

1 - DEFINITION :

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une **phase mobile** (liquide ou gaz) le long d'une **phase stationnaire** (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

2 - Classification des chromatographies en fonction des mécanismes de séparation :

Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique...

2.1 - CHROMATOGRAPHIES EN PHASE LIQUIDE (CPL) :

La phase mobile est un liquide. Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue :

- La chromatographie de partage :

C'est une chromatographie **liquide-liquide**. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte.

- La chromatographie d'exclusion :

La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel.

- La chromatographie d'adsorption :

C'est une chromatographie **liquide-solide**. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire.

- La chromatographie d'adsorption en phase inverse :

C'est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.

- La chromatographie sur échangeurs d'ions :

La phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu.

- La chromatographie d'affinité :

La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser

2.2 – PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION EN PHASE INVERSÉES :

C'est une chromatographie d'adsorption liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire se distingue par son apolarité. Elle est constituée, la plupart du temps, par des silices apolaires greffées. Il existe des greffons apolaires de taille différente, de 2 à 18 atomes de carbone (C2 à C18), donc de polarités différentes.

La phase mobile est polaire et hydrophile. Les séparations sont fondées sur des interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire.

Ainsi, plus un soluté est apolaire, plus il sera retenu au niveau de la phase solide stationnaire. A l'inverse, plus un soluté est polaire, plus il sera entraîné par la phase mobile liquide.

La représentation graphique de l'élution d'un composé, exprimée en concentration en fonction du temps ou en fonction du volume de l'effluent est une courbe de distribution typiquement gaussienne. La mesure de la concentration peut s'effectuer par la mesure de l'absorbance, de la fluorescence...

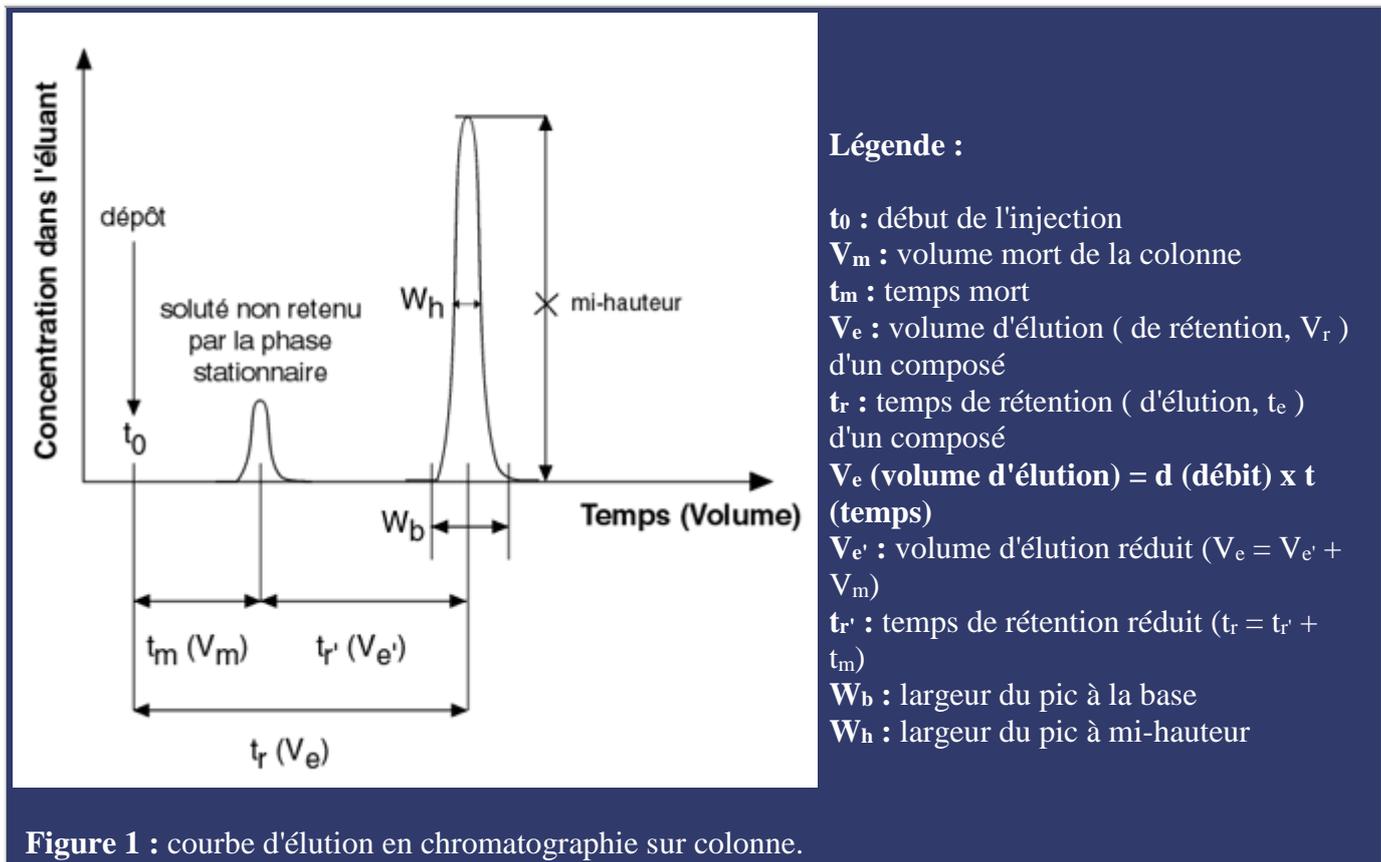


Figure 1 : courbe d'éluion en chromatographie sur colonne.

Volume d'éluion d'un composé (V_e) :

$$V_e = V_m + K \cdot V_s$$

- V_m : volume mort de la colonne
- V_s : volume de la phase stationnaire
- K : coefficient de distribution (de partage) du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile :

$$K = C_s / C_M = (V_e - V_m) / V_s$$

- C_s : concentration à l'équilibre, du soluté dans la phase stationnaire.
- C_M : concentration à l'équilibre, du soluté dans la phase mobile.

Facteur de capacité ou de rétention (K') :

$$K' = (V_e - V_m) / V_m = (t_r - t_m) / t_m$$

K' varie avec la force d'éluion du solvant : quand elle augmente, K' diminue.

Coefficient de sélectivité (α) :

$$\alpha = (V_{e2} - V_m) / (V_{e1} - V_m) = (t_{r2}' / t_{r1}') = K'2 / K'1$$

α rend compte de l'efficacité de séparation de deux pics voisins.

Aussi définit-on le coefficient de résolution

Coefficient de résolution de 2 pics (R) :

$$R = (V_{e2} - V_{e1}) / [\frac{1}{2} \cdot (W_{b1} + W_{b2})]$$

de 2 pics (R) :

- $R < 1$: mauvais.
- $1,4 < R < 1,6$: optimal.

2.3 - CHROMATOGRAPHIES EN PHASE GAZEUSE (CPG) :

La phase mobile est un gaz vecteur. On distingue dans ce cas :

- La chromatographie gaz-liquide :

C'est une chromatographie de partage. La phase stationnaire est un liquide fixé par imbibition d'un support inerte.

- La chromatographie gaz-solide :

C'est une chromatographie d'adsorption. La phase stationnaire est un solide adsorbant.

2.4 –PRINCIPE DES CHROMATOGRAPHIES EN PHASE GAZEUSE :

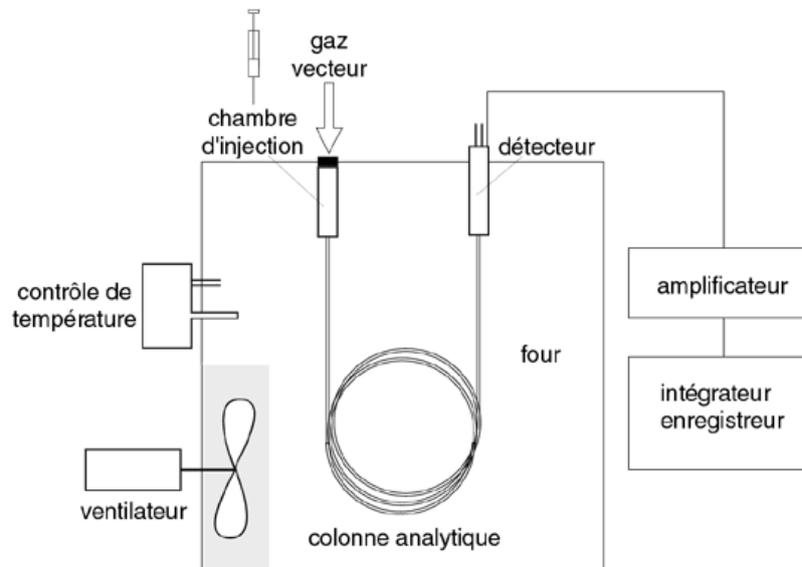


Figure 1 : schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.

Les échantillons : les échantillons liquides sont injectés dans la chambre de vaporisation à l'aide d'une microseringue. La température est telle (c'est généralement celle du four) que la vaporisation est immédiate. Les limites de sensibilité sont, selon les appareils, de l'ordre du ng et même du pg.

Le traitement de l'échantillon varie selon les substances analysées :

- lorsque les solutés sont directement volatilisables, les substances sont solubilisées dans un solvant et chromatographiées.
- lorsque les solutés ne sont pas volatils à la température du chromatographe ou bien sont décomposés à cette température, il faut les transformer en dérivés volatils stables : les acides aminés sont ainsi estérifiés par le butanol, les acides gras estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés...

La température : on adopte généralement une température légèrement supérieure au point de vaporisation du constituant le moins volatil. D'un point de vue technique, la colonne est maintenue dans un four à bain d'air thermostaté.

Les supports utilisés : le chromosorb (brique réfractaire pilée), le kieselguhr (terre de diatomées), le quartz... Le liquide stationnaire est un hydrocarbure, un silicone, un ester, un polyol, caractérisé par sa température d'utilisation et sa polarité.

Les colonnes : elles peuvent être métalliques, en plastique pour des séparations à basse température, en verre et joints Téflon. Diverses formes ont été utilisées : rectilignes, en U, en spirales (la plus répandue).

Les détecteurs : à catharomètre ; à ionisation de flammes ; à capture d'électrons ; spectrographie de masse.

En CPG d'adsorption on utilise des colonnes de 1 m de long. En CPG de partage on travaille avec des colonnes pouvant atteindre 5 m.

Chromatographie en phase gazeuse capillaire (CPGC) : C'est une chromatographie de partage gaz-liquide, utilisant une colonne capillaire (longueur 5 à 10 m, diamètre : 100 à 250 μ m), sans support inerte ; la paroi interne du capillaire sert de support. Elle permet d'obtenir un nombre de plateaux égal à 100000/m.