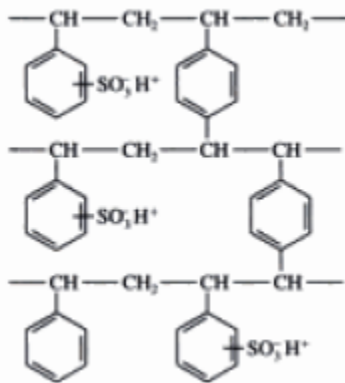
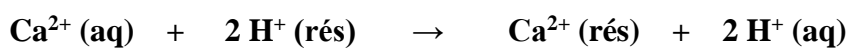


Figure 3.13 : structure d'une résine échangeuse d'ion en polystyrène réticulé.

3.6.1. Les équilibres d'échange d'ions :

On peut traiter les équilibres d'échange d'ions par la loi d'action de masse. Ainsi, lorsqu'une solution diluée d'ions calcium est mise en contact avec une résine acide sulfonique, on observe l'équilibre suivant :



3.6.2. Application des résines échangeuses d'ions à la chromatographie :

En chromatographie par échange d'ion, les ions d'analyte sont introduits au sommet d'une colonne remplie d'une résine adéquate. L'élution est ensuite effectuée à l'aide d'une solution qui contient un ion qui a une plus grande affinité que les ions d'analyse vis-à-vis des groupements chargés de la résine. Par exemple, des anions tels que le chlorure, le thiocyanate, le sulfate et le phosphate peuvent être séparés sur une résine échangeuse d'anions conditions sous sa forme OH^- .

Dans ce cas particulier, l'échantillon est d'abord introduit en tête de colonne, où les anions sont retenus



On effectue ensuite l'élution avec une solution diluée de base qui favorise la réaction inverse et libère les anions provoquant la séparation en cours d'élution.

Un des aspects positifs de la chromatographie par échange d'ions est qu'elle couple très aisément avec les mesures de conductivité afin de détecter et de déterminer la concentration

des éluats. La chromatographie par échange d'ions avec détection conductimètres des ioniques, a été décrite pour la première fois en 1975 et est devenue actuellement une méthode très employée pour la détermination quantitative de diverses espèces chargées inorganiques. (**Fritz et al ,1987 ; Small, 1989**)

Deux types de chromatographies basées sur les résines échangeuses d'ions sont couramment utilisés : la chromatographie ionique avec neutralisation et celle à colonne unique. Elles diffèrent par la technique mise en œuvre pour empêcher que la conductivité de l'électrolyte éluant ne complique la mesure de la conductivité des analyses.

3.6.3. Chromatographie ionique avec neutralisation :

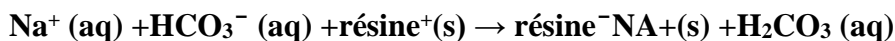
Les détecteurs de conductivité possèdent un grand nombre des propriétés qui caractérisent le détecteur idéal. Ils peuvent être très sensibles, leur réponse aux espèces chargées est universelle et, en général, ils répondent de manière prévisible à la variation de concentration. De plus, le maniement de ces détecteurs est simple, ils sont peu coûteux à construire et à entretenir, faciles à miniaturiser et ils peuvent fonctionner longtemps et de manière fiable .La seule limitation à leur utilisation, qui a retardé leur application générale chromatographie ionique jusqu'au milieu des années 1970, est due aux concentrations élevées en électrolyte requises pour pouvoir mener l'élution en un temps raisonnable. La conductivité des constituants de la phase mobile masque ainsi celle des ions d'analyte, ce qui réduit considérablement la sensibilité du détecteur.

Ce problème a été résolu en 1975 par l'introduction d'une colonne de neutralisation de l'éluant placée à la sortie de la colonne échangeuse d'ions (**Small et al ,1975**). Cette colonne de neutralisation est remplie d'une deuxième résine échangeuse d'ions qui transforme les ions de l'éluant en une espèce moléculaire peu dissociée , sans toutefois modifier la conductivité due aux ions d'analyte, Si par exemple , on choisit l'acide chlorhydrique comme éluant pour séparer et doser des cations , la colonne de neutralisation sera une résine échangeuse d'anions mise sous forme hydroxyde . Le produit de la réaction entre l'éluant et la colonne de neutralisation est de l'eau :



Les cations d'analyse ne sont évidemment pas retenus par les groupements cationiques de cette deuxième colonne.

Pour la séparation des anions, la colonne de neutralisation est une résine échangeuse de cations mise sous forme acide et l'éluant sera du carbonate ou de l'hydrogénocarbonates. La réaction dans la colonne de neutralisation s'écrit alors



L'acide carbonique, très peu dissocié, ne contribue pratiquement pas à la conductivité.

Un inconvénient des anciennes colonnes de neutralisation résultait de la nécessité de les régénérer périodiquement (en général, toutes les 8 à 10 heures) afin d'en rétablir le support sous sa forme acide ou basique initiale. On dispose maintenant depuis peu de systèmes à micro membranes qui opèrent en continu. (**Franklin et Amer, 1985**). S'il faut extraire du carbonate ou de l'hydrogénocarbonate de sodium, on fait passer l'éluant sur une série de membranes échangeuses de cations ultraminces qui le séparent d'une solution acide de régénération qui s'écoule à contre-courant. Les ions Na^+ de l'éluant s'échangent avec les ions H^+ à la surface interne de la membrane et diffusent ensuite vers l'autre surface où ils s'échangent avec les ions H^+ de la solution acide de régénération. Les ions H^+ de cette solution migrent dans le sens opposé afin de maintenir l'électro neutralité.

Les figures 1.14 et 1.15 montrent des applications de la chromatographie ionique utilisant une colonne de neutralisation et un détecteur conductométriques.

Dans les deux cas, la concentration des ions est de l'ordre de la ppm ; le volume d'échantillon est de 50 μl dans l'autre. Cette méthode est particulièrement importante pour l'analyse des anions, car il n'en existe aucune autre assez rapide et commode qui puisse traiter ce type de mélange.

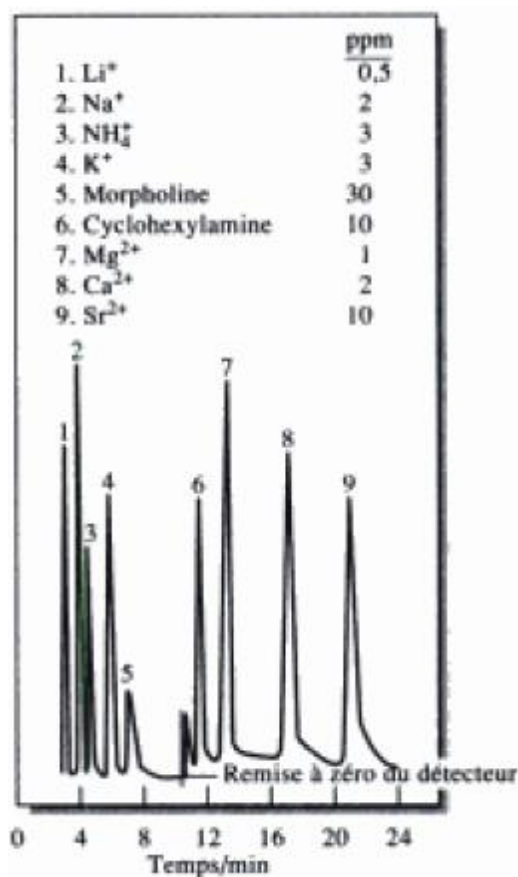


Figure 1.14 : chromatographie ionique d'un mélange de cations (Document de Dionex, Sunnyvale, CA)

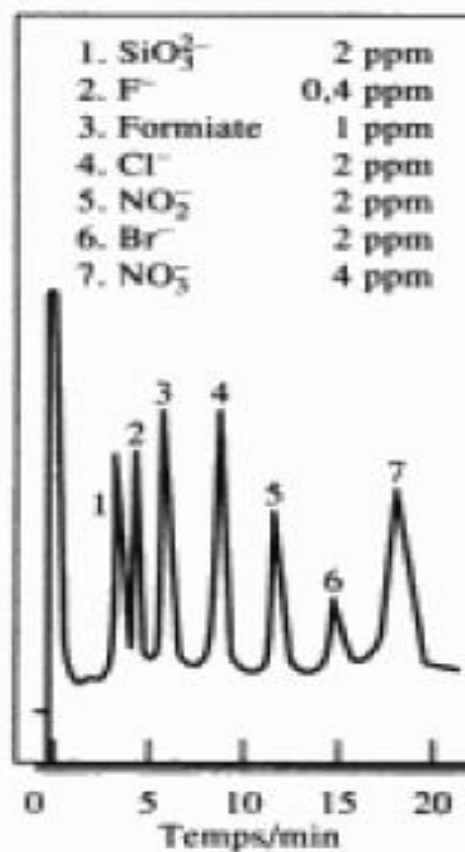


Figure 1.15 : chromatographie ionique d'anion (Document de Dionex, Sunnyvale, CA)

3.6.4. La chromatographie ionique à colonne :

On a mis récemment sur le marché des appareils de chromatographie ionique dans lesquels on n'utilise pas de colonne de neutralisation. Leur fonctionnement est basé sur la mesure des petites différences de conductivité qui existent entre les ions élués et les ions prépondérants de l'éluant. Pour amplifier ces différences, on utilise des échangeurs à faible capacité, ce qui permet d'opérer avec des solutions dilués d'éluant. De plus, on choisit des éluants qui ont une faible conductivité équivalente (Becker et Chem, 1980 ; Benson, Amer, 1985 et Jupille, 1986).

La Chromatographie ionique à colonne unique offre l'avantage de ne pas nécessiter d'équipement spécial d'est neutralisation. Toutefois, dans le cas du dosage des anions, **cette** méthode est moins sensible que celle utilisant une colonne neutralisation. **(Skoog et al, 2006)**

Le détecteur idéal doit présenter les caractéristique suivants sensibilité appropriée (en général, les sensibilités des détecteurs actuels sont comprises entre 10^{-8} et 10^{-15} g/s); bonne stabilité et bonne reproductibilité ; réponse linéaire qui s'étende sur plusieurs puissances de dix ; domaine de température de fonctionnement compris entre la température ambiante et au moins 400°C : temps de réponse rapide qui soit indépendant de la vitesse d'écoulement ; grande fiabilité et facilité d'emploi (dans la mesure du possible, le détecteur doit être à l'épreuve des maladresses d'opérateurs inexpérimentés) ; réponse uniforme à tous les solutés ou, au contraire, réponse sélective limitée à une ou plusieurs classes de solutés et préservation de l'intégrité de l'échantillon Il est inutile de dire qu'aucun détecteur ne remplit à la fois toutes ces conditions, et qui' il est peu probable qu' on puisse jamais en concevoir un.

3.7. La Chromatographie d'exclusion :

La Chromatographie d'exclusion, ou la Chromatographie sur gel, est la plus récente des méthodes de chromatographie liquide. C'est une technique puissante qui est surtant utilisée pour les espèces de masse molaire élevée. **(Kirkland et Bly ,1979)**

Selon **Vanthuyne ,2010** Les molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0) .Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car induites dans le gel, leur migration est freinée Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse de leurs masses moléculaires comme l'illustre la figure suivante.

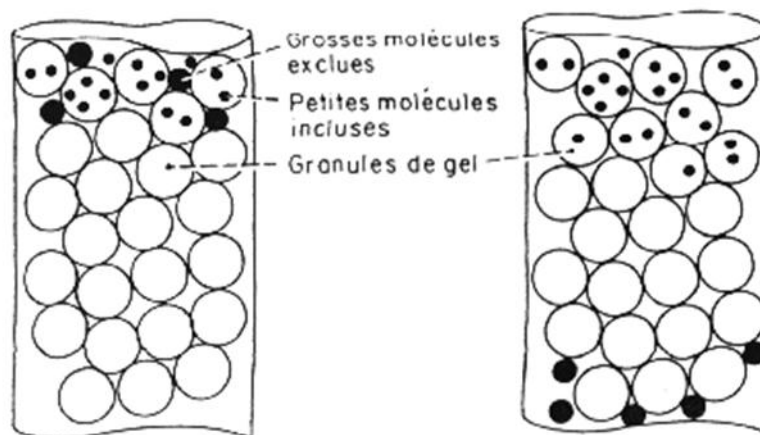


Schéma du tamisage moléculaire.

Figure 3.16: la chromatographie d'exclusion

3.7.1. Les Supports :

Les Supports pour la chromatographie d'exclusion sont constitués de petites (10 μ m) Particules de silice ou de polymère contenant un réseau de chenaux de pores uniformes dans lesquels les molécules de soluté et de solvant peuvent diffuser. Lorsqu'elles s'aventurent dans les pores, les molécules sont littéralement piégées et extraites de la phase mobile. Le temps moyen de séjour des molécules d'analyte dans la colonne dépend de leur taille relative. Les molécules qui sont nettement plus grandes que la taille moyenne des pores du support en sont exclues et ne sont donc pas retenues ; elles progressent dans la colonne pratiquement à la vitesse de la phase mobile. Les molécules qui sont nettement plus petites que les pores peuvent pénétrer dans leur labyrinthe et y rester piégées très longtemps, elles seront les dernières à être éluées. Entre ces deux extrêmes, se situent les molécules de taille intermédiaire dont le taux de pénétration dans les pores de la support dépend de leur diamètre. Le fractionnement de ce groupe dépend directement de la diversité des tailles et, dans une certaine mesure, de la forme. Notez que les séparations par exclusion diffèrent considérablement des autres méthodes chromatographiques, car elles ne font intervenir aucune interaction physique ou chimique entre l'analyse et la phase stationnaire. En fait, on essaie d'éviter ces interactions parce qu'elles réduiraient l'efficacité de la colonne.

Il existe de nombreux matériaux utilisables dans les colonnes d'exclusion. Les matériaux hydrophiles sont utilisés si la phase mobile est aqueuse, tandis que les hydrophobes s'emploient avec des solvants organiques non polaires. La chromatographie basée sur les supports hydrophiles est parfois appelée filtration de gel alors que pour techniques basée sur des supports hydrophobes, on parle de perméation de gel. Dans les deux cas, on dispose d'une large gamme de diamètres de pores. Un support donné permet habituellement de couvrir un domaine de masses molaires qui s'étend sur 2 à 2.5 puissances de dix. Les masses molaires moyennes pour un support donné peuvent aller de quelques centaines à plusieurs millions (Skoog *et al*, 2006).

3.7.2. Applications :

Les figures suivantes (3.14 et 3.15) illustrent quelques applications de la chromatographie d'exclusion.

Dans le premier cas, on a utilisé un support hydrophile qui exclut les masses molaires supérieures à 1000. Le deuxième chromatogramme a été obtenu sur un support hydrophobe, avec le tétrahydrofurane comme éluant. L'échantillon est une résine époxy commerciale dont le monomère a une masse molaire de 280 (n étant le nombre d'unités de monomère).

Une autre application importante de la chromatographie d'exclusion est la détermination rapide des masses molaires, ou la distribution de masse molaire de hauts polymères ou de produits naturels. Dans ce cas, on compare les volumes d'élution de l'échantillon avec les volumes d'élution d'une série de composés étalons qui ont des propriétés chimiques similaires.

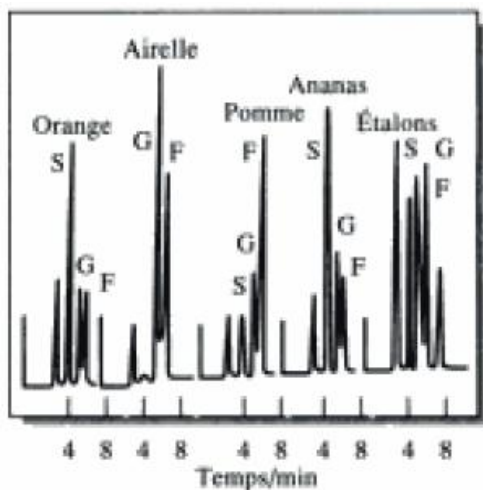


Figure 3.17 : chromatogramme par filtration gel du glucose(G), du fructose(F)

Et de sucrose (S) présents dans des jus en boîte

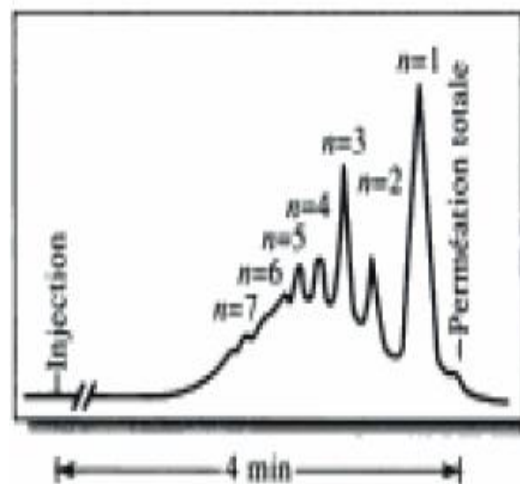


Figure 3.18 : Séparation par perméation de gel de constituants d'une résine époxy.

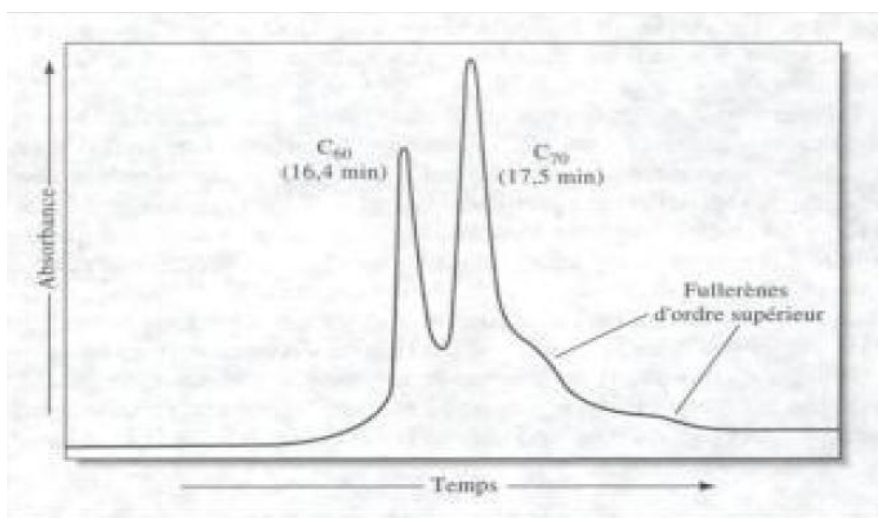


Figure 3.19: séparation de fullerènes.

Plutôt que dans ses pores, puisque C_{70} et les fullerènes d'ordre supérieur ont de plus grandes tailles que C_{60} , ces molécules sont mieux retenues à la surface du gel et s'éluent donc après C_{60} . Le recours à l'automatisation a permis de préparer en 24 h plusieurs grammes de C_{60} pur à 99,8% à partir de 5 à 10 g d'un mélange de C_{60} et C_{70} . De telles quantités de C_{60} facilitent l'étude de la chimie et de la physique de dérivés de cette forme exceptionnelle du carbone.

À titre d'exemple, C_{60} forme avec les métaux alcalins des composés stœchiométrique qui ont la formule globale M_3C_{60} , où M est le potassium le rubidium ou le césium. Des chercheurs ont trouvé que ces composés sont supraconducteurs à des températures inférieures à 30 K. Dans le futur, de mettre au point des supraconducteurs à haute température, ce qui pourrait révolutionner les industries électrique, électronique et des télécommunications et préserver les grandes quantités d'énergie actuellement dissipées par effets Joule.

3.7.3. Comparaison entre la chromatographie liquide À haute performance et la chromatographie gaz –liquide :

Le tableau 3.3 compare la chromatographie liquide performance et la chromatographie gaz –liquide. Lorsque les méthodes sont toutes deux applicables, chromatographie gaz –liquide offre l'avantage de la rapidité et de la simplicité d'appareillage. Par contre, le CLHP s'applique aux substances non volatiles (y compris les ions inorganiques) et aux thermiquement instables, à l'inverse de la CGL. Les deux méthodes sont souvent complémentaires.

Comparaison de la chromatographie liquide À haute performance et la chromatographie gaz –liquide:

Caractéristiques des deux méthodes:

- Efficaces, très sélectives et d'application étendue.
- Ne nécessitent que de petits échantillons.
- Peuvent ne pas détruire l'échantillon.
- Facilement adaptable à l'analyse quantitative.

Avantage de la CLGH :

- Peut traiter des échantillons non volatils et thermiquement instables.
- Applicable en général.

Avantages de CGL :

- Equipment simple et peu coûteux.
- Rapide.
- Résolution incomparable (avec les colonnes capillaires).
- Couplage facile avec la spectroscopie de masse. (Skoog et al ,2006)

3.8. La chromatographie en phase supercritiques (SFC) :

La chromatographie en fluide supercritique (CFS) est un hybride des chromatographies gazeuse et liquide qui combine quelques-unes de leurs caractéristiques les plus intéressantes .pour certaines applications, elle est nettement supérieure à la fois CGL et à la CLHP. **(Palmieri, Chem, 1988 ; Griffiths .Chem, 1985 et Smith et al, 1988).**

Selon **Andrews, 1869** La découverte du CO₂ en phase supercritique date de l'année 1822 par le Baron Charles Cagniard de la Tour (1777-1859), qui présente ses travaux à l'Académie de Sciences en 1823 [Ampère, 1823]. Andrews qualifia le premier cet état de « critique » en 1869 lors de sa détermination de la pression et température critique du CO₂.

Pour originalité d'utiliser comme phase mobile un fluide à l'état supercritique, ce qui améliore la séparation de composés thermolabiles ou de masse 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 cout plus élevé, on conçoit que peut de constructeurs d'instruments d'analyse s'y soient intéressés et que ce type de chromatographie soit resté peu développé. **(Rouessac et al, 2004).**

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 proche de celui d'un liquide et une viscosité et une diffusivité proche de celle d'un gaz.

C'est 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.

En effet, la technique de chromatographie couramment utilisée pour l'analyse de molécules non volatiles polaires et apolaires et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

Cette technique est très consommatrice de solvants organiques qui peuvent se révéler néfastes pour l'environnement. En effet, la chromatographie en phase normale nécessite l'emploi de solvants organiques comme l'acétone, le Dichlorométhane ou encore l'hexane alors que la chromatographie en phase inverse nécessite des solvants plus polaires comme l'acétonitrile, tout aussi toxique.

Contrairement à l'HPLC de phase normale ou inverse, la chromatographie en phase supercritique est une technique « verte » prometteuse.

Cette technique chromatographique a été tout d'abord couplée à des détecteurs FID de par l'utilisation de colonnes capillaires, car cette technique fut dans un premier temps décrite comme très proche de la chromatographie en phase gazeuse.

Puis le développement de systèmes SFC plus robustes supportant de hautes pressions a permis l'utilisation de colonnes de type UPLC, de faible diamètre de particules, permettant une augmentation de la sensibilité. La SFC a été Préambule ensuite comparée à des systèmes de chromatographie en phase liquide pourvus d'une détection UV ou encore ELSD.

Cependant, ces types de détecteurs présentent une faible sensibilité et ne détectent pas tous les composés analysés. C'est pour cela que le couplage de la SFC avec la spectrométrie de masse peut se révéler très intéressant. (Méjan, 2014).

3.8.1. Appareillage et paramètres opérations :

Les appareils de chromatographie en fluide supercritique ressemblent à ceux de la CLHP, mais ils sont en plus équipés de dispositifs de contrôle et de mesure de la pression de la colonne. Les premiers appareils de chromatographie en fluide supercritique sont apparus sur le marché au milieu des années 1980. (Wach et Chem ,1994)

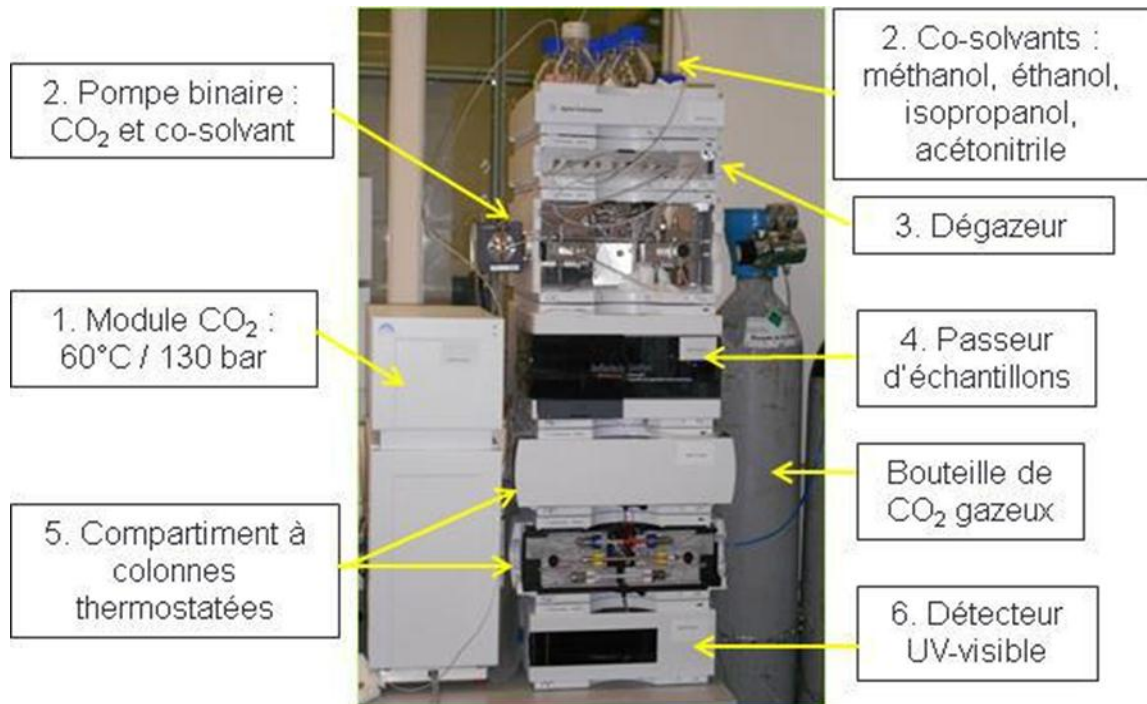


Figure 3.20 : Photo du système de chromatographie en phase supercritique Agilent Technologies

-Comparaison des propriétés des fluides supercritiques, des liquides et gaz

Tableau 3.5 : Principales caractéristiques des liquides, des gaz et des fluides supercritiques
[Inspiré du Dr John Langley's Group, University of Southampton]

Propriétés	Viscosité η (g cm ⁻¹ s ⁻¹)	Masse volumique ρ [g cm ⁻³]	Coefficient de diffusion D_m [cm ² s ⁻¹]
Liquides (1,013 bar, 15-30°C)	10 ⁻²	1	<10 ⁻⁵
Fluides supercritiques (T _c , P _c)	10 ⁻⁴ -10 ⁻³	10 ⁻¹ -1	10 ⁻⁴ -10 ⁻³
Gaz (1,013 bar 15-30°C)	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻¹

-Effet de la pression :

Dans la zone critique, une augmentation de pression induit une augmentation de la masse volumique donc du pouvoir solvant : on diminue ainsi la rétention par augmentation de la pression. L'élution par gradient de pression de CO₂ est comparable à celle observée par gradient de température en chromatographie en phase gaz (CPG) (la volatilité des solutés croit). (Christelle ,2010)

-Colonnes :

On utilise des colonnes remplies ou des colonnes capillaires. Les avantages des colonnes remplies sont une plus grande efficacité par unité de temps et la possibilité de manipuler de plus grands volumes d'échantillon. Les colonnes remplies utilisées en CFS peuvent être beaucoup plus longues que celles employées en CLHP, et fournir plus de 100 000 plateaux. Les colonnes capillaires ressemblent aux colonnes en silice fondue (FSOT) décrites dans le tableau raison 1. En raison de la faible viscosité de milieu supercritique, les colonnes peuvent être beaucoup plus longues : des colonnes de 10 à 20 m de long et de 50 ou 100µm de diamètre intérieur sont courantes. Pour des séparations difficiles, on a utilisé des colonnes de plus de 60 m de long.

De nombreuses phases stationnaires déjà utilisées en chromatographie liquide ont été également employées en chromatographie en fluide supercritique. En général, ce sont des polysiloxanes liés chimiquement à la surface de particules de silice ou à la paroi interne de silice du capillaire. Les épaisseurs de film vont de 0.05 à 0.4 µm.

-Phases mobiles :

La phase mobile la plus utilisée en chromatographie en fluide supercritique est le dioxyde de carbone .C'est un excellent solvant pour de nombreuses molécules organiques non polaires. De plus, il est transparent dans l'ultraviolet, inodore, non toxique, facilement utilisable et remarquablement peu coûteux par rapport à d'autres solvants chromatographiques. Sa température critique est de 31°C et sa pression de 73 atm à la température critique, ce qui permet de travailler dans un vaste domaine de température et de pressions sans dépasser les conditions opérationnelles des appareils modernes de CLHP. Dans certaines applications, on ajoute de faibles concentrations (≈ 1%) d'un composé organiques polaires, comme le méthanol, afin de modifier les valeurs de α des analytes.

Diverses autres substances ont servi de phase mobile en chromatographie en fluide supercritique, notamment l'éthane, le pentane, le dichlorodifluorométhane, l'éther diéthylique et le tétrahydrofurane.

Détecteurs

Détecteurs En CPS la détection peut être effectuée de deux manières différentes : directement dans le fluide à l'état supercritique (ou subcritique) ou après décompression du fluide c'est –à-dire à l'état gazeux. La CPS utilise donc à la fois les détecteurs de la CPL et ceux de la CPG mettant ainsi à profit les progrès technologiques effectués dans ces deux techniques. Ces deux méthodes ont des avantages et des inconvénients.

La détection spectrophotométrique à l'état subcritique permet, simultanément, d'obtenir une meilleure focalisation de lumière (augmentation de l'indice de réfraction du milieu) et un accroissement de la concentration du soluté dans la bande (100). Ces deux effets sont dus à l'augmentation du fluide). Par ailleurs, la thermorégulation de la cellule n'est plus obligatoire .En revanche, les cuves des détecteurs doivent être capables de résister à des pressions pouvant atteindre 300 à 400 bars.

La détection à l'état gazeux exige peu ou pas de modifications des détecteurs mais, comme nous l'avons vu, elle nécessite la mise au point d'une interface afin d'éviter toute précipitation du soluté. (Rosset *et al*, 1991)

3.8.2. Comparaison entre la chromatographie par fluide supercritique et d'autres méthodes sur colonne :

Les informations fournies et les donnée similaires, moment que plusieurs propriétés physique des fluides supercritiques sont intermédiaires entre celles des gaz et des liquides .Dans la zone critique, une augmentation de pression induit une augmentation de la masse volumique donc du pouvoir solvant : on diminue ainsi la rétention par augmentation de la pression. L'élution par gradient de pression de CO₂ est comparable à celle observée par gradient CPS la détection peut être effectuée de deux manières différentes : directement dans le fluide à l'état supercritique (ou subcritique) ou après décompression du fluide c'est –à-dire à l'état gazeux. La CPS utilise donc à la fois les détecteurs de la CPL et ceux de la CPG mettant ainsi à profit les progrès technologiques effectués dans ces deux techniques. Ces deux méthodes ont des avantages et des inconvénients.

La détection spectrophotométrique à l'état subcritique permet, simultanément, d'obtenir une meilleure focalisation de lumière (augmentation de l'indice de réfraction du milieu) et un accroissement de la concentration du soluté dans la bande (100). Ces deux effets sont dues à l'augmentation de la densité du fluide). Par ailleurs, la thermorégulation de la cellule n'est plus obligatoire. En revanche, les cuves des détecteurs doivent être capables de résister à des pressions pouvant atteindre 300 à 400 bars.

La détection à l'état gazeux exige peu ou pas de modifications des détecteurs mais, comme nous l'avons vu, elle nécessite la mise au point d'une interface afin d'éviter toute précipitation du soluté. (Rosset et al, 1991) et de température en chromatographie en phase gaz (CPG) (la volatilité des solutés croît). (Christelle, 2010)

Par conséquent, ce nouveau type de chromatographie combine certaines caractéristiques des chromatographies gazeuses et liquides. Ainsi, tout comme la CG, la chromatographie en fluide supercritique est intrinsèquement plus rapide que la CLHP en raison d'une viscosité plus faible et de vitesses de diffusion plus élevées dans la phase mobile. Toutefois, une vitesse de diffusion élevée entraîne un étalement longitudinal du pic. Cet étalement est important en chromatographie gazeuse, mais ne l'est pas en chromatographie liquide. Les vitesses de diffusion et les viscosités intermédiaires que présentent les fluides supercritiques conduisent ainsi à des séparations plus rapides qu'en chromatographie liquide et l'élargissement de pics moins importants qu'en chromatographie gazeuse.

La figure 3.21 montre des graphiques des hauteurs équivalentes à un plateau théorique (H) en fonction du débit (u) pour la CLHP et le CFS. Dans les deux cas, le soluté est du pyrène et la phase stationnaire un silane octyldécyle à phase inversée maintenu à 40°C. On emploie une solution acétonitrile-eau comme phase mobile en CLHP, et du dioxyde de carbone en CFS. Ces conditions donnent environ le même facteur de capacité (K') pour les deux phases mobiles. Notez correspond à un débit de 0.13cm/s pour la CLHP contre 0.40cm/s pour la CFS. La conséquence de cette différence est montrée sur la figure 3.21 lorsqu'on maintient les mêmes conditions pour la séparation du pyrène et du biphenyle. On remarque que la séparation par CLHP a pris plus du double du temps requis pour la séparation.

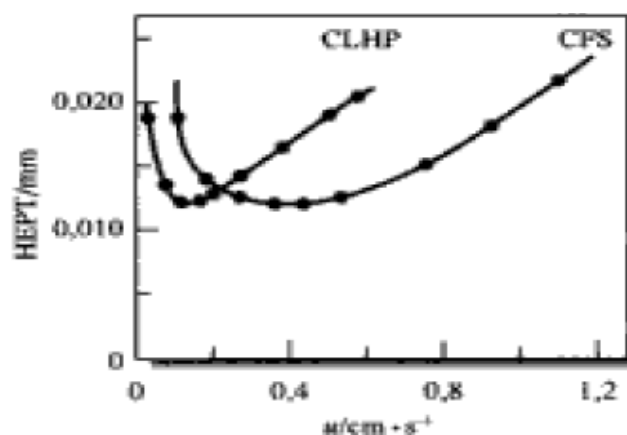


Figure 3.21 : comparaison entre l'efficacité d'une colonne de CLHP et celle d'une colonne de CFS. (D'après, D.R.Gere, science, 1983, 222,254. Avec autorisation.)

3.8.3. Applications :

Selon **Skoog et al,2006** La chromatographie en fluide supercritique , surtout surcapillaire, semble avoir trouvé sa niche écologique dans la multitude des méthodes chromatographiques sur colonne ,car elle s'applique à une classe de composés que l'on ne peut guère étudier par chromatographie gaz – liquide , ni par chromatographie liquide . Ces composés comprennent des espèces non volatiles ou thermiquement instables et qui, en outre, ne contiennent pas de groupement chromophore qui puisse être utilisé pour une éventuelle détection photométrique. Ces composés peuvent être séparés par chromatographie en fluide supercritique à des températures inférieures à 100°C ; de plus, leur détection peut s'effectuer facilement à l'aide du très sensible détecteur à ionisation de flamme.

Il faut également souligner le fait que les colonnes supercritiques présentent l'avantage supplémentaire d'être beaucoup plus faciles à coupler spectromètres de masse que les colonnes de chromatographie liquide.

3.9. La chromatographie planaire :

Les méthodes de chromatographie planaire comprennent la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur papier (CP) et l'électro chromatographie. Chacune de ces méthodes utilise couche mince, relativement mince, d'un matériau rigide ou déposé sur surface de verre, de plastique ou de métal. La phase mobile se déplace à travers la phase stationnaire par capillarité, parfois aussi par gravité ou encore sous l'action d'une tension

électrique. La de chromatographie planaire est parfois appelée chromatographie bidimensionnelle, bien que cette description ne soit pas tout à fait correcte, puisque la phase stationnaire a une épaisseur finie.

Actuellement, la plupart des chromatographies planaires utilisent la technique des couches minces qui rapide, qui a une résolution et qui est plus sensible que son équivalent sur papier

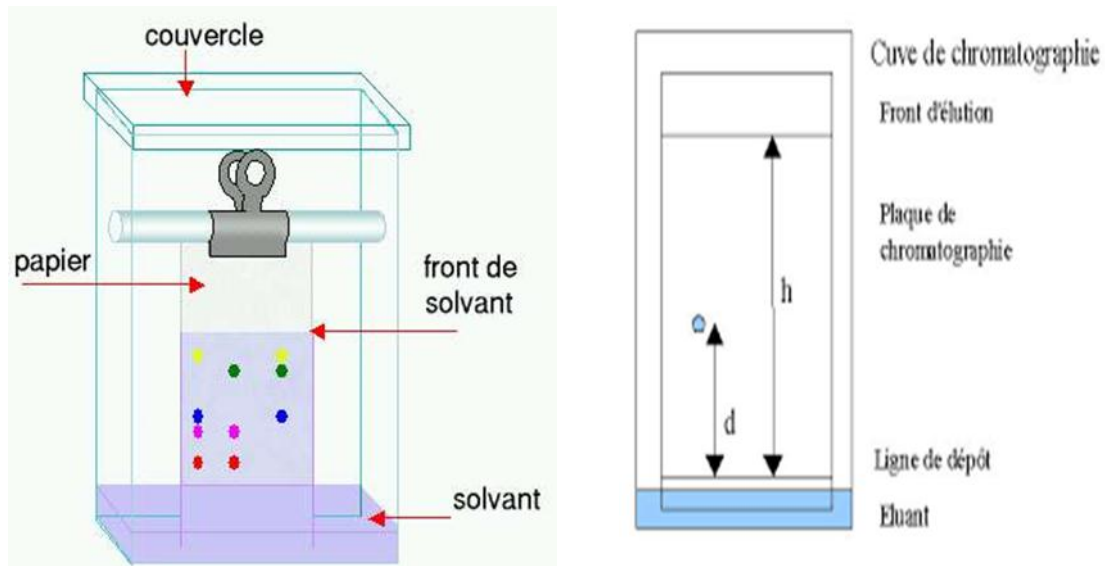


Figure 3.22 : Schéma de la chromatographie sur couche mince

3.9.1. Le champ d'application de la chromatographie sur couche mince :

Que ce soit au point de vue de la théorie, de la nature des phases mobiles et stationnaires, ou des applications, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie liquide sont absolument semblables, au point que la chromatographie sur couche mince peut être utilisée pour déterminer les conditions optimales de séparation la chromatographie en phase liquide sur colonne. Les avantages de cette procédure sont faibles la rapidité et le faibles cout des expériences exploratoires pour certains expérimentateurs, tout expérience sur colonne est précédée d'essais sur couche mince est devenue le cheval de bataille de l'industrie pharmaceutique pour la détermination combien importante de la pureté de ses produits. Elle est également très utilisée dans les laboratoires d'analyse médicale et constitue le fer de lance de nombreux biochimique et biologiques, Enfin, elle est très utilisée dans les laboratoires industriels (**Touchstone ,1987 ; Fenimore et al, 1981 ; Poole et al ,1989**)

Le nombre de ses domaines d'application est tel que l'on estime qu'il s'effectue au moins autant d'analyses par la chromatographie sur couche mince que par la chromatographie liquide à haute performance .(**Mauch , 1982**).

3.9.2. Les principes de la chromatographie sur couche mince :

Selon (**Rouessac et Rouessac, 2011**) La chromatographie sur couche mince (CCM), est une technique complémentaire de la CLHP. La colonne est ici remplacée par un support plan sur lequel est déposée une fine couche (100-200 μm) de phase stationnaire, de même type qu'en CLHP. La phase mobile se déplace uniquement par l'effet des forces de capillarité. Parmi ses principaux atouts:

- Elle est plus rapide et meilleur marché que la CLHP.
- Elle s'accommode de matrices complexes.
- Elle permet des analyses bidimensionnelles (rotation de la plaque et autre P_M).
- Elle rend possible le lancement de plusieurs analyses simultanément.

La chromatographie planaire, également connue sous le nom de chromatographie sur couche mince (CCM), est une technique complémentaire de la CLHP, ayant sa

Propre spécificité. Bien que la mise en œuvre de ces deux techniques soit différente, le principe de la séparation et la nature des phases restent les mêmes. Méthodes sensibles, de faible cout, pouvant être automatisée, elle est devenue désormais indispensable sachant aussi qu'il est possible de mener plusieurs séparations en parallèle. L'appareillage actuel permet de

maitriser les trois étapes essentielles : le dépôt de l'échantillon, la migration sur la plaque et la mesure de concentration. Application et densitomètres automatiques ont ainsi conduit à la nano-CCM, une technique très sensible qui peut être couplée à la spectrométrie de masse.

(Rouessac et al, 2004)

-Préparation des plaques de couche mince :

La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Le temps de migration (plusieurs minutes) dépend de divers paramètres. Quand le front de solvant a parcouru une distance considérée comme suffisante (quelques centimètres), on retire la plaque de la cuve, on repère la position limite atteinte par la phase mobile et on évapore cette dernière.

Lorsqu'on utilise une plaque à polarité de phase inversée, l'éluant comporte de l'eau. Il est alors utile d'ajouter un sel, tel du chlorure de lithium, pour limiter les phénomènes de diffusion et augmenter ainsi la résolution. **(Rouessac et al, 2004).**

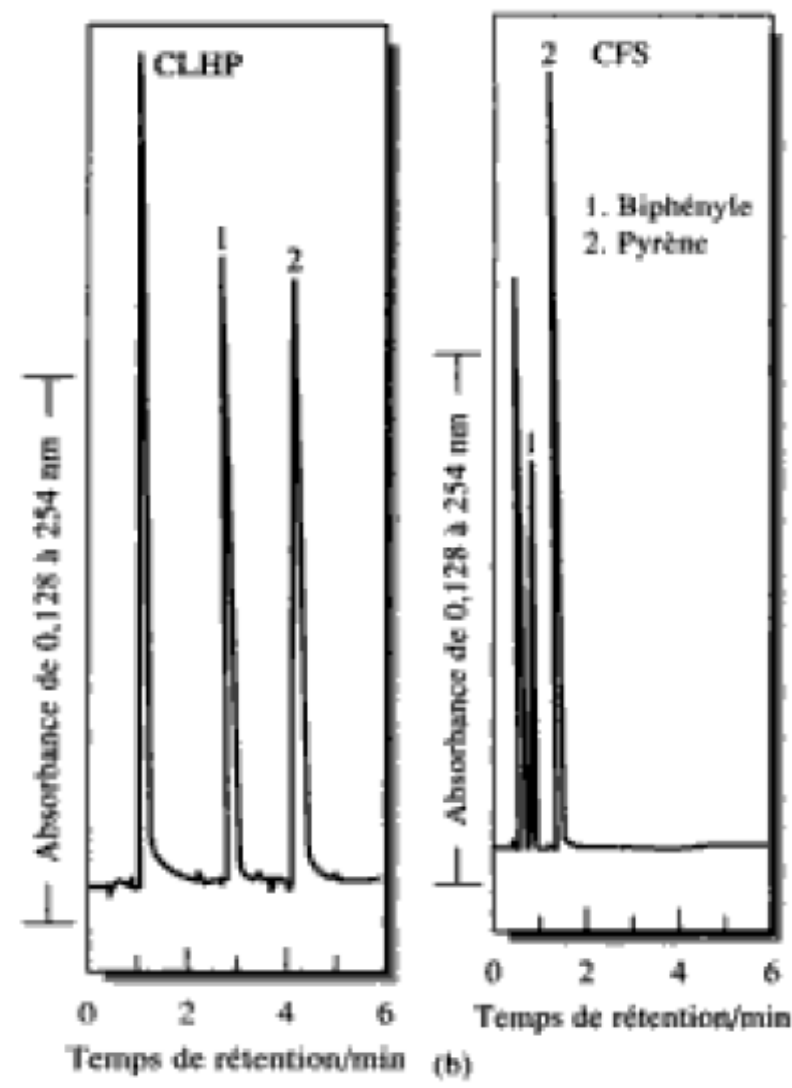


Figure 3.23 : séparation du pyrène et du biphenyle le par (a) CLHP et (b) CFS

(D'après D.R.Gere, science, 1983, 222,255.Avec autorisation

-Développement des plaques :

Selon **Skoog et al 2006**, Le Développement des plaques est un processus au cours duquel l'échantillon est entraîné par un la phase mobile à travers la phase stationnaire ; il est analogue à l'élution en chromatographie liquide.

La manière la plus courante de développer une plaque consiste à placer une goutte de l'échantillon près de son bord (la plupart des plaques ont des dimensions de 5X20 ou 20X20cm) et d'en marquer la position avec un crayon .Après évaporation du solvant de l'échantillon , la plaque est placée dans un récipient clos que l'on sature par la vapeur du solvant de développement .Une extrémité de la plaque est immergée dans ce solvant ,en prenant soin d'éviter tout contact direct entre l'échantillon et le solvant.Lorsque le front de

solvant a parcouru la moitié ou les deux tiers de la longueur de la plaque , elle est retirée du récipient et séchée . Les positions des constituants sont finalement repérées et mesurées.

La figure 3.24 illustre la séparation d'acides aminés dans un mélange par un développement qui s'est effectué dans deux directions à angle droit (chromatographie planaire bidimensionnelle). L'échantillon est déposé dans un coin d'une plaque carrée, et la plaque est développée dans le sens ascendant avec le solvant (a) solvant est alors éliminé par évaporation, et la plaque est tournée puis elle est développée dans le nouveau sens ascendant avec le solvant (b).

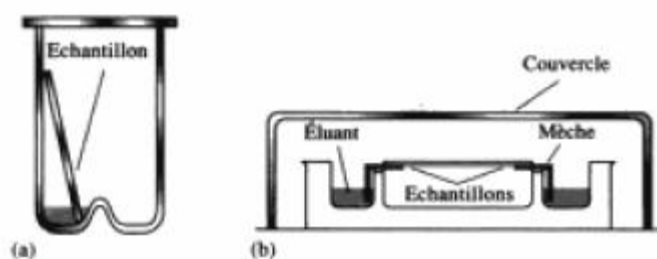


Figure 3.24 : (a) chambre de développement par courant ascendant. (b) chambre de développement par courant horizontale, où deux échantillons distincts sont placés aux deux extrémités d'une plaque et développés vers le milieu, ce qui double le nombre d'analyses qui peuvent être effectuées. (**Skoog et al, 2006**)

Après élimination du solvant, les positions des acides aminés sont révélées en vaporisant la plaque avec de la ninhydrine, un réactif qui forme un complexe rose à pourpre avec les acides aminés. Les taches sont identifiées en comparant à pourpre avec les acides aminés. Les taches sont identifiées en comparant leurs positions à celles d'étalons.

-Localisation des analytes sur plaque :

Plusieurs méthodes sont employées pour localiser les constituants de l'échantillon après la séparation. Deux méthodes courantes, qui s'appliquent à la plupart des mélanges organiques, consistent à vaporiser une solution d'iode ou d'acide sulfurique qui réagit tous deux avec les composés organiques pour donner naissance à des produits sombres. Plusieurs réactifs spécifiques sont également utilisés pour localiser des espèces plus particulières.

Une autre méthode de détection est basée sur l'incorporation d'un matériau fluorescent à la phase stationnaire. Après développement, la plaque est examinée sous un éclairage ultraviolet.

Les constituants de l'échantillon désactivent la fluorescence du matériau, de sorte que la plaque est fluorescente partout, sauf aux endroits où se trouvent les constituants de l'échantillon.

3.10. La chromatographie sur papier :

Les séparations par chromatographie sur papier s'effectuent de la même manière que celles sur couche mince. Les papiers sont fabriqués à partir de cellulose de grande pureté, leur porosité et leur épaisseur étant soigneusement contrôlées. Ces papiers contiennent suffisamment d'eau adsorbée pour constituer la phase stationnaire aqueuse. Toute fois d'autre liquide peuvent remplacer l'eau et constituer autant d'autres phases stationnaires. Par exemple du papier imprégné de silicone ou d'huile de paraffine permet de pratiquer une chromatographie sur papier en phase inversée, avec un solvant polaire comme phase (Skoog *et al*, 2006).

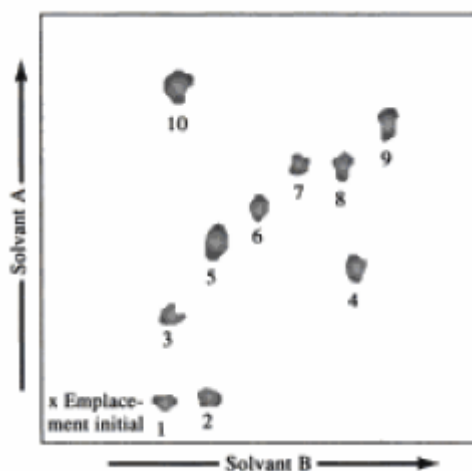


Figure 3.25 : chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (gel de silice) de quelque acide aminé. Solvant A : toluène/chloro-2éthanol/pyridine.

Solvant B : chloroforme / alcool benzylique : acide acétique. Acide aminé : (1) acide aspartique, (2) acide glutamique, (3) sérine, (4) B-alanine, (5) glycine, (6) alanine, (7) méthionine, (8) valine, (9) isoleucine, (10) cystéine

(Skoog *et al*, 2006)

3.11. Les mécanismes de chromatographie :

3.11.1. Chromatographie de partition :

Selon (**Marouf, 2001-2002**), La chromatographie de partition englobe tous les type de chromatographie ou la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide inerte, et la phase mobile un liquide ou un gaz.

Les substances sont séparées en fonction de leurs solubilités relatives différentes dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

Selon la nature chimique de la phase stationnaire, on distingue deux types de chromatographie de partition :

- 1- La chromatographie de partition en phase normale : la phase stationnaire est plus polaire que la phase mobile.
- 2- La chromatographie de partition en phase inverse : la phase mobile est plus polaire que la phase stationnaire.

3.11.2. Chromatographie d'adsorption :

C'est la méthode chromatographique la plus ancienne. Son principe est basé sur l'adsorption sélective plus ou moins forte sur la surface d'une phase stationnaire solide active, de substances dissoutes dans une phase mobile liquide ou gazeuse. Cette fixation est de nature électrostatique de type liaison faible, entre les phases solides et liquides, et les substances dissoutes. Son intensité repose sur les polarités relatives des molécules à séparer, de la phase stationnaire et de la phase mobile.

La chromatographie d'adsorption se pratique soit sur couche mince, soit sur colonne, en phase liquide ou en phase gazeuse. (**Marouf, 2001-2002**).

3.11.3. Chromatographie sur papier :

C'est la plus simple de la moins coûteuse de toutes les techniques chromatographiques. Il s'agit d'une chromatographie de partition liquide-liquide, dans laquelle la phase stationnaire est assimilée à une solution aqueuse imbibant un support solide, un papier (généralement de nature cellulosique, hydrophile) et la phase mobile est un solvant non miscible. (**Marouf, 2001-2002**).

3.11.4. Chromatographie sur couche mince (C.C.M) :

Il s'agit d'une méthode chromatographique qui permet, suivant un procédé simple et rapide, l'identification et la séparation d'un très grand nombre de substance organique et

même minérale. La phase stationnaire peut être un solide ou (chromatographie d'adsorption) ou un liquide imbibant un support solide (chromatographie de partition). Dans le premier cas, les substances à séparer sont adsorbées à la surface du solide étalé en couche mince régulière sur un support. Ce dernier peut être une plaque de verre ou une feuille d'aluminium ou de polyester. La dimension standards sont 20×20 cm et parfois 10×10 cm ou 5×7 cm. (Marouf, 2001-2002).

3.11.5. Chromatographie d'exclusion moléculaire :

Le processus repose sur un tamisage moléculaire. Le paramètre sur la base duquel les molécules sont séparées est leur taille. Toutes les autres interactions fonctionnelles sont réduites au minimum par la phase mobile.

La phase mobile passe à travers des petites billes solides de taille bien calibrée, percées d'un grand nombre de trous eux-mêmes bien calibrée. (Marouf, 2001-2002)

3.11.6. Chromatographie d'échange d'ions :

La chromatographie d'échange d'ions est fondée sur la valeur changeant nombre des groupes acides (charge négative) et celui des groupes basiques (charge positive) à la surface d'une molécule donnée (ex : protéine). La phase stationnaire est composée d'une matrice poly osidique ou synthétique (résine, silice) à la surface de laquelle des groupements fonctionnels négatifs ou positifs sont fixés de façon covalent et répartis selon une densité prédéterminée. La neutralité électrique de l'échangeur est assurée par des ions de charge opposée, appelés contre-ion, qui peuvent être réversiblement échangés avec d'autres ions de même signe apportés par la phase mobile. (Marouf, 2001-2002).

3.11.7. Chromatographie en phase gazeuse (C.P.G) :

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une variante de la chromatographie de partition et/ou d'adsorption entre une phase mobile gazeuse, vecteur du mélange à analyser et une phase stationnaire constituée par un support imprégné ou non d'un liquide fixe.

On distingue entre la chromatographie gazeuse-liquide utilisant un gaz inerte comme phase mobile et un liquide visqueux comme phase stationnaire et la chromatographie gaz-solide utilisant une matière solide comme phase stationnaire.

Si la phase stationnaire est un solide, la séparation obéit alors aux lois de l'adsorption. Si la phase stationnaire est un liquide, la séparation obéit aux lois de partage entre le gaz vecteur et le liquide de la colonne.

Dans tous les cas, la séparation et la définition des migrations reposent sur la notion de temps de rétention au sein de la colonne. (Marouf, 2001-2002).

3.11.8. Chromatographie d'affinité :

Ce procédé n'utilise aucune de propriétés physiques ou chimiques des biomolécules précédemment décrites pour les autres techniques chromatographiques.

Le principe de la séparation repose sur les propriétés biologiques fonctionnelles de la molécule, c'est-à-dire sa capacité à former un complexe réversible très spécifique avec une autre molécule appelée ligand. Ce dernier généralement de faible poids moléculaire, est lui-même greffé covalentiellement de manière irréversible sur une phase stationnaire, appelée matrice, inerte et spécifique de la substance que l'on cherche à isoler. (Marouf, 2001-2002).

3.11.9. Chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P) :

Il s'agit d'une chromatographie sur colonne. L'originalité du système, très miniaturisé, est que la phase stationnaire est constituée de particules de granulométrie très fine (de 2 à 10 μm) et d'une extrême homogénéité. A titre de comparaison, la taille des particules, de la CPG est d'environ 100 à 125 μm de diamètre. La surface d'échange est devenue plus importante et le volume vide de la colonne plus petit. La résistance est devenue tellement forte que le solvant, c'est-à-dire la phase mobile, ne peut traverser la phase stationnaire sous l'effet de pression élevée, allant de 25 à 300 bars produits par une pompe. Cela exige des supports mécaniquement très stables et des colonnes, soit en acier spécial, soit en verre spécial résistant (maximum 40 bars). Les systèmes actuels permettent fréquemment d'obtenir des pressions jusqu'à 420 bars. Mais dans de nombreux domaines, surtout celui des molécules d'intérêt biologique et notamment les protéines, on travaille plus souvent à pression basse (1 à 20 bars) ou moyenne qu'à haute pression. (Marouf, 2001-2002)

Conclusion :

Le but de ce travail était de développer diverses techniques de chromatographie utilisées principalement pour séparer les matériaux d'échantillons spéciaux afin d'obtenir des informations et les caractéristiques de ces échantillons. Elle plus important dans la biotechnologie.

Nous avons passé en revue diverses techniques de chromatographie. Ensuite, nous avons clarifié les caractéristiques de chaque technique et sa méthode de travail à l'aide des schémas illustratifs pour faciliter l'enchaînement des idées, et les études obtenues ont été très encourageantes pour faciliter l'exploitation de ces technologies. Le projet a également présenté les applications et les mécanismes de la chromatographie.

Dans chapitre 01 fournit une approche globale permettent de L'étude générale du projet telle qu'elle contient les définitions des concepts et éléments de base les nécessaires pour faciliter et clarifier les idées en donnant des détails généraux et spéciaux sur le sujet de la recherche, et en fournissant des résultats basées sur des tableaux, des plans et des images illustratives en plus d'utiliser certaines équations.

Dans le chapitre 02 Nous avons expliqué le principe de la chromatographie de travail de la phase gazeux, qui dépend d'un phase mobile gazeux, car il travaille au transport gazeux des échantillons , á travers cela, chaque composant de l'échantillon est séparé lors de son mouvement dans le gaz , et nous avons également clarifié la chromatographie en phase gazeuse et donnant des concepts de base sur ce type tout en employant ses éléments constitutifs en plus de la façon dont il est utilisé et ses applications en mentionnant ses différents types.

Dans le chapitre 03 Nous avons expliqué le principe de la chromatographie à haute performance, dont les types se différencient par la diversité de ses phases stationnaires et mobile, car cette technique dépend de la phase stationnaire liquide. Cette technique est utilisée pour identifier les véhicules et les liquides à haut point d'ébullition.

C'est une méthode qui mélange ce qui est physique et ce qui est chimique et dépend principalement de la différence et de la diversité des interactions entre le soluté, la phase mobile et la phase stationnaire, à la suite de ces réactions, la séparation requise se produit. Et après, nous avons mentionné les composants de la chromatographie à haute performance, ses différents types et ses applications dans divers domaines.

Référence

1. Achour S., Djellal N., (2019).séparation des isomères par chromatographie liquide 10 p.
2. Andrews, T. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (1869).159:575.
3. Anonyme (2010). HPLC principe et appareillage. Ressource pédagogiques biochimie et biomoléculaire. le site des enseignants de biochimie et génie biologiques Biotec de Rouen .France .
4. Becker R.M., Anal.Chem., (1980) .pp.52 ,1510 .
5. Benson J.R., Amer. Lab ., (1985) ,(6), p.30.
6. Bidlingmeyer .B.A, 1992” Practical HPLC methodology and applications “, Wiley,p350.livre
7. Bouhajib M,(1992) .analyse des glycosides de PICEA MARIANA (Mill) laires ,B.S.P.Université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la maitrise en ressources renouvelables, p.40-41.
8. Bourguet E.,Christophe A.,(2008).Les techniques de laboratoire Purification et analyse des composés organiques ,Chimie,Ed.Marketing S.A.,Paris,154p.
9. Burgot,G., Burgot,J.,(2011).Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications , Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques , 3^{ème} édition, Lavoisier, Paris,368p.
10. Christelle,D.,(2010).Contribution à l'étude par chromatographie en phase fluide supercritique de phases stationnaires chirales dérivées de trisphénylcarbammates de cellulose immobilisés , école Doctorale de Chimie Physique et de Chimie Analytique de Paris Centre ,thèse.229p.
11. Coutouly ,G.,S.D.,Les biotechnologies : La part industrielle une approche .p.1 1.
12. Deschamps FS, Chaminade P, Ferrier D, Baillet A (2001). Assessment of the retention properties of poly (vinyl alcohol) stationary phase for lipid class profiling in liquid chromatography. Journal of Chromatography A 928 (2):127-137
13. Feinberg M. (1996). L'assurance Qualité dans les Laboratoires Agroalimentaire et Pharmaceutiques. Edition TEC & DOC.
14. Fenimore D.C., Davis, Anal.Chem., (1981).53,253A.
15. Franklin G.O., et Amer (1985).Lab. (3) ,71.
16. Fritz J.S.,Anal,Chem,(1987), la chromatographie ionique ,pp.59,335
17. Griffiths p.R.,Anal.Chem.,(1985),60,593A

-
-
18. Hadjadj A.A., Massaoudi ., M., (2010). Chromatographie en phase gazeuse (CPG) , mémoire, p 42 .
 19. Hawkes S.J., Chem J., (1983) .pp,60,396.
 20. Hmaida, D., (2016). Recherche de conditions alternatives à l'utilisation de solvants chlorés en Chromatographie Liquide Non-Aqueuse à Polarité Inversée de Phases Applications à l'analyse des lipides présents dans les milieux complexes. L'université Tunis El Manar et de l'université Paris –Saclay préparée l'université Paris – Sud, Spécialité de doctorat : Chimie, Thèse de doctorat, 263p.
 21. Jacob, (2010). Avantages de la chromatographie liquide à haute performance ... ainsi que des composées de masses molaires élevées, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Mémoire
 22. Jones A.J., Martin J.P., (1952). Analyst , pp.77,915.
 23. Jupille , Amer. Lab., (1986). (5), p.114.
 24. Kamboj A., (2012). Analytical évaluation of herbal drugs, In : Vallisuta O, Olimat SM (eds) Drug Discovery Research in pharmacognosy. InTech , Croatia
 25. Kirkland J.J. et Bly, Modern Size Exclusion Liquid Chromatography. New York: Wiley, 1979.
 26. Krstulovic M.A., Brown P.R., Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography, New York: Wiley, 1982
 27. Liang X-m, Jin Y, Wang Y-p, Jin G-w, Fu Q, Xiao Y-s (2009) . Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. Journal of Chromatography A 1216(11):2033-2044.
 28. Makambila-Koubemba M-C, Mbatchi B, Ardid D, Gelot A, Henrion C, Janisson R, Abena AA, Banzouzi J-T (2011). Pharmacological studies of ten medicinal plants used for analgesic purposes in Congo Brazzaville. International Journal of Pharmacology 7:608-615.
 29. Marouf A. (2001-2002). Analyse instrumentale à l'usage des biologistes, 2ème édition. DAR ELGHARB, pp 2-11
 30. Mauch T.H. (1982) .II, Science , pp.216,161. 5.
 31. Méjan M., (2014). Développement d'un couplage de chromatographie en phase supercritique substance naturelles. thèse doc. univ. paris -sud , 439p .
 32. Nicaise F, B ., (2013). stratégie analytique des tradimédicaments : établissement de profil chromatographiques des métabolites photochimiques apolaires , 175p.
 33. Palmieri M.D., Chem J., (1988), Educ, 65, A254; 1989, 66, A141.

-
-
34. Poole C.F., Poole S. K Anal,Chem .,1989,61,1257A.
 35. R. Rosset, M.Caude, A.Jardi, (1991).Chromatographies en phases liquide et supercritique ,3^{ème} édition entièrement refondue du " Manuel pratique de chromatographie en phase liquide " Paris Milan Barcelone Bonn, .919 p. livre
 36. Rouessac,A., Rouessac,R., avec la collaboration de Cruché,D., (2004).Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes, 6^{ème} édition, Dunod, Paris,462p.
 37. Rouessac,A., Rouessac,R.,(2011).Techniques instrumentales d'analyse chimique en 23 fiches,Dunod, Paris, 155p.
 38. Schill R.,Freeman R.R.Freeman ,dans Modern Practice of Gas Chromatography ,2eme Ed.,R.L.Grob,Ed.,NewYork P.294:Wiley,1985.
 39. SKOOG A., WEST F.et HOLLER J.,(2006) .Chimie analytique 7^{ème} ED de Boeck Paris, France,870p.
 40. Skoog D.A., Leary J.J., (1992). Principles of Instrumentales Analysis, 4eme Ed., philadelphia: Saunders College Publishing, pp. 592-593.
 41. SKOOG. WEST. HOLLER, Traduction et révision par BUESS-HERMAN Claude, DAUCHOT-WEYMERRS Josette et DUMONT Freddy, Chimie Analytique (SKOOG. WEST. HOLLER), 1997.
 42. Small H.,(1989).Ion chromatography . New York: Plenum Press.
 43. Small,H.,Stevens T.S.et Bauman W.C,Anal.Chem .,(1975) .pp.47,1801.
 44. Smith R.D.,Wright B.W ,Anal.Chem.,(1988).60,1323A.
 45. Snyder L.R., Kirkland J.J.,(1979) . Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2eme Ed .New York: Wiley p.75.
 46. Tiabi.A et Tires L., (2014).Mise au point et optimisation d'une méthode de dosage d'une forme pharmaceutique suppositoire par l'HPLC. Thèse de doctorat en pharmacie, département de pharmacie, faculté de médecine, U.M.M.T.O.Algérie.57p
 47. Touchstone J.C.,Practice of Thin- Layer Chromatography .2eme Ed .New York :Wiley ,1983.Poole F.,
 48. Vanthuyne (2010) .La chromatographie sur support chiraux, Montpellier

Résumé

La chromatographie est une technique de séparation mais également d'identification et de quantification des constituants d'un mélange, elle permet une séparation en un temps relativement court. La chromatographie est une méthode physique d'analyse ; les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile ; ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur

Il existe divers types de chromatographie et plusieurs appareils, On peut les classer selon la nature de la phase mobile, stationnaire. Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques dépend de la nature des composés à séparer et en fonction de celle-ci, Il existe un grand nombre de paramètres concernant la chromatographie

Les méthodes chromatographiques sont les méthodes les plus importantes de l'analyse immédiate. Elles permettent, bien sûr, de séparer les constituants d'un mélange plus ou moins complexe mais là ne sont borne pas leur intérêt car elles peuvent également assurer dans certaines conditions l'identification et la détermination quantitative des substances.

Mots clé : Technique de préparation, Biotechnologie végétal, Chromatographie.

المخلص:

كروماتوغرافيا هي تقنية فصل مواد من أجل معرفة نوع وكمية مواد خليط وتسمح هذه التقنية بفصل في وقت قصير وتعتبر فيزيائية في تحليل، وهذه مواد التي يتم فصلها تمر بمرحلتين مرحلة أولى تسمى طور متحرك تكون مائعة سائلة أو غازية أما مرحلة ثانية تسمى بطور ثابت تكون بطيئة تقريبا. كروماتوغرافيا تنقسم الى عدة أنواع ويوجد فيها عدة آلات وتنقسم على حسب طبيعة طور ثابت ومتحرك ويتم اختيار تقنية خاصة بها على حسب هذا أساس، ويتم اختيار التقنية على حسب طبيعة المواد مراد فصلها ووظائفها. وتقريبا كل أنواع كروماتوغرافيا تعتبر تقنيات فعالة وتملك أهمية كبيرة لأنها تسمح بفصل مكونات خليط معقد أو أقل تعقيد.

الكلمات المفتاحية: تقنيات التحضير، بيوتكنولوجيا نبات، الكروماتوغرافيا.

Summary:

Chromatography is a technical separation but also identification and quantification of the constituents of a mixture, it allows separation in a relatively short time. Chromatography is a physical method of analysis; the different constituents of this mixture called solutes are separated and entrained by a fluid (a liquid or gas) which is called the mobile phase; they

interact or on the contrary do not interact with a fixed phase which is called stationary phase which exerts on them a delaying effect.

There are various types of chromatography and several devices. They can be classified according to the nature of the mobile, stationary phase. The choice of one or the other of these techniques depends on the nature of the compounds to be separated and according to this; there are a large number of parameters concerning the chromatography

Chromatographic methods are the most important methods of immediate analysis. They allow, of course, to separate the constituents of a more or less complex mixture but there is not limited their interest because they can also ensure under certain conditions the identification and quantitative determination of substances.

Key Words: preparation technique, Biotechnology Vegetal, chromatography.