

## CHAPITRE III CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE CLASSIQUE

### 1. Chromatographie sur couche mince

#### 1.1. Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est basée essentiellement sur des phénomènes d'adsorption. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve chromatographique, l'éluant monte à travers la phase stationnaire. Mais, en fonction de sa densité, de sa solubilité dans la phase mobile et des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse dans l'absorbant. Le contenant sera une cuve chromatographique, à savoir un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

On va devoir gérer 3 éléments bien définis :

**1. La phase mobile, également appelée éluant :** c'est un solvant (ou un mélange de solvants), qui progresse le long d'une phase dite « stationnaire », fixée sur un support, entraînant les composants de l'échantillon. Selon le type d'analyse à réaliser, le choix de l'éluant sera variable :

- pour les hydrocarbures : hexane, éther de pétrole ou benzène.
- pour des groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole, mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique.
- Pour des composés polaires : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol.

**2. La phase stationnaire :** c'est une couche d'environ  $\frac{1}{4}$  de mm de gel de silice (un adsorbant parmi d'autres) qui est fixée sur une plaque de verre (ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium, voire même sur une feuille de papier), à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre), l'amidon ou un polymère organique. Après le dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose.

**3. L'échantillon :** il est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatile, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : les plus utilisés sont le trichlorométhane

(chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution (1 cm<sup>3</sup> max.) est déposée sur la plaque, à environ 1 cm de la partie inférieure

## 1.2. Mode opératoire

La mise en œuvre de la chromatographie couche mince se fait en trois étapes :

### 1.2.1. Dépôt de l'échantillon

On commence par déposer un petit volume (compris entre quelques nanolitres et plusieurs microlitres) de l'échantillon en solution diluée, à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache de 1 à 3 mm de diamètre. Ce dépôt est réalisé soit manuellement, soit de manière automatique, avec un capillaire à extrémité plane. La tache peut également avoir la forme d'un trait horizontal de 1 mm, obtenu par pulvérisation de l'échantillon au moyen d'un dispositif automatique dont l'intérêt est de pouvoir maîtriser la reproductibilité des quantités déposées, ce qui est indispensable en analyse quantitative.

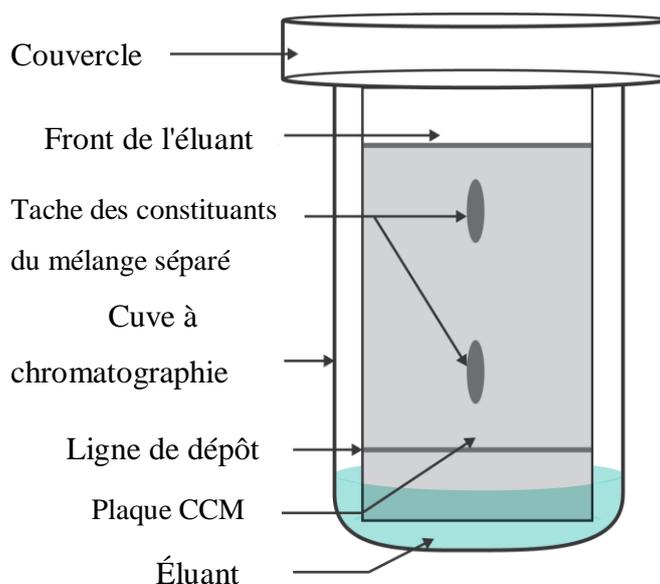
La plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve spéciale munie d'un couvercle, au fond de laquelle se trouve un peu de la phase mobile servant d'éluant (Figure 1).

### 1.2.2 Développement de la plaque

Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque. Dans les analyses usuelles de laboratoire, le principal type de développement est la chromatographie ascendante : la plaque est placée en position verticale dans une cuve et le solvant qui en recouvre le fond monte par capillarité.

Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve puis on introduit la plaque. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée. Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir.

•L'utilisation d'une plaque de forme carrée permet de faire de la chromatographie bidimensionnelle en procédant à deux éluations successives avec deux éluants différents. Une application typique de cette méthode est la séparation des acides aminés. Pour  $n$  spots, la résolution peut atteindre  $(n \times n)$  composés.



**Figure 1.** Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM.

### 1.2.3 Révélation

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes :

- Révélation avec une lampe UV : on rappelle que le sulfure de zinc additionné à la silice rend la plaque fluorescente lorsqu'on la place sous une lampe UV ; les entourer au crayon ; que certaines plaques de CCM contiennent un indicateur fluorescent permettant une résolution dans l'UV, UV proche (366nm) ou lointain (254nm). L'indicateur UV254 est un silicate de zinc activé au manganèse, dont le maximum d'absorption est à 254nm. Il présente une fluorescence verte. L'indicateur UV 366 est également un pigment minéral avec un maximum d'absorption à 366nm. Il présente une fluorescence bleue. Si les taches sont opaques à l'UV, la plaque ne sera pas fluorescente à ces endroits et on verra les taches.
- Révélation chimique : on pulvérise sur la plaque un réactif spécifique qui réagit avec les taches pour donner un produit coloré. Variante : il est aussi fréquent de placer les plaques dans des vapeurs de diiode, ce dernier ayant beaucoup d'affinité pour les cycles aromatiques.
- *Atomisation* : elle consiste à pulvériser un réactif sur la plaque ; ce qui entraîne une destruction ou une altération permanente des composés.

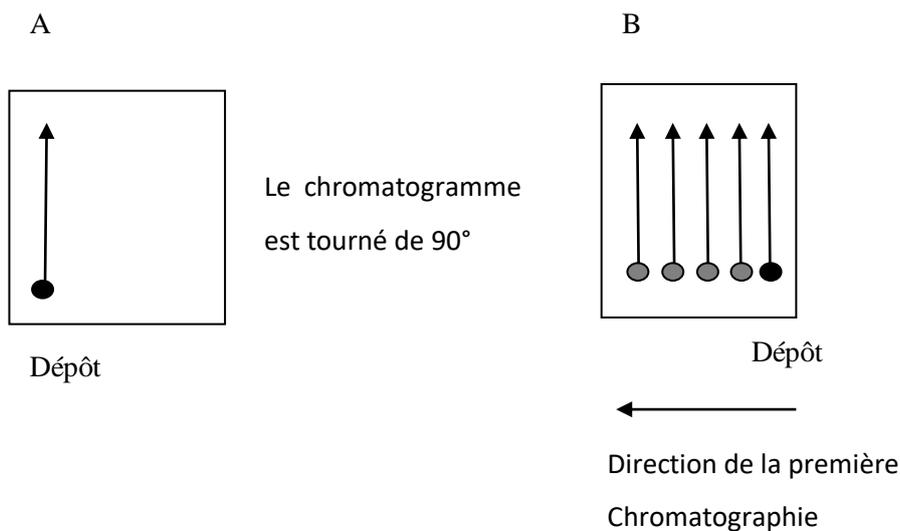


Figure 2. CCM bidimensionnelle

### 1.3. Paramètres de séparation et de rétention

Chaque composé est défini par son rétention frontale  $R_f$ , (abréviation de « *retardation factor* »), qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant :

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

On définit l'efficacité  $N$  de la plaque pour un composé dont la distance de migration est  $h$  et le diamètre du spot  $w$  et la hauteur  $H$  de plateau théorique par les relations suivants :

$$N = 16 \frac{h^2}{w^2} \quad \text{et} \quad H = \frac{h}{N}$$

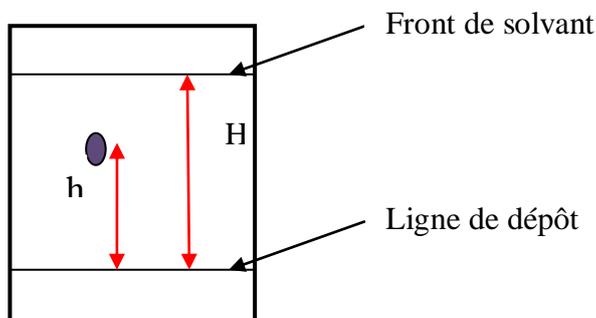


Figure 3. Plaque CCM : calcul du rapport frontal

La résolution est exprimée par la relation:

$$R = 2 \frac{h_2 - h_1}{w_2 + w_2}$$

Le facteur de rétention  $k'$  peut être exprimé en termes de facteur de retard.

$$k' = \frac{1}{R_f} - 1$$

## 1.4. Applications

La CCM présente plusieurs applications ; elle permet le contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique, le suivi de la réaction chimique ou d'un fractionnement chromatographique sur colonne et la recherche du meilleur solvant, avant d'entamer une séparation sur colonne classique. Elle permet également la purification de petites quantités de produit. La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant.

## 2. Chromatographie sur papier

### 2.1. Définition

La chromatographie sur papier est une chromatographie de partage basée sur la différence de solubilité des espèces à séparer. La phase stationnaire est formée par l'eau liée ou adsorbée aux molécules de cellulose du papier. La phase mobile est un liquide, l'éluant. Si une espèce est plus soluble dans l'éluant, elle se déplace plus rapidement qu'une espèce qui l'est moins et inversement.

### 2.2. Principe

L'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier et le solvant qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité (la technique ressemble à celle de la CCM). Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement. Ses plus grands inconvénients par rapport à la chromatographie sur couche mince sont:

- la durée de développement beaucoup plus longue.
- une séparation généralement moins bonne.

### 2.3. Papier:

On peut utiliser du papier filtre ordinaire, mais il est préférable de se procurer du papier conçu pour cet usage, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques sont uniformes. Les marques principales sont Whatman, Schleicher et Schüll, Durieux, Arches. Il existe huit catégories de papier Whatman, classés selon leur épaisseur, la texture de leur surface et la vitesse avec laquelle l'eau y diffuse. Par exemple le papier Whatman n° 1 est le plus utilisé, mais si on désire une grande vitesse d'écoulement, on emploiera le n° 4; le papier n° 20 est très lent, mais il permet une meilleure séparation, donnant des taches très denses et uniformes.

Il existe plusieurs variantes de la chromatographie sur papier :

1/ Chromatographie ascendante. 2/ Chromatographie descendante.

3/ Chromatographie circulante. 4/ Chromatographie à deux dimensions.

Les deux premières ne diffèrent que dans la manière dont se déplace le solvant le long du papier filtre. - dans le premier cas, le solvant se déplace par capillarité de bas en haut le long de la bande de papier ; - dans le second cas, il se déplace de haut en bas par capillarité et par gravité ; - dans la chromatographie circulaire, la feuille de papier est un disque, et c'est du centre du disque que le solvant se déplace en cercle concentrique. -

La chromatographie à deux dimensions consiste à effectuer successivement deux chromatographies, ascendantes ou descendantes, faisant entre elles un angle de 90°. Après avoir expérimenté ces différentes variantes, nous avons choisi d'appliquer la chromatographie ascendante. D'une part, les résultats qu'elle permet d'obtenir diffèrent très peu de ceux que donnent les autres variantes et, d'autre part, c'est celle qui exige l'appareillage le plus simple et le moins onéreux.

### 2.4. Applications

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels.

## 3. Chromatographie sur Colonne

### 3.1 Introduction

Alors que les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, la chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative; elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes.

Elle présente cependant plusieurs inconvénients:

- de grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution
- la durée de l'élution est généralement très grande
- la détection des composés exige une attention constante.

Elle est adaptée à la purification de faibles quantités de produit, lorsque les conditions opératoires sont au point. Cependant, la méthode étant très empirique, sa mise au point nécessite souvent de nombreux essais.

### 3.2. Principe

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur et de section variables; l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés.

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille.

### 3.3. Facteurs de séparation

#### 3.3.1. Adsorbant

Le plus utilisé est l'alumine; cependant, on la limitera aux composés organiques stables car, sous sa forme basique, elle peut provoquer la déshydratation des esters par exemple. Le gel de silice est également fréquemment utilisé pour la séparation de

composés qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être traités par l'alumine. La granulométrie de l'adsorbant doit être supérieure à celle des adsorbants utilisés en CCM. Leur taille est habituellement comprise entre 50 et 200  $\mu\text{m}$ . La quantité d'adsorbant dépend de la difficulté de la séparation et de la masse d'échantillon. On peut considérer que pour chaque gramme d'échantillon, il faut 30 à 50 g d'adsorbant si la polarité des composants à séparer est très différente et jusqu'à 200 g si la séparation est difficile.

### 3.3.2. Éluant

L'éluant est en général un mélange de deux solvants. Au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les substances les moins retenues par l'adsorbant (les moins polaires). Ensuite on fait varier la composition de l'éluant en additionnant graduellement le solvant le plus polaire. Ainsi les composés les plus polaires, retenus sur l'adsorbant, ne migreront que graduellement vers le bas de la colonne.

### 3.3.3. Dimension de la colonne

Les colonnes spécialement conçues pour cet usage ont à leur base une plaque de verre fritté ou de porcelaine qui permet l'écoulement libre de l'éluant tout en empêchant le passage de l'adsorbant. On peut aussi utiliser une burette, au fond de laquelle on place un tampon de laine de verre et du sable.

La quantité d'adsorbant est telle qu'il occupe une hauteur égale à environ 10 fois le diamètre de la colonne. Il faut également prévoir un espace de 10 cm environ au-dessus de l'adsorbant pour placer le solvant.

### 3.3.4. Vitesse d'élution

Elle doit être la plus constante possible. Il faut qu'elle soit suffisamment lente pour que le soluté soit au plus près de l'équilibre entre les phases liquide et adsorbée. Elle ne doit pas être trop lente car sinon les substances diffusent dans le solvant et on obtient des bandes de plus en plus larges et une séparation médiocre.

## 3.4. Remplissage de la colonne

C'est l'opération la plus délicate car le remplissage doit être le plus homogène possible et exempt de bulle d'air. Les surfaces inférieure et supérieure de l'adsorbant doivent

être parfaitement horizontales. La colonne étant verticale, le remplissage peut être réalisé selon deux méthodes au choix.

### 3.4.1. Remplissage par voie humide

On prépare dans un bécher un mélange homogénéisé de l'adsorbant et du moins polaire des solvants utilisé pour le développement en ajoutant par petites quantités l'adsorbant dans le solvant pour obtenir une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement.

A l'aide d'un entonnoir, on verse suffisamment de bouillie pour que l'adsorbant qui se dépose progressivement forme une couche d'environ 2 cm. On tapote les parois de la colonne pour favoriser le tassement de l'adsorbant. On ouvre alors le robinet pour que le solvant s'écoule lentement et on poursuit l'addition de la bouillie homogénéisée par portions successives. Quand tout l'adsorbant est introduit, on laisse décanter jusqu'à ce que le liquide qui surnage soit limpide. Pendant l'opération, on doit veiller à ce que le niveau de solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant.

### 3.4.2. Remplissage par voie sèche

La colonne est remplie au deux tiers par le moins polaire des deux solvants et l'adsorbant en poudre est ajouté en portions successives dans la colonne à l'aide d'un entonnoir; pendant l'addition, on frappe continuellement sur les parois pour obtenir un tassement maximal. Quand la première portion forme une couche d'environ 2 cm, on ouvre le robinet pour faire couler lentement le solvant. On termine comme précédemment.

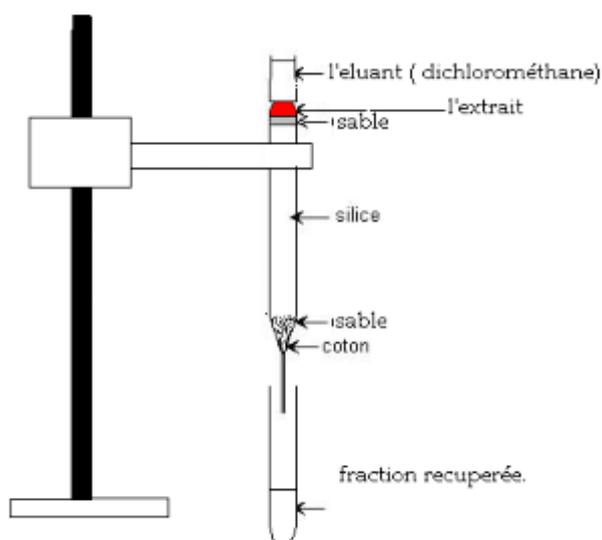


Figure 4. Schéma de la chromatographie sur colonne

### 3.5. Dépôt des produits à analyser

Ils doivent former une zone cylindrique étroite dans le haut de la colonne.

Un liquide est déposé tel quel. Un solide sera dissous dans le minimum du moins polaire des deux solvants. On ajuste d'abord le niveau de solvant pour qu'il soit juste au-dessus de celui de l'adsorbant. A l'aide d'une pipette, on coule l'échantillon au sommet de la colonne de façon uniforme sur toute la surface de la colonne sans la déformer. Si nécessaire, on ajuste à nouveau, comme précédemment, le niveau de liquide de la colonne :

L'échantillon est ainsi adsorbé uniformément au sommet de la colonne. On peut placer un verre fritté ou une rondelle de papier filtre au-dessus de l'adsorbant pour prévenir une remise en suspension de l'adsorbant.

### 3.6. Éluion

On peut alimenter la colonne en continu à l'aide d'une ampoule de coulée ou bien ajouter manuellement l'éluant. Dans tous les cas, la surface de l'adsorbant ne doit jamais être au contact de l'air. En quelques minutes, une colonne laissée à sec se détériore: des fissures apparaissent dans la phase fixe et toute éluion ultérieure se transforme en ruissellement.

Pour la plupart des opérations, une vitesse de 5 à 50 gouttes à la minute convient (la limite inférieure correspond aux séparations difficiles). On collecte les fractions et on les analyse.