

CPL - HPLC
CHROMATOGRAPHIE
PLANAIRE

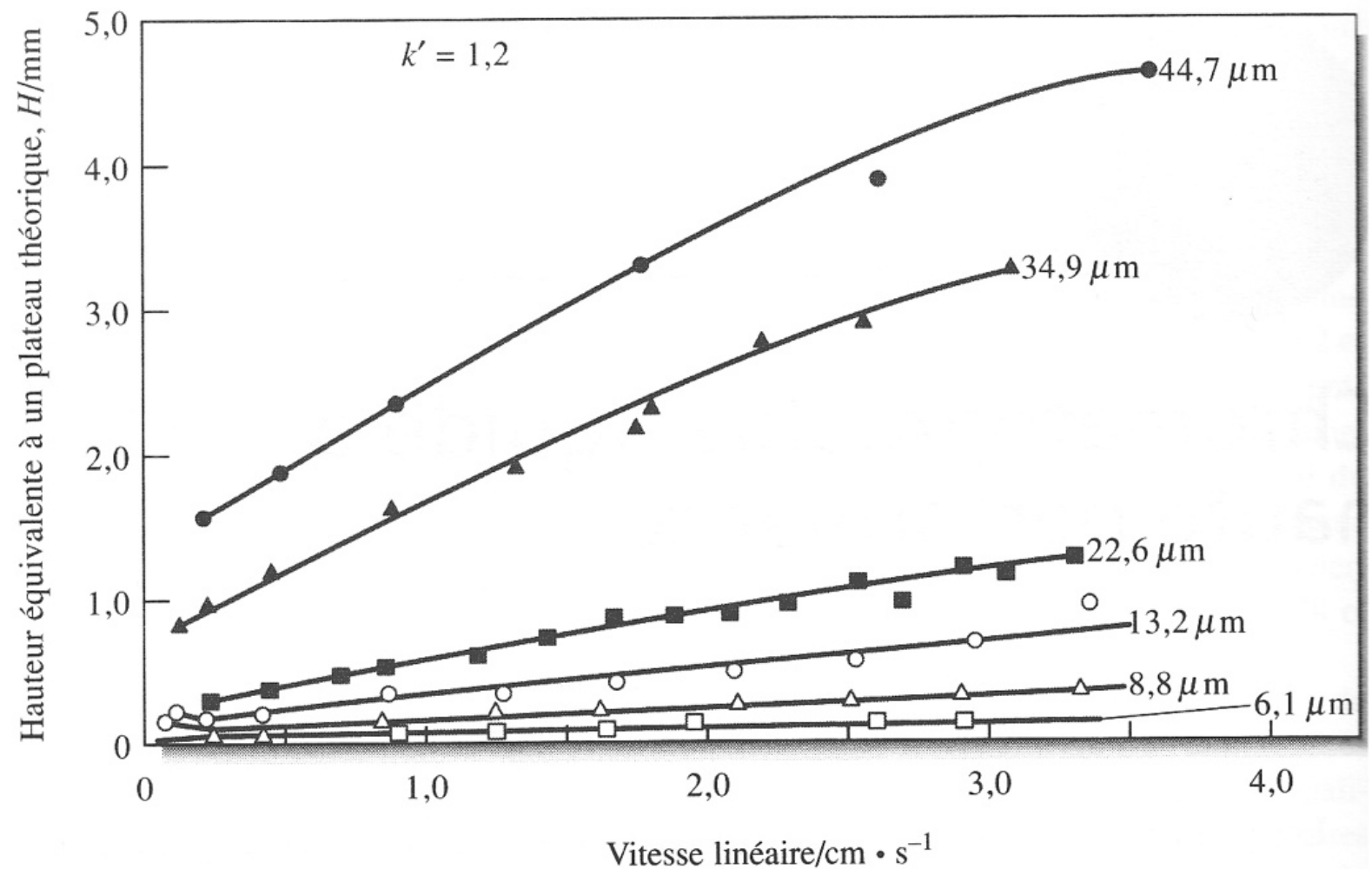
<http://ligodin.free.fr>
ligodin@free.fr

☞ Les premières CPL ont été effectuées à l'aide de colonnes en verre de 10 à 50 mm de diamètres intérieur, remplies sur une longueur de 50 à 500 cm de particules solides recouvertes d'un liquide immobilisé constituant la phase stationnaire.

Figure 1

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

Dimensions de la colonne : 30 cm × 2,4 mm. Soluté : N,N-diéthyl-*n*-aminoazobenzène. Phase mobile : mélange d'hexane, de dichlorométhane et d'isopropanol. (D'après R. E. Majors, *J. Chromatogr. Sci.*, 1973, 11, 92. Avec autorisation.)



1/ Comment varie la HEPT, donc l'efficacité de la colonne en fonction de la granulométrie du support pour un débit donné ?

2/ Pour une granulométrie donnée, comment évolue la HEPT en fonction du débit ?

- Pour maintenir des débits d'éluants suffisants, les dimensions particulières du solide devaient être d'au moins 150 à 200 μm ; mais même dans de telles conditions, les débits ne dépassaient pas qqs dixième de mL/min.
- C'est en vain qu'on a tenté d'accélérer le processus en opérant par aspiration ou sous pression, car l'↗ du débit entraînait une ↗ de H, et donc une ↘ de l'efficacité.

■ Très tôt dans le développement de la CPL, on a compris qu'une **importante amélioration** de l'efficacité de la colonne pourrait résulter de la **↘** de la granulométrie du support.

■ Ce n'est qu'à la fin des années 1960 que fut développée la technologie de production et d'utilisation de supports n'ayant que 5 à 10 μm de diamètre particulaire. Leur emploi nécessite des appareils sophistiqués qui contrastent avec la simplicité des dispositifs antérieurs.

L'expression **CLHP** est utilisée pour distinguer ces nouvelles techniques des méthodes classiques qui restent néanmoins très utilisées, surtout en chimie préparative.

■ La CLHP est un type de chromatographie utilisant une phase mobile et une **phase stationnaire très finement divisée**.

Pour obtenir un débit satisfaisant, il faut injecter l'éluant sous des pressions de plusieurs dizaines à centaines de bars.

5 types les plus courants d'HPLC :

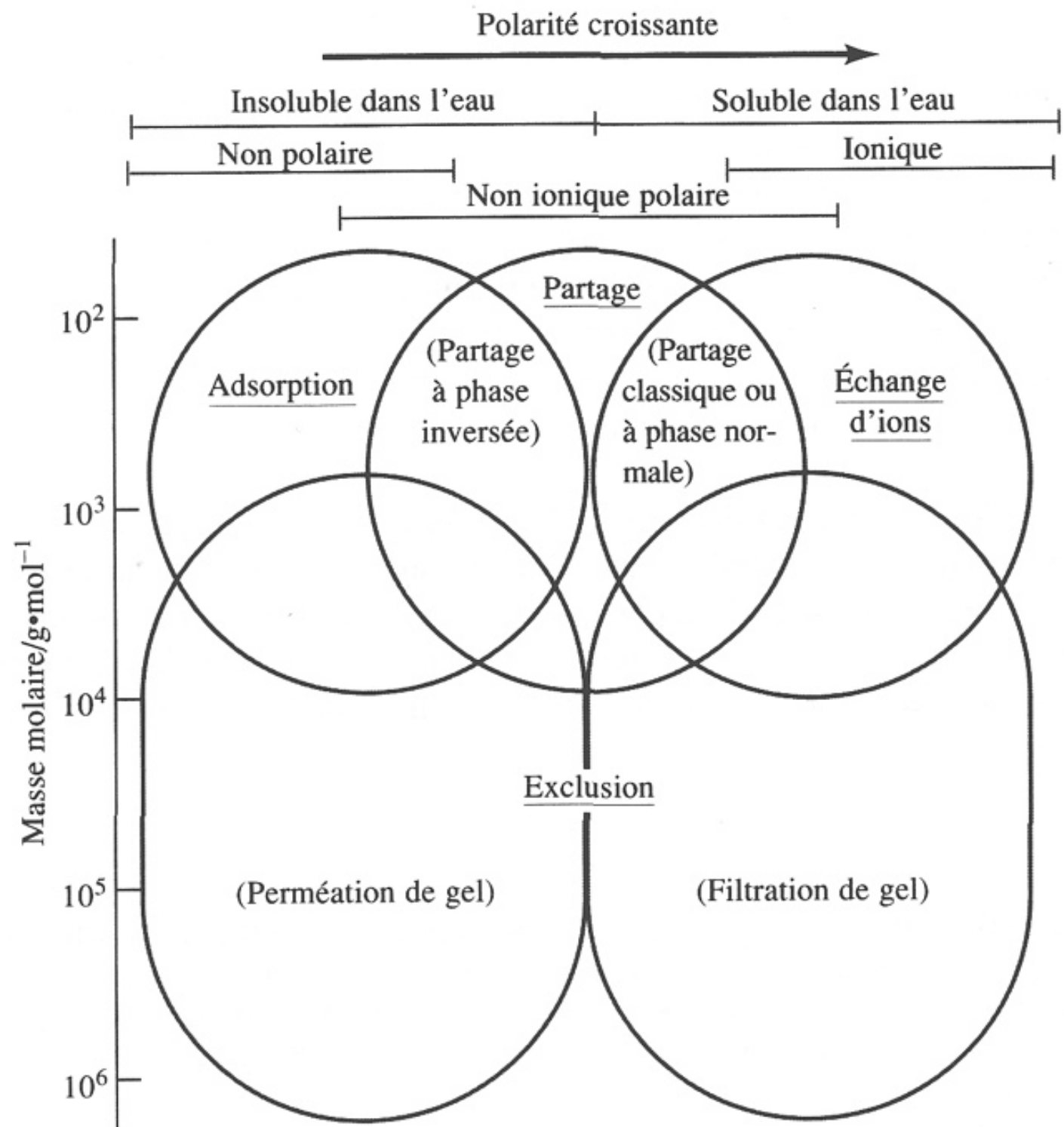
- (1) La **chromatographie de partage** ou **liquide-liquide**;
- (2) La **chromatographie d'adsorption** ou **liquide-solide**;
- (3) La **chromatographie par échange d'ions**, et

2 types de chromatographie d'exclusion :

- (4) La **chromatographie par perméation de gel** et
- (5) La **chromatographie par filtration de gel**.

Figure 2

Domaines d'application de la chromatographie liquide. (D'après D. L. Saunders, dans *Chromatography*, 3e éd., E. Heftmann, Ed., p. 81, New York : Van Nostrand Reinhold, 1975. Avec autorisation.)



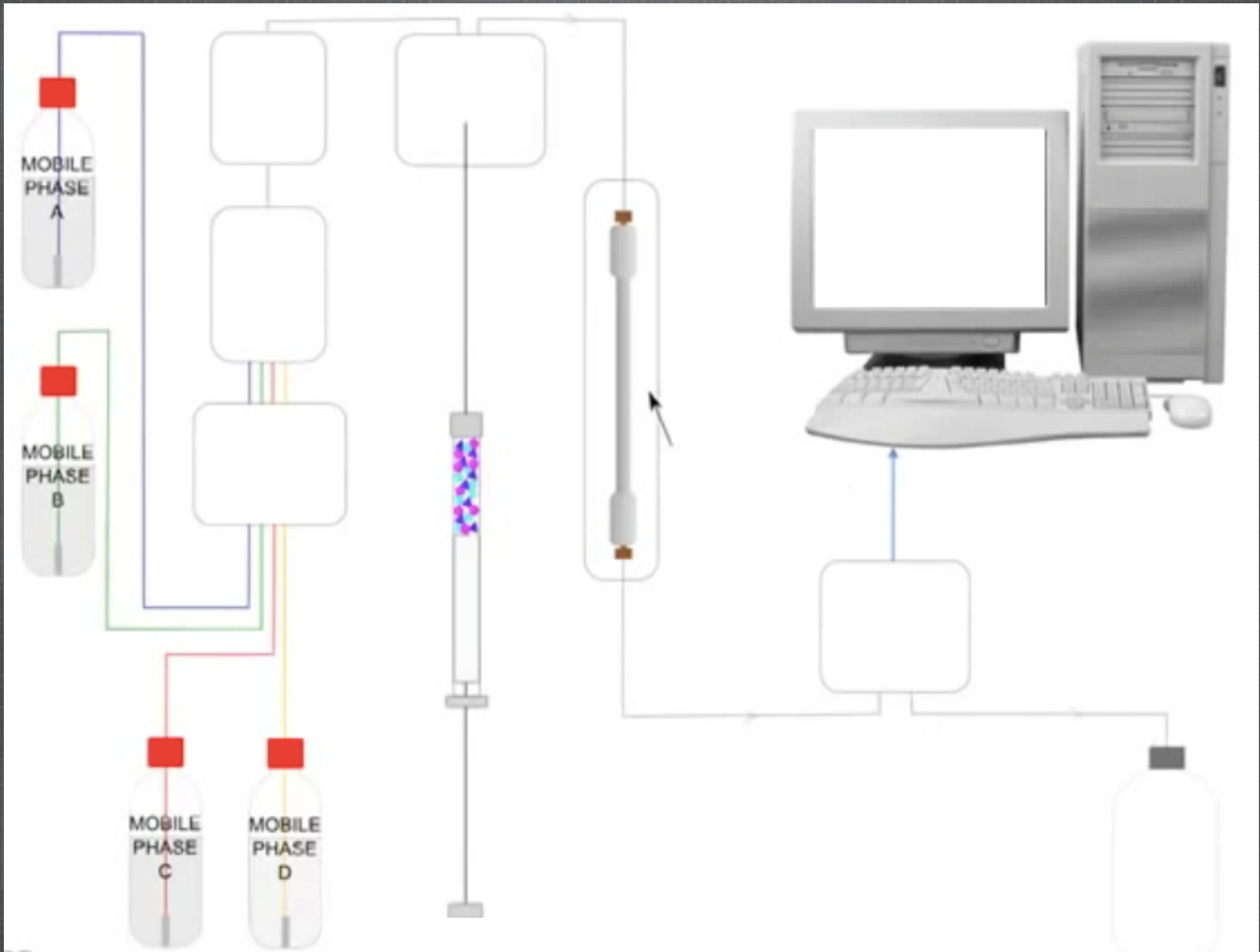
- Pour les analytes de masse molaire supérieure à 10000 g.mol^{-1} , on utilise généralement une des 2 méthodes d'exclusion : la perméation de gel pour les espèces non polaires et la filtration de gel pour les composés polaires ou ioniques.
- Dans le cas d'espèces ioniques de faible masse molaire, on choisit généralement la chromatographie par échange d'ions. Quant aux petites espèces polaires mais non ioniques, on préfère les traiter par les méthodes de partages.
- En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, l'HPLC est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation. Elle présente un marché annuel de l'ordre du milliard d'euros.

■ I - L'appareillage

- Il faut des pressions de plusieurs centaines d'atmosphères pour assurer des débits raisonnables avec les nouveaux supports dont la taille particulaire est comprise entre 2 et $10 \mu\text{m}$.
- En raison de ces pressions élevées, l'appareillage requis est considérablement plus élaboré et coûteux que celui qu'utilisent les autres types de chromatographie.

👉 Regarder la vidéo suivante : <https://www.youtube.com/watch?v=I-CdTU5X4HA>

1/ Compléter les éléments de la chaîne HPLC :



2/ Sur le schéma classique d'une chaîne HPLC, la pompe se trouve juste après la vanne de mélange. Existe-t-il d'autres dispositifs ?

3/ Quelles sont les différences avec le schéma classique ?

4/ Quelle est la particularité du compartiment recevant la colonne ?

■ 1) Les réservoirs de phase mobile et le traitement du solvant

- Les appareils modernes sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs en verre ou en acier inoxydable, contenant chacun au moins 500 mL de solvant. On y adjoint souvent des dispositifs qui permettent d'en éliminer les poussières et les gaz dissous.
- En effet, ces derniers peuvent former des bulles au sein de la colonne, ce qui cause un élargissement des pics; en outre, bulles et poussières perturbent le fonctionnement du détecteur.
- Le dégazage peut s'effectuer par **barbotage**, procédé par lequel les gaz dissous sont chassés de la solution par l'action de fines bulles d'un gaz inerte, insoluble dans la phase mobile, où plus récemment à l'aide d'un **dégazeur en ligne**.

👉 Regarder la vidéo suivante :

<https://www.youtube.com/watch?v=tAcfJPveWwM>

1/ Indiquer ce que l'on appelle une **analyse isocratique** ?

2/ Indiquer ce que l'on appelle une **analyse en gradient** ?

■ La programmation de solvant est destinée à améliorer l'efficacité de la séparation, tout comme la programmation de température en CG.

Les appareils modernes de CLHP sont souvent équipés de vannes proportionnantes qui permettent d'injecter les liquides de deux ou plusieurs réservoirs à des vitesses qui varient de manière continue.

■ 2) Les dispositifs de pompage

■ Les pompes doivent répondre à des exigences rigoureuses :

- ❶ obtention de pressions jusqu'à au moins 420 bars;
- ❷ absence de pulsations;
- ❸ débit compris entre 0,1 mL et 10 mL/min;
- ❹ contrôle du débit meilleur que 0,5 %;
- ❺ résistance à la corrosion quelque soit le solvant.

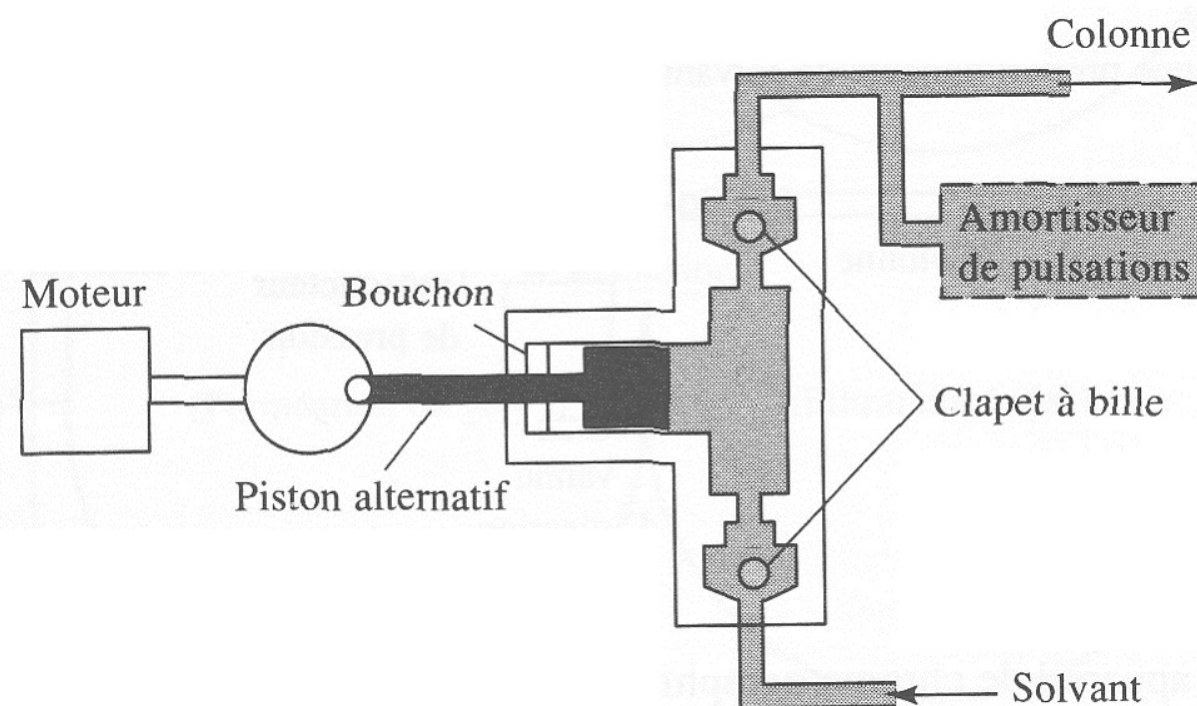


Figure 4
Une pompe alternative pour CLHP.

■ Les pompes alternatives, comprennent une petite chambre cylindrique qui se remplit et se vide en fonction du mvt de va-et-vient d'un piston. Ce mvt donne naissance à un écoulement pulsé qui doit être amorti. Les avantages de ces pompes résident dans leur petit volume interne, leur pression de sortie élevée (jusqu'à 700 bars), leur adaptabilité à la technique du gradient d'élution et la constance de leur débit qui est indépendant de la pression dans la colonne et de la viscosité du solvant.

■ 3) Les dispositifs d'injection de l'échantillon

■ 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 ≤ 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 l'échantillon à l'aide d'une seringue.

la méthode d'introduction emploie des boucles d'échantillonnage.

■ Ces dispositifs font partie intégrante de l'appareillage de HPLC 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 qqs dixièmes de %.

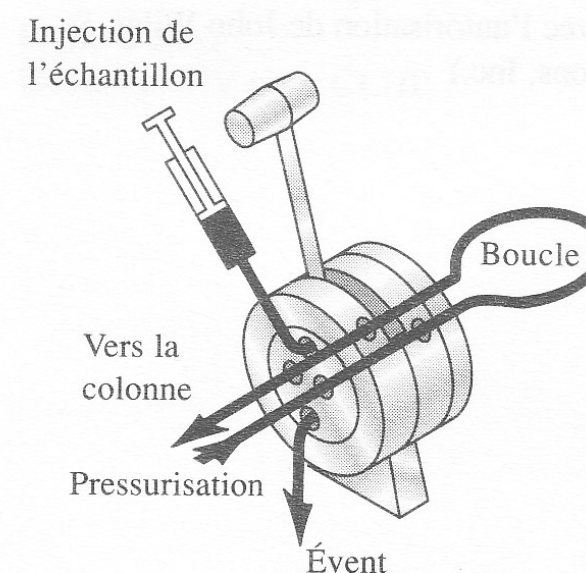
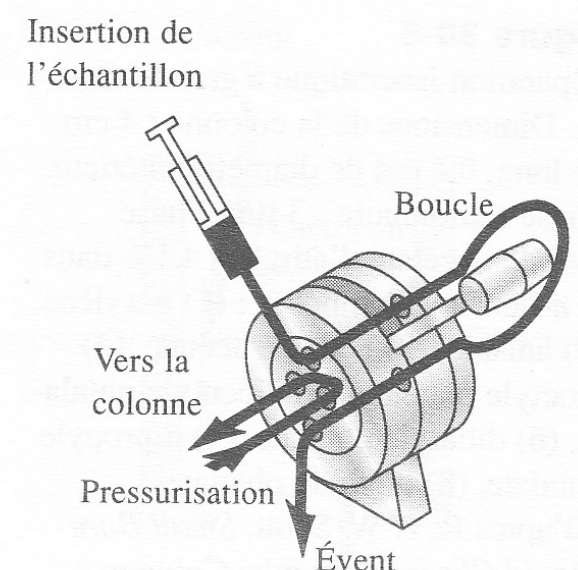


Figure 5
Une boucle d'échantillonnage pour CLHP. (Document de Beckman Instruments, Fullerton, CA.)

■ 4) Les colonnes

▀ Elles sont usuellement en acier inoxydable. 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 svt de 40000 à 60000 plateaux / m.

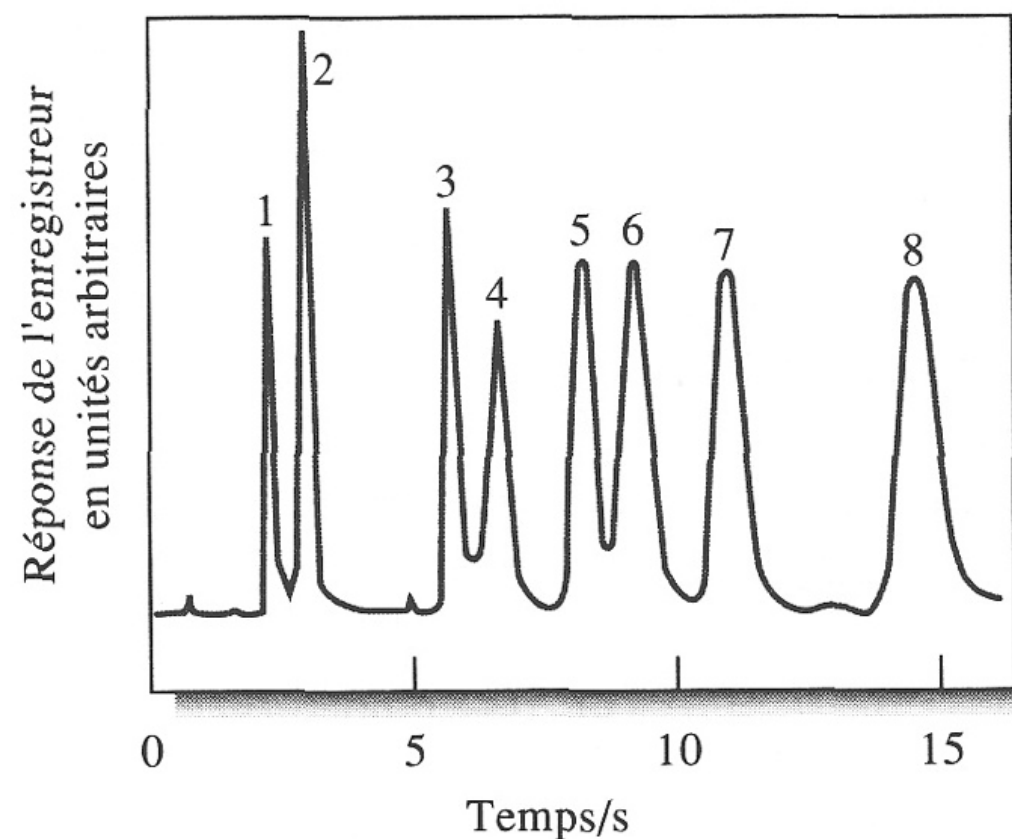


- Il existe des μ colonnes à haute performance qui ont un diamètre intérieur de 1 à 4,6 mm et une longueur de 3 à 7,5 cm. Ces colonnes, remplies de particules de 2 à 5 μ m, offrent jusqu'à 100000 plateaux/m et présentent les avantages de la rapidité et d'une consommation minimale de solvant.
- Le matériau de remplissage le plus couramment employé est la silice en μ grains. Ceux-ci sont souvent recouverts d'un mince film organique.

Figure 6

Séparation isocratique à grande vitesse. Dimensions de la colonne : 4 cm de long, 0,4 cm de diamètre intérieur. Phase stationnaire : 3 μ m. Phase mobile : acétate d'éthyle à 4,1% dans le *n*-hexane. Composés : (1) *p*-xylène, (2) anisole, (3) benzyle acétate, (4) dioctyle phtalate, (5) dipentyle phtalate, (6) dibutyle phtalate, (7) dipropyle phtalate, (8) diéthyle phtalate.

(D'après R. P. W. Scott, *Small Bore Liquid Chromatography Columns : Their Properties and Uses*, p. 156, New York : Wiley, 1984. Reproduit avec l'autorisation de John Wiley & Sons, Inc.)



■ 4.1 Colonnes de garde

■ On place souvent une courte colonne de protection (pré-colonne) en amont de la colonne analytique afin d'↗ la durée de vie, en éliminant les poussières contenues dans les solvants.

■ 4.2 Thermostats

■ Pour de nombreuses applications, un contrôle rigoureux de la température n'est pas nécessaire. On obtient néanmoins de meilleurs chromatogrammes en maintenant la température de la colonne à quelques dixièmes de °C.

Les appareils commerciaux sont équipés de dispositifs de régulation qui contrôlent la température jusqu'à 80 °C.

■ 5) Les détecteurs

■ En HPLC, il n'existe pas de détecteurs universels aussi sensibles que ceux utilisés en CG. Dès lors, le dispositif utilisé dépend de la nature de l'échantillon. Le tableau présente quelques détecteurs courants et leurs propriétés.

Performances des détecteurs pour la CLHP*

Détecteur CLHP	Disponible sur le marché	Limite de détection (détecteurs commerciaux) [†]	Limite de détection (limites actuelles) [‡]
Absorbance	oui [§]	100 pg–1 ng	1 pg
Fluorescence	oui [§]	1–10 pg	10 fg
Électrochimique	oui [§]	10 pg–1 ng	100 fg
Indice de réfraction	oui	100 ng–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	10 µg	500 ng
Activité optique	non	–	1 ng
Sélectif par élément	non	–	10 ng
Photoionisation	non	–	1 pg–1 ng

*D'après E. S. Yeung et R. S. Synovec, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 1238. Avec autorisation. Copyright American Chemical Society.

[†]La limite de détection (en anglais : *mass LOD*) est calculée pour une masse injectée qui donne un signal égal à cinq fois l'écart-type du bruit, en utilisant une masse molaire de 200 g/mol, 10 µl injectés en CLHP conventionnelle ou 1 µl en CLHP microbore.

[‡]Même définition qu'en [†], mais le volume injecté est généralement plus petit.

[§]Disponible sur le marché pour CLHP microbore également.

👉 Regarder la vidéo suivante :

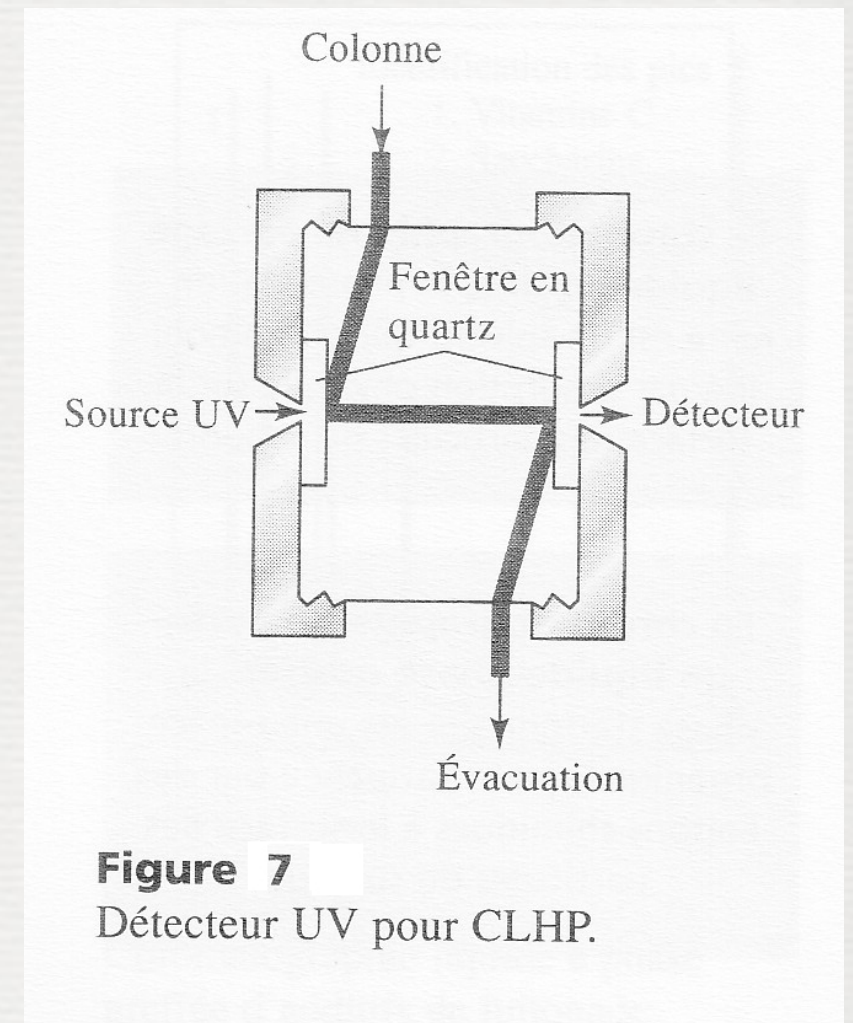
https://www.youtube.com/watch?v=sfxEj_MxBcs

1/ Quelles sont les longueurs d'onde les plus souvent utilisées, et pourquoi ?

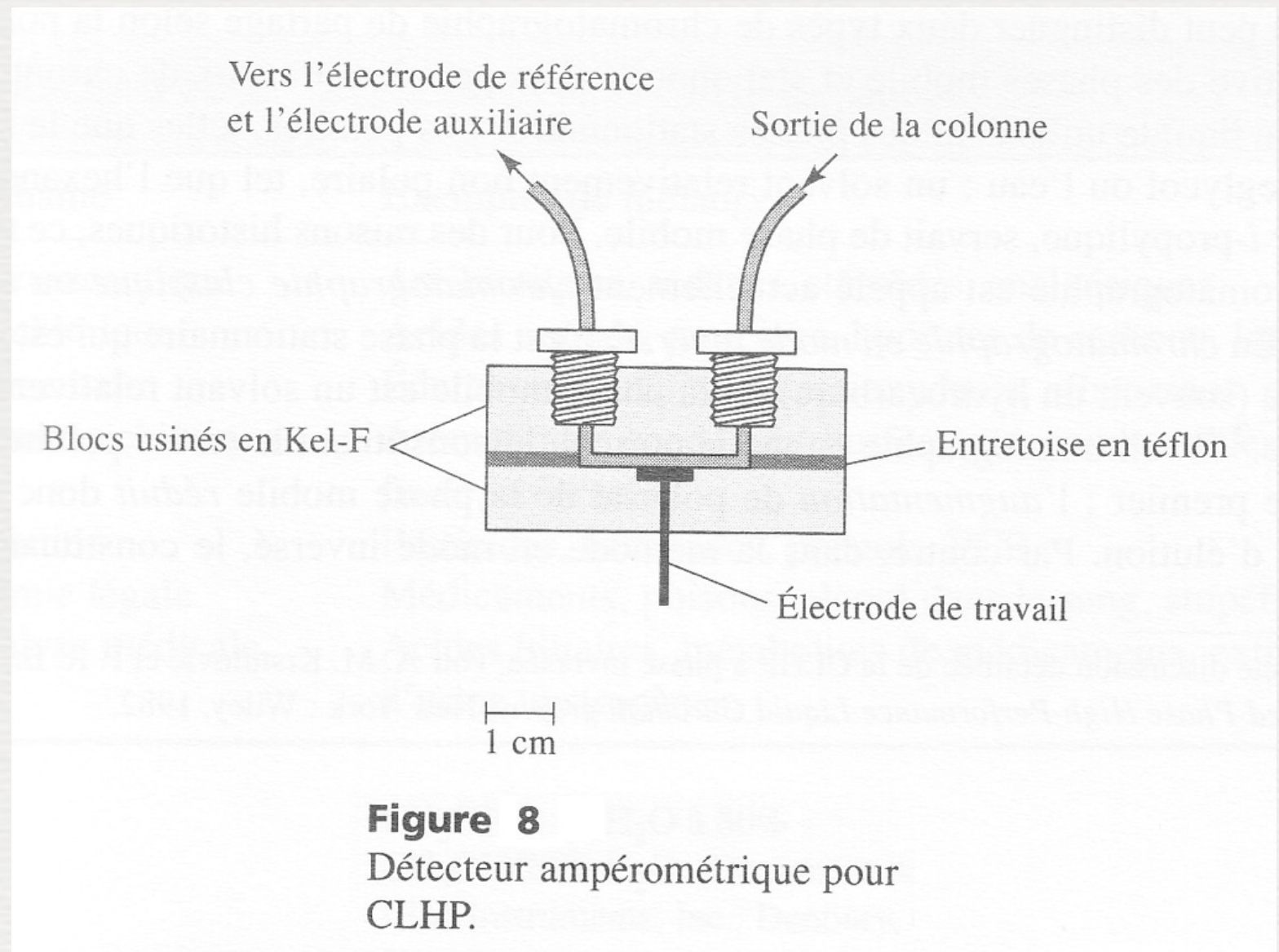
2/ Dans la pratique, le prisme est remplacé par un élément plus performant, préciser lequel.

3/ Dans la pratique, est-ce que la fente de sortie est en mouvement ?

■ Les spectrophotomètres sont également très utilisés du fait de leur polyvalence, ce sont svt des appareils à barrette de diodes qui peuvent afficher le spectre complet de l'analyte à sa sortie de la colonne.



■ On utilise aussi divers détecteurs électrochimiques qui permettent d'effectuer des mesures potentiométriques, conductimétriques ou voltampérométriques.



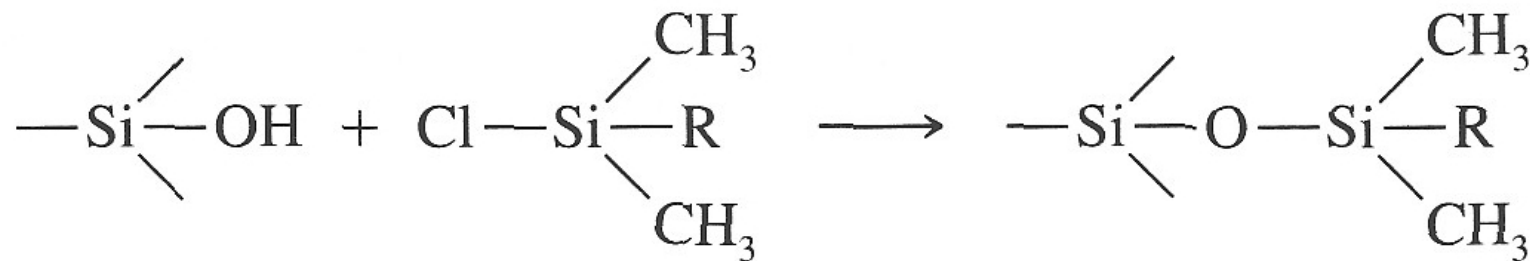
■ Le réfractomètre est utilisé pour mesurer la variation d'indice de réfraction du solvant due à la présence de l'analyte : il n'est pas sélectif et répond à tous les solutés; sa sensibilité est limitée.

■ II - La chromatographie de partage

- En CPL, la plus utilisée est la **chromatographie de partage** qui peut être subdivisée en chromatographie **liquide-liquide** et **liquide-phase greffée**, la différence résidant dans la manière dont on fixe la phase stationnaire sur les particules du support.
- En **chromatographie de partage liquide-liquide**, la phase stationnaire est un solvant qui est immobilisé par adsorption physique sur la surface des particules du support.
- En **chromatographie de partage liquide-phase greffée**, la phase stationnaire est une espèce organique qui est attachée par des liaisons chimiques à la surface des particules du support.

■ 1) Support à phase greffée

■ La plupart sont préparés par la réaction d'un organochloro silane avec les groupements -OH préalablement formés sur la surface de particules de silice par hydrolyse de HCl dilué et chaud. Le produit obtenu est un organosiloxane tel que le montre la réaction ci-dessous :



R est un groupement n-octyle ou n-octadécyle. On peut obtenir toute une gamme de polarité pour la phase stationnaire en greffant des amines aliphatiques, des éthers, des nitriles et des hydrocarbures aromatiques.

■ Ces supports sont plus stables que ceux où la phase stationnaire est retenue par simple imprégnation (dans ce cas, la phase mobile entraîne la phase stationnaire, et pour cette raison, la technique du gradient d'élution ne peut être appliquée). Leur inconvénient majeur est que leur capacité est limitée.

■ 2) Supports à phase normale et à phase inverse

👉 Regarder la vidéo suivante : <https://www.youtube.com/watch?v=MLoitPJQH3g>

1/ Les 1^{ères} CPL utilisaient des phases stationnaires très polaires. Comment appelle-t-on ce type de chromatographie ?

2/ En chromatographie en mode inverse, quelle est la polarité de la phase stationnaire ?

3/ Comment l'analyte le moins polaire est-il élué, respectivement en mode normal, puis en mode inverse ?

4/ Quel mode de fonctionnement est le plus souvent utilisé ?

■ 3) Choix des phases mobiles et stationnaires

■ Il faut un équilibre judicieux entre les forces intermoléculaires qu'impliquent l'analyte, la phase mobile et la phase stationnaire. Ces forces peuvent être qualitativement classées en terme de polarité relative.

En générale, la polarité des groupements fonctionnels organiques usuels ↗ dans l'ordre suivant :

hydrocarbures aliphatiques < oléfines (alcènes) < hydrocarbures aromatiques < halogénures < sulfures < éthers < nitrodérivés < esters ≈ aldéhydes ≈ cétones < alcools ≈ amines < sulfones ($\text{SO}_2\text{RR}'$) < sulfoxydes (DMSO) < amides < acides < eau.

■ La plupart des séparations 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.

1/ Comment seront les temps de rétention des analytes, si leurs polarités sont proches de celle de la phase mobile et différentes de celle de la phase stationnaire ?

2/ Comment seront les temps de rétention des analytes, si leurs polarités sont proches de celle de la phase stationnaire ?

■ 4) Applications

☞ Le tableau ci-dessous, illustre la grande variété d'échantillons que cette technique permet d'étudier :

Applications de la CLHP de partage	
Domaine	Exemples de mélanges
Pharmaceutique	Antibiotiques, sédatifs, stéroïdes, analgésiques
Biochimique	Acides aminés, protéines, hydrates de carbone, lipides
Alimentaire	Édulcorants artificiels, antioxydants, aflatoxines, additifs
Industrie chimique	Aromatiques 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

➡ Ces figures montrent des ex. d'applications de chromatographie de partage liquide-phase greffée :

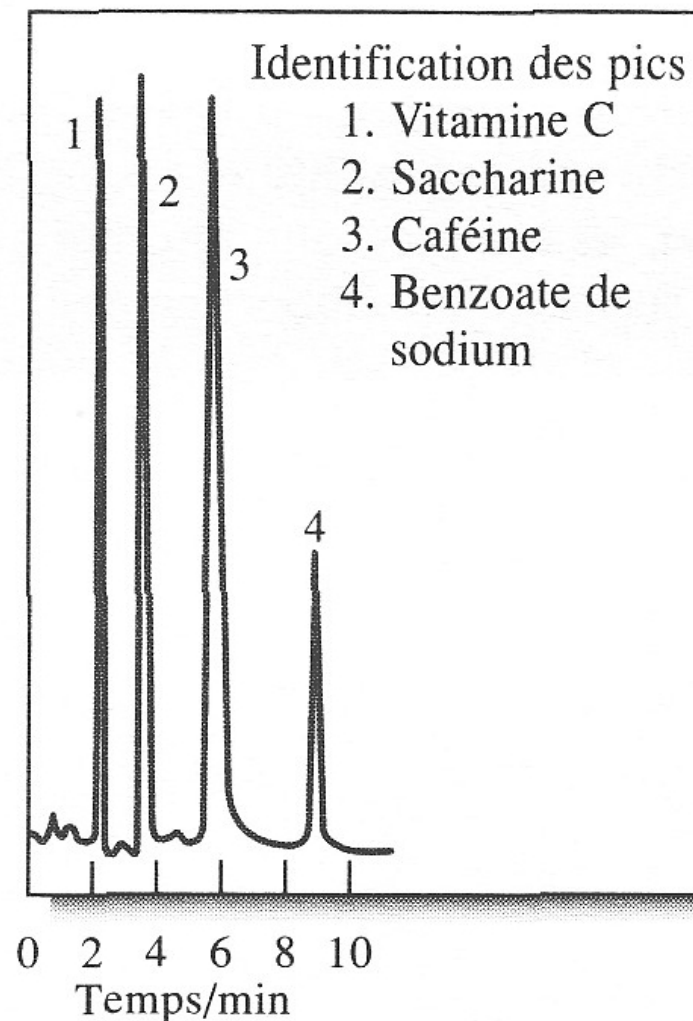


Figure 9

Chromatographie liquide à phase greffée d'additifs de limonade. Remplissage polaire cyano. Élu­tion isocratique par 6% HOAc/94% H₂O. (Document de Du Pont Instrument Systems, Wilmington, DE)

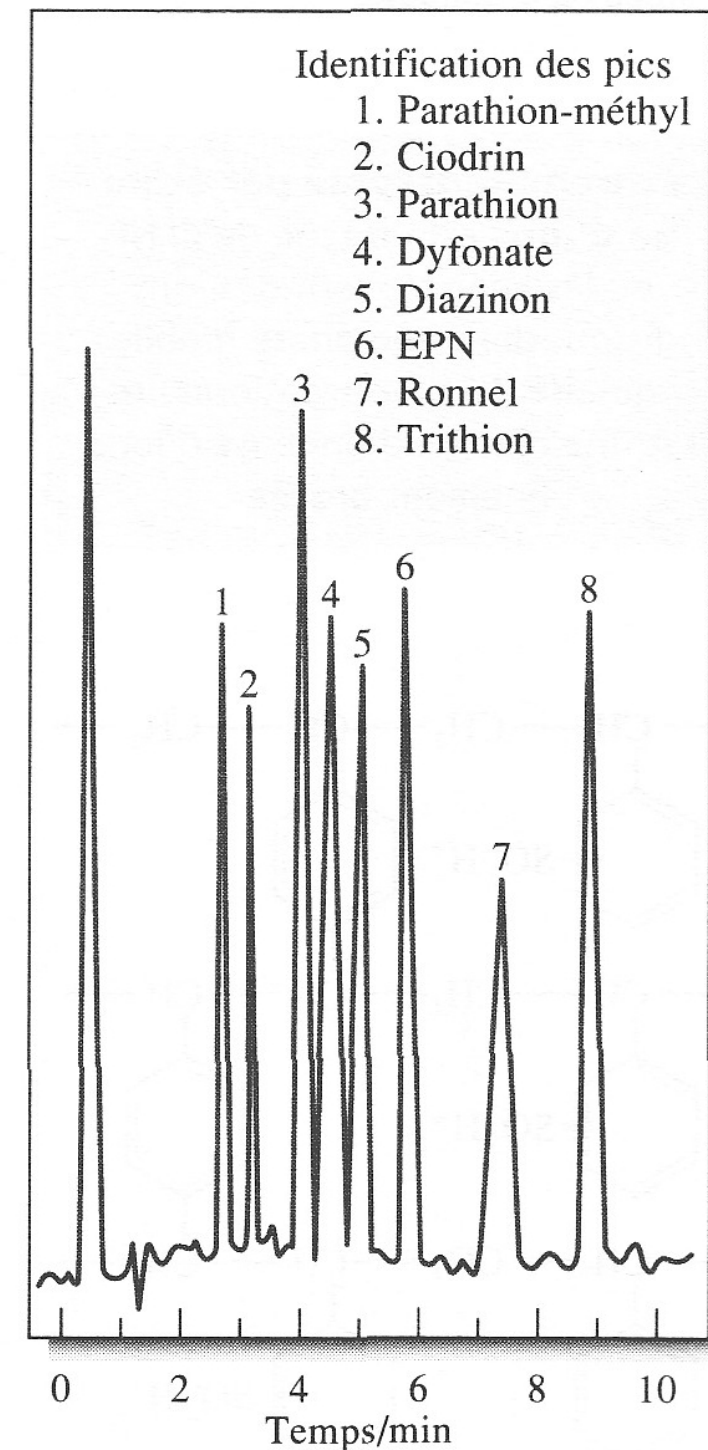


Figure 10

Chromatographie liquide à phase greffée d'insecticides organophosphorés. Remplissage non polaire C₈. Gradient d'élution : de 67% CH₃OH/33% H₂O à 80% CH₃OH/20% H₂O. (Document de IBM Instruments, Inc., Danbury, CT.)

■ III - La Chromatographie d'adsorption

■ 1) Phases stationnaires et mobiles

▮ La silice et l'alumine finement divisées sont les seules phases stationnaires utilisées. Les propriétés d'adsorption de ces 2 supports sont semblables.

▮ Pour chacun d'entre eux, les temps de rétention ↗ avec la polarité de l'analyte.

▮ Dans ce type de chromatographie, le seul paramètre qui puisse contrôler les coefficients de distribution des analytes est la composition de la phase mobile (contrairement à la chromatographie de partage où la polarité de la phase stationnaire peut également être modulée).

■ 2) Applications

▮ Elle s'utilise surtout pour séparer des composés organiques relativement non polaires, insolubles dans l'eau et dont les masses molaires, sont ≤ 5000 Da.

▮ Cette chromatographie l'emporte sur les autres types par sa capacité à fractionner des mélanges d'isomères, tel que les dérivés de benzène substitués en méta et en para.

■ IV - La Chromatographie par échange d'ions

■ 1) Phases stationnaires et mobiles

▣ Ce sont des matériaux polymériques de masse molaire élevée qui contiennent de nombreux groupements fonctionnels ioniques par molécules.

▣ Les résines peuvent être de type acide fort avec des groupements acide sulfonique ($\text{RSO}_3\text{-H}^+$) ou acide faible avec des groupements acide (RCOOH); les 1^{ères} sont les plus utilisées.

▣ Les résines échangeuses d'anions contiennent des groupements fonctionnels amines basiques fixés sur la molécule de polymère.

▣ Les groupements de type base forte sont des amines quaternaires [$\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+, \text{HO}^-$], alors que ceux de type base faible sont des amines secondaires ou tertiaires.

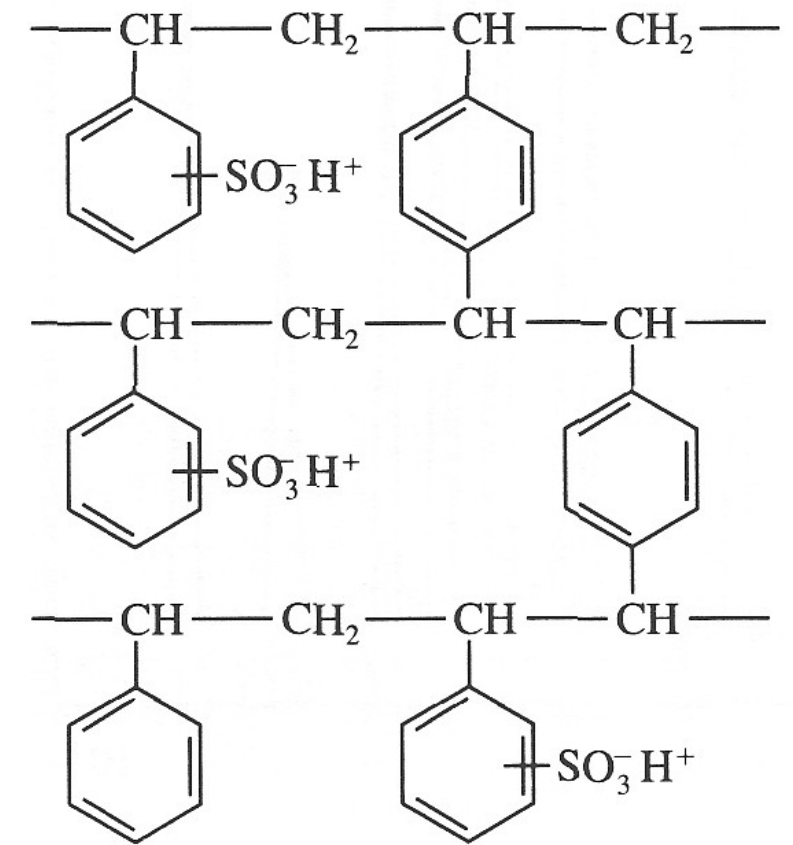
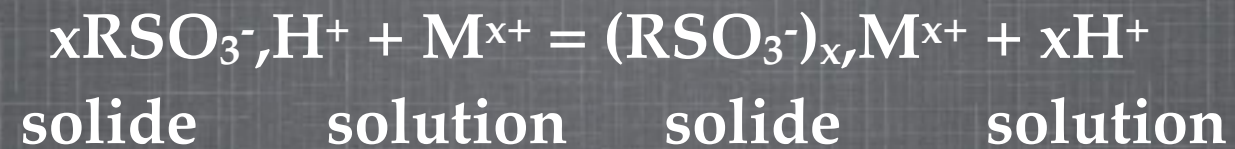


Figure 11

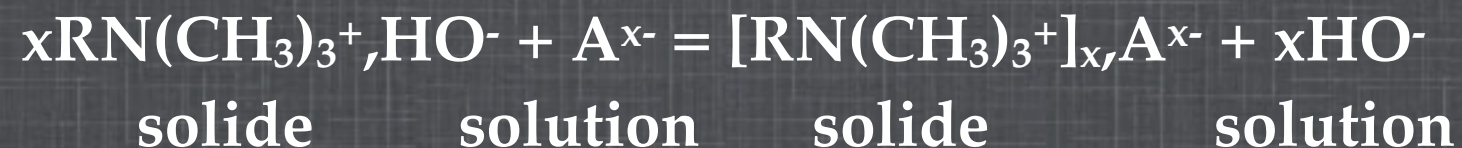
Structure d'une résine échangeuse d'ions en polystyrène réticulé. On utilise des résines semblables où le groupement $\text{---SO}_3^-\text{H}^+$ est remplacé par des groupements $\text{---COO}^-\text{H}^+$, $\text{---NH}_3^+\text{OH}^-$ et $\text{---N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$.

■ Une propriété importante commune à toutes les résines est leur insolubilité en milieux aqueux. Lorsqu'un échangeur de cations est plongé dans une solution contenant des cations M^{x+} , il s'établit entre la phase solide et la solution, l'équilibre d'échange suivant :



Où R représente la partie d'une molécule de résine sur laquelle est fixé un groupement sulfonate.

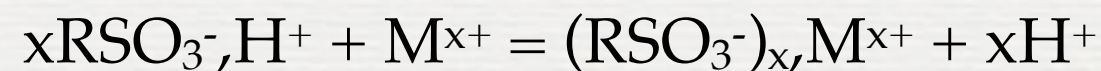
■ Écrire, le processus analogue pour une résine échangeuse d'anions $\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+\text{HO}^-$ dans le cas d'échange d'anions A^{x-} :



■ 2) Applications des résines échangeuses d'ions à la chromatographie

■ Dans ce type de chromatographie, les ions d'analyte sont introduits au sommet de la colonne remplie d'une résine adéquate et sont retenus sur celle-ci. 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'analyte vis-à-vis des groupements chargés de la résine.

Exemple de cations M^{x+} à séparer :



■ Dans un premier temps, M^{x+} est retenu selon la réaction ci-dessus, puis on effectue ensuite l'élution avec une solution diluée d'acide qui favorise la réaction inverse et libère les cations.

■ La différence entre les coefficients de distribution des divers cations provoque la séparation en cours d'élution.

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

■ 3) Chromatographie ionique avec neutralisation

■ L'utilisation des conductimètres fût limité à causes des concentrations élevées en électrolyte requises pour pouvoir mener l'élution en un temps raisonnable. La conductivité des constituants de la phase mobile masquait celle des ions d'analyte !

■ On utilise une **colonne de neutralisation de l'éluant (suppresseur)** placée à la sortie de la colonne échangeuse d'ions. Cette colonne est remplie d'une deuxième résine qui transforme les ions de l'éluant en une espèce moléculaire peu ou pas dissociée, sans modifier la conductivité due aux ions d'analyte.

Exemple dans le cas des cations :

On choisit HCl comme éluant pour séparer et doser des cations, la colonne de neutralisation sera une résine échangeuse d'anions mise sous forme hydroxyde, que l'on notera résine⁺HO⁻(s). Le produit de la réaction entre l'éluant et la colonne de neutralisation est de l'eau.

1/ Écrire l'équation de neutralisation :

2/ Que dire des cations d'analytes M^{x+} ?

Les figures ci-dessous montrent des applications de ce type de chromatographie :

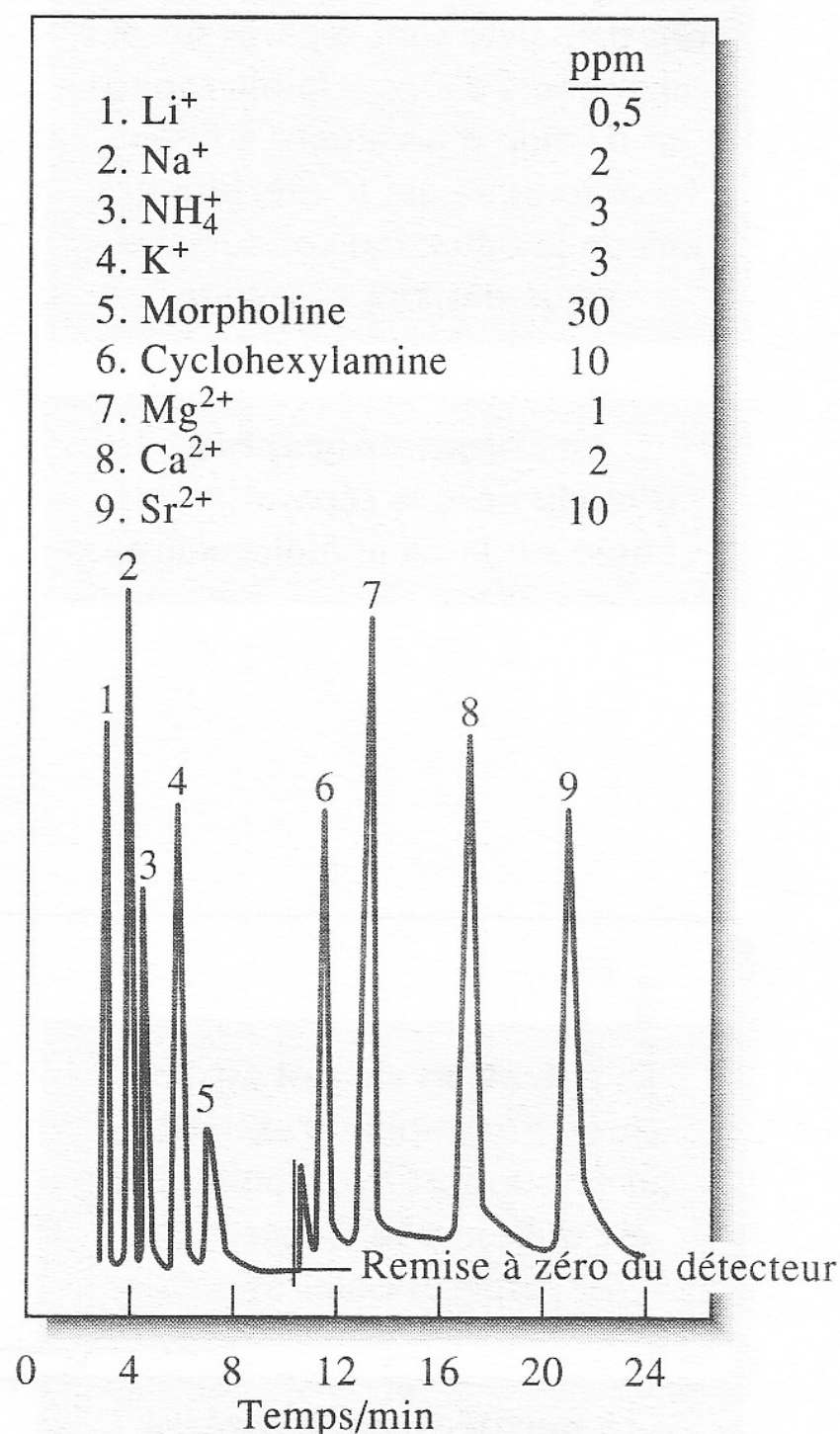


Figure 12

Chromatographie ionique d'un mélange de cations (Document de Dionex, Sunnyvale, CA.)

Dans les 2 cas, la concentration des ions est de l'ordre du ppm.

Le volume d'échantillon est de 50 μL dans un cas et de 20 μL dans l'autre.

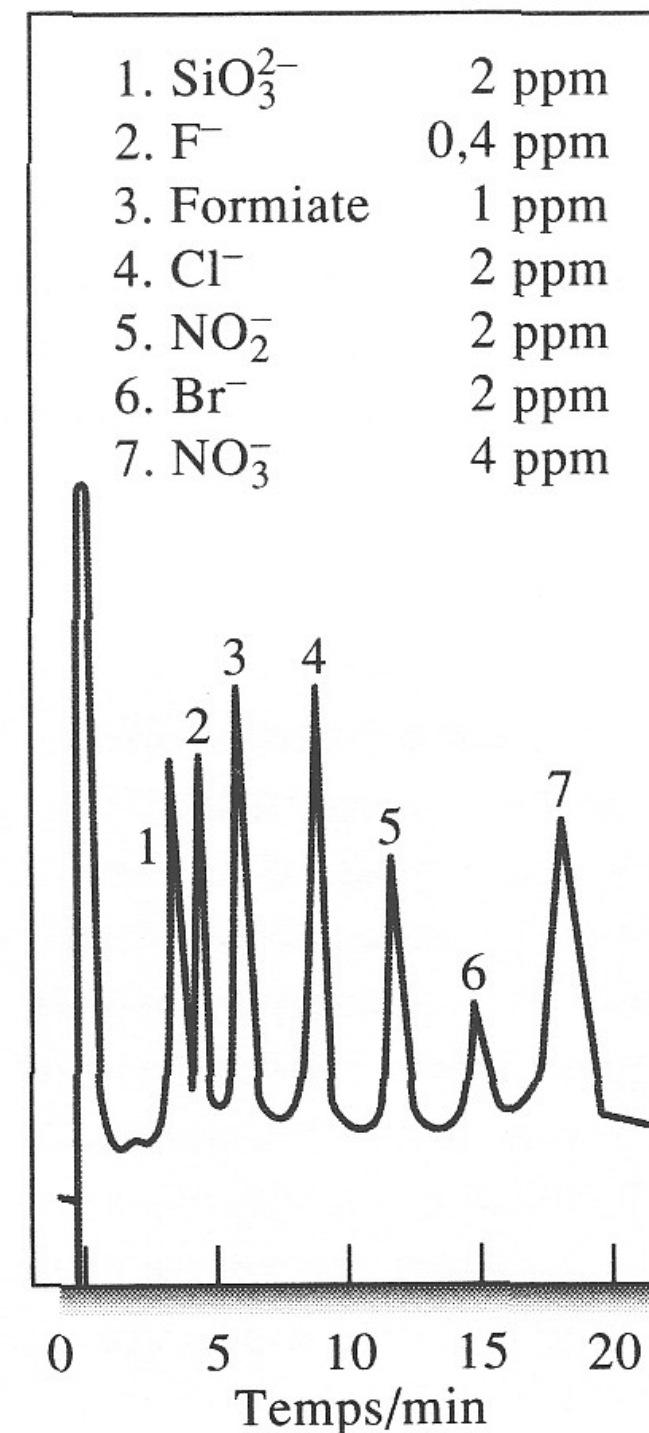


Figure 13

Chromatographie ionique d'un mélange d'anions (Document de Dionex, Sunnyvale, CA.)

■ V - La chromatographie d'exclusion

■ La **chromatographie d'exclusion-diffusion** ou **chromatographie sur gel** est la plus récente des méthodes de CPL. C'est une technique puissante qui est surtout utilisée pour les espèces de masse molaire élevée.

■ 1) Les supports

■ Ils sont constitués de petites ($\approx 10 \mu\text{m}$) particules de silice ou de polymère contenant un réseau de chenaux et de pores uniformes dans lesquels les molécules de soluté et de solvant peuvent diffuser.

■ Lorsqu'elles s'aventurent dans les pores, les molécules sont 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.

■ **Celles 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 2 extrêmes se situent les molécules de taille intermédiaire dont le taux de pénétration dans les pores dépend de leur diamètre.

▣ 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 appelée **filtration de gel** et est utilisée **pour séparer des espèces polaires**.

▣ Celle qui est basée sur des supports hydrophobes est appelée **perméation de gel** et est utilisée **pour séparer des espèces non polaires**.

▣ Dans les 2 cas, on dispose d'une large gamme de diamètres de pores.

Un support donné permet de couvrir un domaine de masses molaires qui s'étend sur 2 à 2,5 puissance de 10. Les masses molaires moyennes pour un support donné peuvent aller de quelques centaines à plusieurs millions.

■ 2) Applications

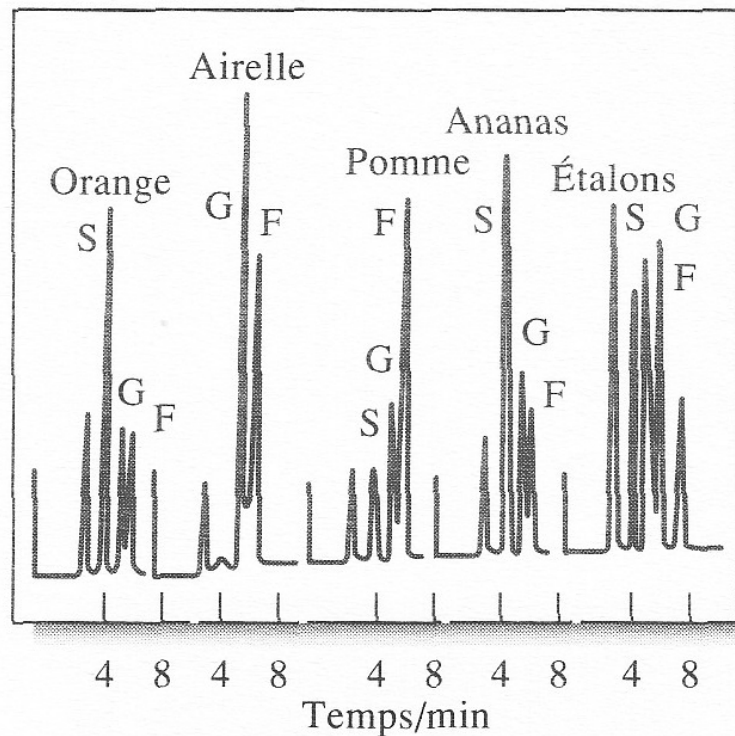


Figure 14

Chromatogramme par filtration de gel du glucose (G), du fructose (F) et du sucrose (S) présents dans des jus en boîte.

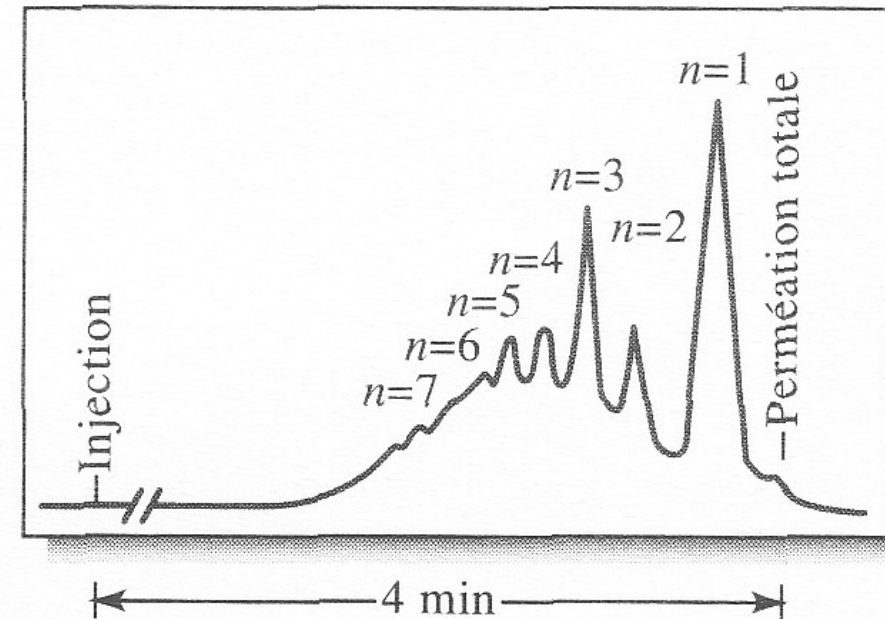


Figure 15

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

■ Dans le cas de la fig. 14, on a utilisé un support hydrophile qui exclut les masses molaires > 1000 Da. Dans le 2nd cas, on utilise un support hydrophobe, avec le THF comme éluant. L'échantillon est une résine époxy commerciale dont le monomère a une masse molaire de 280 Da (n étant le nombre d'unités monomérique).

■ Une autre application importante de la chromatographie d'exclusion est la détermination rapide des masses molaires.

■ VI - La Chromatographie planaire

- Les méthodes de chromatographie planaire comprennent la **CCM**, la chromatographie **sur papier (CP)** et l'**électrochromatographie**.
- Chacune de ces méthodes utilise une couche plane, relativement mince, d'un matériau rigide. La phase mobile se déplace à travers la phase stationnaire par capillarité, parfois par gravité ou encore sous l'action d'une tension électrique.

■ 1) Le champ d'application de la CCM

- Que ce soit du pt de vue de la théorie, de la nature des phases mobiles et stationnaires, ou des applications, la CCM et la CPL sont semblables, au pt que la CCM peut être utilisée pour déterminer les conditions optimales de séparation par CPL sur colonne.
- Les avantages de cette procédure sont la rapidité et le faible coût des expériences exploratoires. Il s'effectue autant d'analyse par CCM que par HPLC.

👉 Regarder la vidéo suivante :

<https://www.youtube.com/watch?v=2iGwaW0Sro0>

▀ C'est un processus au cours duquel l'échantillon est entraîné par une phase mobile à travers la phase stationnaire;

Il est analogue à l'élution en CPL.

Q/ Indiquer les différentes étapes de développement d'une CCM :

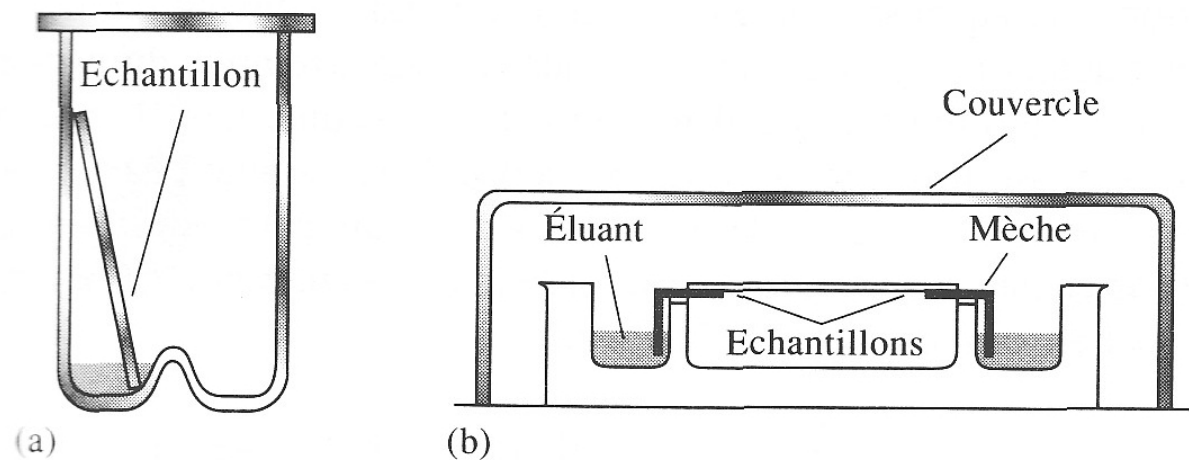


Figure 20

(a) Chambre de développement par courant ascendant. (b) Chambre de développement par courant horizontal, 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.

La figure ci-dessous illustre la séparation d'aa dans un mélange par un développement qui s'est effectué dans 2 directions à angle droit (**chromatographie planaire bidimensionnelle**).

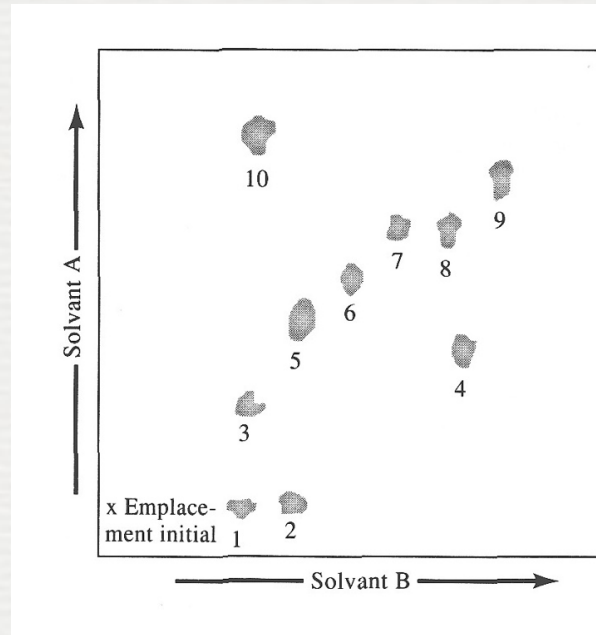


Figure 21

Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (gel de silice) de quelques acides aminés. Solvant A : toluène/chloro-2-éthanol/pyridine. Solvant B : chloroforme/alcool benzylique/acide acétique. Acides aminés : (1) acide aspartique, (2) acide glutamique, (3) sérine, (4) β -alanine, (5) glycine, (6) alanine, (7) méthionine, (8) valine, (9) isoleucine, (10) cystéine.

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

■ 3) Localisation des analytes sur la plaque

■ La 1^{ère} méthode, qui s'appliquent à la plupart des mélanges organiques, consistent à vaporiser une solution d'iode ou d'acide sulfurique qui réagissent tous deux avec les composés organiques pour donner naissance à des produits sombres. Plusieurs réactifs spécifiques (tq la ninhydrine) st également utilisés pour localiser des espèces plus particulières.

■ Une seconde méthode est basée sur l'incorporation d'un matériau fluorescent à la phase stationnaire. Après développement, la plaque est examinée ss UV. 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.

■ 4) La chromatographie sur papier

■ Les séparations sur papier s'effectuent de la même manière que celles sur CM. 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.

■ Toutefois, d'autres liquides 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 CP en phase inverse, avec un solvant polaire comme phase mobile.