

# Méthodes de séparation analytiques

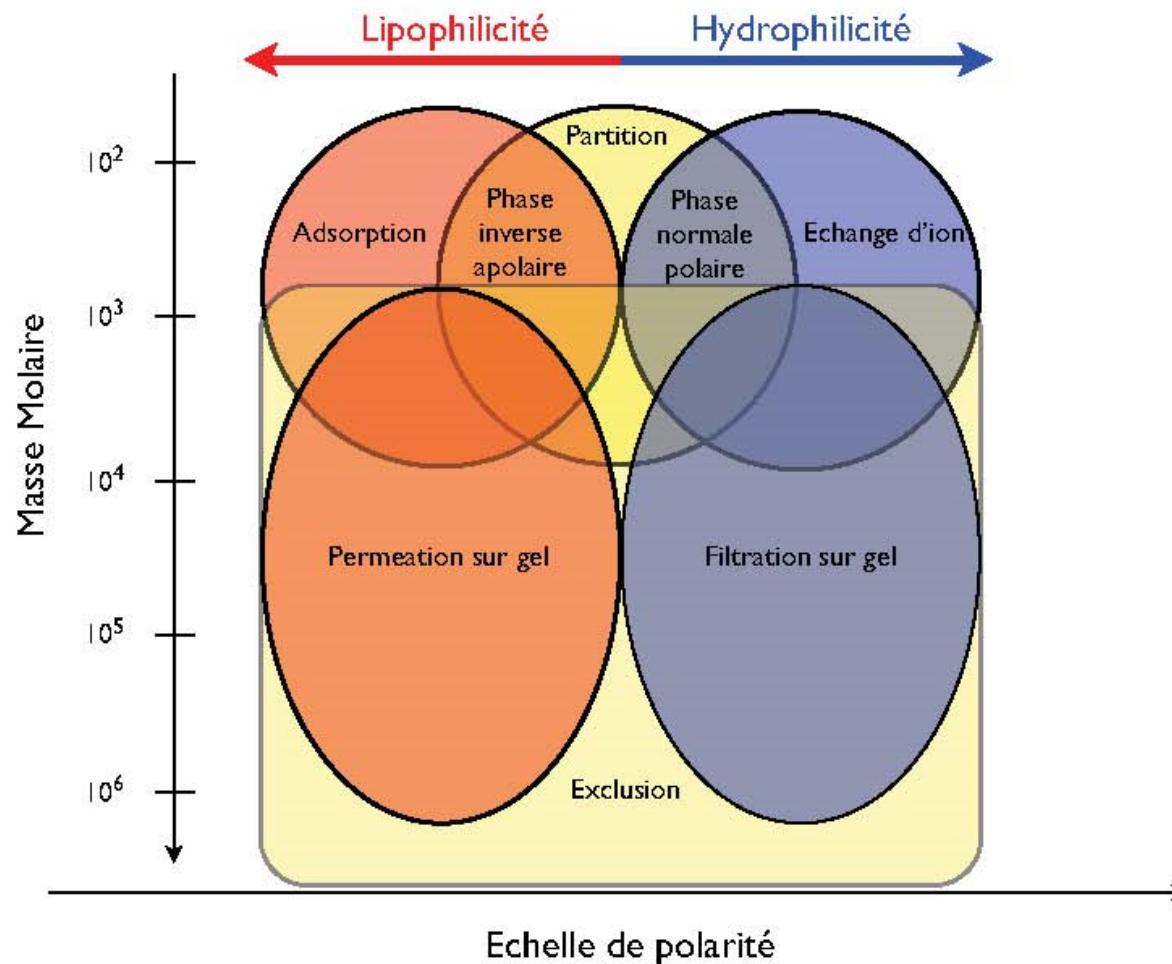
## Chromatographie planaire

## Introduction

- ⇒ La chromatographie planaire fait partie de la chromatographie en phase liquide. Elle se différentie de la chromatographie en phase liquide d'élution par le fait que les solutés séparés sont détectés directement sur la phase stationnaire. Ils peuvent être par la suite désorbés de la phase stationnaire si nécessaire.
- ⇒ La chromatographie planaire est aussi communément appelée chromatographie à avancement limité ou chromatographie par développement.
- ⇒ Dans un cadre purement analytique on l'appelle le plus souvent la chromatographie sur couche mince (C.C.M.).
- ⇒ La chromatographie planaire reprend tous les principes des chromatographies en phase liquide vus précédemment. Tous les types de phase stationnaires de la chromatographie d'élution sont disponibles pour la chromatographie planaire.
- ⇒ Dès lors, on peut faire de la chromatographie en phase normale (adsorption ou partage), en phase inverse (partage), de la chromatographie ionique et par exclusion stérique.
- ⇒ La phase stationnaire peut être constituée de cellulose pure, matériau indisponible en chromatographie en phase liquide d'élution. On parlera ici de chromatographie sur papier.

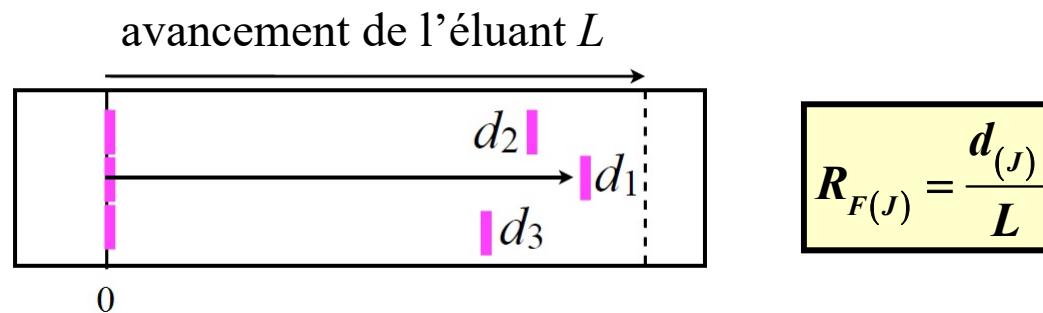
- ⇒ La chromatographie planaire peut être réalisée de façon analytique ou préparative.
- ↳ Les deux méthodes diffèrent par la quantité de phase stationnaire utilisée pour la séparation.
- ⇒ Pour une chromatographie planaire analytique, l'épaisseur de la couche de phase stationnaire est de l'ordre de 0,2 mm.
- ⇒ Pour une chromatographie planaire préparative, l'épaisseur de la phase stationnaire peut atteindre 2 mm. On peut alors séparer de l'ordre de 50 à 100 mg de produits.
- ↳ Lorsque l'on réalise une chromatographie préparative, les solutés séparés sont désorbés de la phase stationnaire.
- ↳ On récupère délicatement la zone de phase stationnaire d'intérêt par grattage.
- ↳ La phase stationnaire ainsi récoltée est mise en contact d'un solvant ayant une très forte affinité pour cette dernière provoquant par la même la désorption des solutés.
- ↳ Les solutés désorbés sont isolés par évaporation du solvant de désorption.

## Domaine de la chromatographie planaire



## Principe de la chromatographie planaire

- ⇒ A l'aide d'un apport continu d'éluant, les composés à séparer migrent à des vitesses différentes sur le support chromatographique jusqu'à ce que le processus soit arrêté. La distance de migration de l'éluant doit être au minimum de 5 cm.
- ⇒ Le chromatogramme se lit directement sur le support chromatographique en repérant les distances de migration de chaque constituant du mélange. On se base sur le rapport frontal  $R_{F(J)}$  du soluté  $J$ :

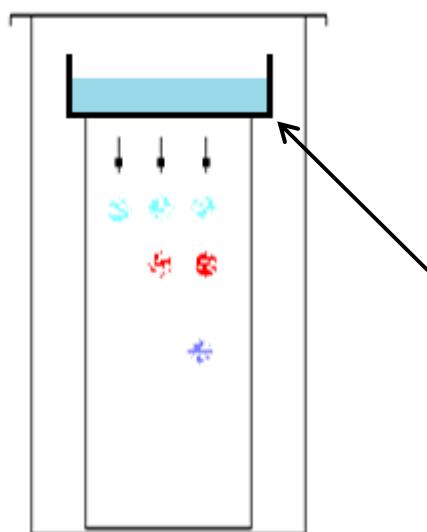


## Eluants

- ⇒ Les éluants sont les mêmes que ceux décrits pour les différents types de chromatographie en phase liquide d'élution. Le choix de l'éluant se fera en fonction de la nature de la phase stationnaire utilisée et des solutés à séparer (voir chapitres précédents).

## Distribution de l'éluant

→ La distribution de l'éluant s'effectue le plus souvent par capillarité ou par gravité. On parle de chromatographie planaire ascendante ou descendante respectivement.



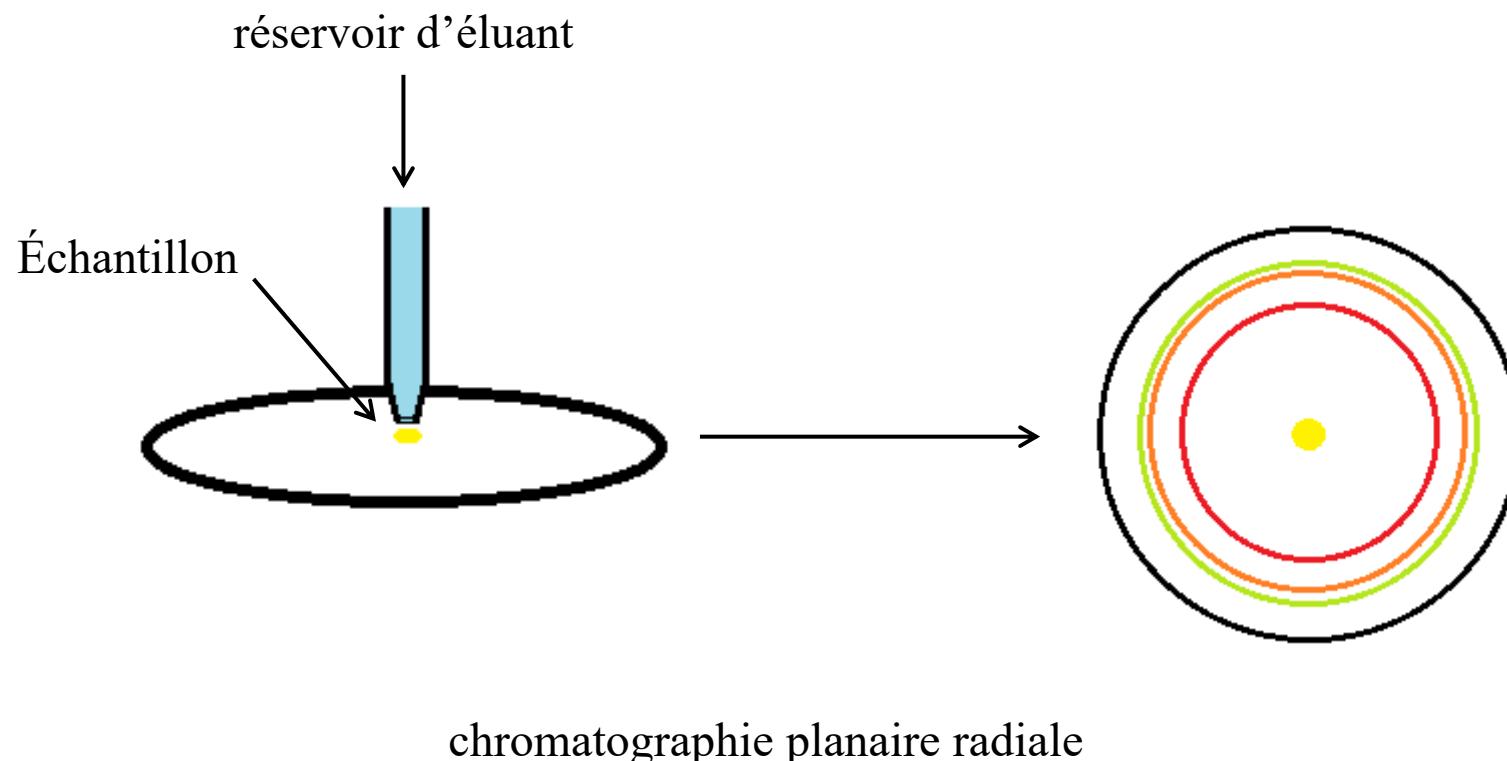
réservoir d'éluant

chromatographie planaire descendante



chromatographie planaire ascendante

- ⇒ La chromatographie peut être aussi mise en œuvre de façon radiale.
- ⇒ Dans le cas le plus commun, l'échantillon à chromatographier est déposé au centre du disque chromatographique. L'éluant est amené au centre du disque sur l'échantillon, provoquant la migration de ce dernier et la séparation de ses constituants. Le phénomène se déroule par capillarité.



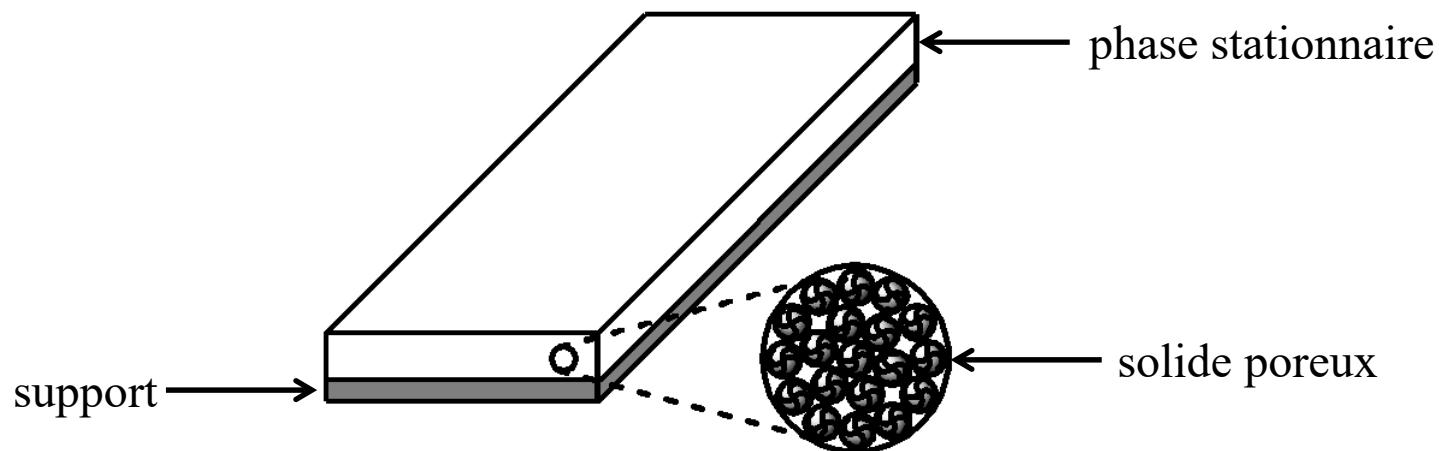
- ⇒ Dans des cas plus rares, l'échantillon est disposé sur le pourtour du disque chromatographique et l'éluant est amené lui aussi sur le bord du disque.
  - ↳ La migration s'effectue par capillarité de la périphérie du disque vers son centre.
  - ↳ Ce dispositif permet un passage plus aisé de la chromatographie analytique vers la chromatographie préparative.
- ⇒ Dans les systèmes plus performants, on utilise un système à flux forcé.
- ⇒ Pour la chromatographie planaire classique, un système de distribution de l'éluant sous pression OPLC (OverPressured Layer Chromatography) est disponible dans le commerce.
  - ↳ Le support chromatographique est placé entre une plaque métallique (en dessous) et une plaque en téflon (au dessus) pour garantir l'homogénéité de distribution de l'éluant sous pression.
  - ↳ La pression de distribution de l'éluant peut atteindre 25 bars.
- ⇒ Pour la chromatographie planaire radiale, on met en œuvre la force centrifuge pour distribuer l'éluant par mise en rotation du disque chromatographique.

## Injection

- ⇒ En chromatographie analytique, l'échantillon est déposé manuellement sous la forme d'un spot de petite taille à l'aide d'un capillaire de verre.
  - ↳ L'échantillon est préparé par dilution dans un solvant, sa concentration doit être de l'ordre de 5 mg/mL.
  - ↳ Le volume d'échantillon déposé est de l'ordre de 1 à 10  $\mu$ L, 5  $\mu$ L étant le standard.
  - ↳ Il existe dans le commerce des appareils automatiques de dépôt d'échantillons.
  - ↳ Ces appareils utilisent des capillaires de verre à usage unique pouvant délivrer des volumes allant de 0,5 à 10  $\mu$ L.
- ⇒ Pour réaliser une chromatographie préparative, l'échantillon est déposé sous la forme d'une bande à l'aide d'une pipette pasteur possédant un morceau de ouate comme pointe.
  - ↳ L'échantillon est préparé par dilution dans un solvant, sa concentration doit être la plus importante possible, à la limite de solubilité maximale.
  - ↳ Les volumes déposés sont de l'ordre de quelques mL.

## Le support chromatographique: caractéristiques physiques

- ⇒ Le support chromatographique est constitué d'une couche de phase stationnaire déposée sur un support en verre, en aluminium ou en matériaux plastiques. Pour la chromatographie préparative la phase stationnaire est exclusivement déposée sur une plaque de verre.
- ⇒ Dans le cas de la chromatographie sur papier, le support chromatographique est la phase stationnaire.



- ⇒ Le diamètre de particules de phase stationnaire est compris entre 3 et 11  $\mu\text{m}$  et le diamètre des pores varie de 6 à 10 nm. Le diamètre standard se situe à 5  $\mu\text{m}$  pour une chromatographie à haute performance et 11  $\mu\text{m}$  pour une chromatographie classique.

## Le support chromatographique: principes de rétention

- ⇒ Les principes de rétention dépendent de la nature de la phase stationnaire et sont ceux décrits aux chapitres précédents: adsorption, partage, affinité, exclusion stérique, échange d'ions.
- ⇒ Le facteur de rétention  $k'_{(J)}$  pour un soluté  $J$  s'exprime en fonction du rapport frontal:

$$k'_{(J)} = \frac{1 - R_{F(J)}}{R_{F(J)}} = K_{D(J)} \Phi_{SM}$$

- ⇒ D'un point de vue cinétique, pour une chromatographie planaire ascendante par capillarité, l'équation de Van Deemter est la suivante:

$$H_{(J)} = \frac{2 \left[ \gamma_M D_{M(J)} + \frac{(1 - R_{F(J)})}{R_{F(J)}} \times \gamma_S D_{S(J)} \right]}{y d_p} (L + z_0) + \frac{3}{2} \times \frac{\lambda d_p^{5/3} y^{1/3}}{\left(2 D_{M(J)}\right)^{1/3}} \times \frac{L^{2/3} - z_0^{2/3}}{L - z_0} + \frac{C y d_p^3}{2 D_{M(J)} (L - z_0)} \times \ln\left(\frac{L}{z_0}\right)$$

## **Le support chromatographique: éluants / phases stationnaires**

### ***Chromatographie analytique sur papier***

- ⇒ Phase stationnaire: feuille de cellulose imbibée d'eau.
- ⇒ Phase mobile: éluant organique (mélange de solvants apolaire et polaire).
- ⇒ Principe: partage des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire non miscibles.

### ***Chromatographie analytique sur couche mince en phase normale***

- ⇒ Phase stationnaire: gel de silice, d'alumine ou de silice greffé (-NH<sub>2</sub>, -CN).
- ⇒ Phase mobile: éluant organique (mélange de solvants apolaire et polaire).
- ⇒ Principe: adsorption ou partage des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire.

### ***Chromatographie analytique sur couche mince en phase inverse***

- ⇒ Phase stationnaire: gel de silice greffée par de longues chaînes alkyles C<sub>2</sub>, C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub>.
- ⇒ Phase mobile: éluant hydro-organique.

⇒ Principe: partage des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire.

### ***Chromatographie analytique d'exclusion stérique sur couche mince***

⇒ Phase stationnaire: gels organiques naturels et synthétiques.

⇒ Phase mobile: éluant aqueux ou organique (filtration sur gel ou perméation de gel respectivement).

⇒ Principe: exclusion stérique.

⇒ La chromatographie ne se fera que de façon descendante.

### ***Chromatographie analytique ionique sur couche mince***

⇒ Phase stationnaire: résines synthétiques ou matériaux naturels modifiés (cellulose modifiée –COOH ou –NH<sub>2</sub>). Echangeurs anioniques ou cationiques.

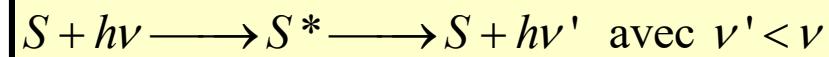
⇒ Phase mobile: éluant aqueux.

⇒ Principe: échange d'ions.

## Détection

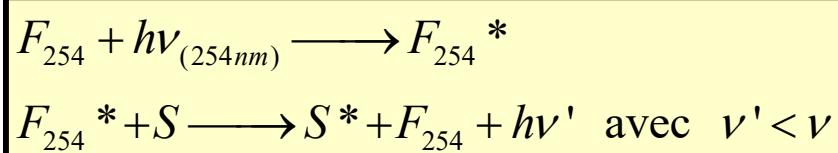
### *Révélations physiques*

- ⇒ Les solutés colorés sont directement visibles sur la plaque chromatographique.
- ⇒ La révélation de composés incolores peut s'effectuer par fluorescence ou phosphorescence directe du soluté *S* sous UV à 254 ou 366 nm:



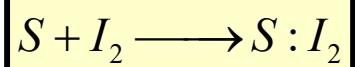
- ⇒ On peut avoir aussi recours à un piégeage de fluorescence par excitation UV à 254 nm, lorsque l'on travail avec des C.C.M.  $F_{254}$ .
  - ⇒ Cette méthode nécessite l'incorporation d'un indicateur fluorescent ( $F_{254}$ ) dans la phase stationnaire. Cette indicateur donne une fluorescence jaune-verte quand il est irradié avec la lumière UV à 254 nm.
  - ⇒ La révélation des substances se fait par piégeage de la fluorescence de la phase stationnaire, le soluté apparaît alors comme une tache sombre sur une plaque jaune-verte.

⇒ La révélation par piégeage de fluorescence avec une C.C.M.  $F_{254}$  du soluté  $S$  est la suivante:



### ***Révélations chimiques***

- ⇒ On peut avoir recours à une révélation chimique avec  $I_2$ . Un grand nombre de produits organiques forment des complexes labiles avec l'iode.
- ⇒ On place une C.C.M. dans une cuve contenant des vapeurs d'iode (produite grâce à la sublimation à température ambiante d'iode solide déposé au fond de la cuve). Les solutés apparaissent sous forme de taches brunes sur un fond jaune.
- ⇒ Le processus correspond à la formation du complexe entre  $I_2$  et le soluté  $S$ :



- ⇒ On peut avoir recours, lorsque toutes les révélations citées précédemment ne fonctionnent pas à une révélation chimique à l'aide d'une solution oxydante ( $\text{KMnO}_4$ ...).
- ↳ Cette révélation laisse apparaître une tâche brune correspondant au soluté révélé. Cette révélation par oxydation chimique est irréversible.

### **Chromatographie planaire en deux dimensions**

- ⇒ La chromatographie planaire peut s'effectuer en deux dimensions. On fait migrer les solutés avec un premier éluant puis on fait pivoter la plaque chromatographique de  $90^\circ$  pour faire migrer à nouveau les solutés avec un éluant différent.

