

1. Définition

La chromatographie est une méthode de séparation d'un mélange liquide ou gazeux en ses différents constituants. C'est également une méthode analytique qui a pour but d'identifier et de quantifier les composés d'un mélange homogène.

La chromatographie est une méthode destinée à séparer les constituants d'un mélange (ou soluté) en les distribuant entre deux phases: une phase stationnaire (fixé) et une phase mobile non miscibles.

✓ Terminologie générale de la chromatographie

Soluté: toute substance, constituant d'un mélange, séparée par chromatographie.

Phase mobile PM: le vecteur, liquide ou gazeux, qui déplace le soluté.

Phase stationnaire PS: le produit qui, par ses affinités avec les solutés, va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace.

Support: Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire.

2. Principes

Le principe de la chromatographie est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans l'échantillon analysé et obtenue par la répartition des solutés entre les phases fixe et mobile. Chaque molécule du mélange à séparer est soumise à une force de rétention (affinité du soluté pour la phase fixe), et à une force de mobilité (entraînement du soluté par la phase mobile). Le résultat de ces deux forces étant variable selon la molécule, chacune d'elle migrera à une vitesse qui lui est propre dépendant de ses caractéristiques (polaire, non polaire, ionique, etc.).

Différentes interactions peuvent entrer en jeu:

- ✓ Adsorption
- ✓ Partage
- ✓ Affinité
- ✓ Échange d'ions
- ✓ Exclusion

3. Séparation chromatographique

3.1. Séparation en chromatographie d'adsorption

En chromatographie d'adsorption, la répartition des molécules se fait entre la phase mobile et la surface de la phase stationnaire qui est solide. La phase mobile peut être un gaz (gaz vecteur) ou un liquide (solvant).

Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

3.2. Séparation en chromatographie de partage

C'est une chromatographie liquide-liquide. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte. Cette chromatographie est appelée chromatographie de partage, parce que fondée sur la répartition différentielle de chacun des solutés entre deux liquides non miscibles, l'un constituant la phase stationnaire, l'autre la phase mobile.

Les différents composés d'un mélange sont entraînés par une phase mobile. Ils se déplacent plus ou moins rapidement selon leur répartition entre les deux phases. Plus leur répartition dans la phase stationnaire est grande plus leur rétention est grande et inversement. L'affinité de chaque constituant pour la phase stationnaire dépend de sa solubilité dans cette phase.

3.3. Chromatographie ionique

La phase stationnaire est un support insoluble contenant des groupements chargés. Ceux d'un certain signe sont fixes car liés chimiquement, les autres de signe opposé sont mobiles. Ces derniers peuvent être échangés réversiblement avec d'autres ions de même charge sans aucun changement de la partie insoluble.

3.4. Chromatographie d'affinité

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est ici un substrat inerte sur lequel est greffé un "effecteur" qui présente une affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

3.5. Chromatographie d'exclusion, ou perméation de gel

Le gel-filtration est une technique chromatographique qui permet de séparer des molécules, en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise des granules de gel poreux, le diamètre des pores étant une caractéristique de chaque type de gel.

4. Classification

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon trois modalités différentes :

- Classification selon la nature physique des phases.
- Classification selon le phénomène mis en œuvre.
- Classification selon le procédé opératoire.

3.1. Classification selon la nature physique des phases

Dans ce classement :

- ✓ la phase mobile est un fluide qui peut être soit liquide soit gazeux ;
- ✓ la phase stationnaire peut être soit un solide finement pulvérisé, soit un liquide immobilisé sur une phase fixe.

La combinaison de ces différentes possibilités permet donc de distinguer quatre types de chromatographie :

- ✓ La chromatographie liquide-liquide (CLL).
- ✓ La chromatographie liquide-solide (CLS).
- ✓ La chromatographie gaz-liquide (CGL).
- ✓ La chromatographie gaz-solide (CGS).
- ✓ La chromatographie supercritique (CSF).

La CSF représente un cas intermédiaire entre CL et CG, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

3.2. Classification selon le phénomène mis en œuvre

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. On distingue ainsi:

- ✓ La chromatographie d'adsorption
- ✓ La chromatographie de partage

- ✓ La chromatographie par échange d'ions
- ✓ La chromatographie d'exclusion (chromatographie de perméation ou de filtration sur gel)

3.3. Classification selon le procédé opératoire

Selon l'immobilisation de la phase stationnaire on distingue :

- ✓ **La chromatographie sur colonne** : la phase stationnaire est contenue dans une colonne cylindrique en verre ou en métal (regroupant notamment HPLC et CPG).
- ✓ **La chromatographie sur papier** : une surface de cellulose considérée comme support maintient par imbibition une phase stationnaire liquide.
- ✓ **La chromatographie sur couche mince (CCM)** : la phase stationnaire est dans ce cas retenue sur une surface plane (verre, matière plastique ...) qui est recouverte d'une mince couche de 0,2 à 0,3 mm d'épaisseur de gel de silice, de cellulose, d'alumine ou même de grains de résines échangeuses d'ions.

5. Types de Chromatographie

5.1. Chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier est une chromatographie de partage basée sur la différence de solubilité des espèces à séparer entre deux phases :

- la phase stationnaire, ou phase fixe, est formée par l'eau liée aux molécules de cellulose du papier;
- la phase mobile, appelée éluant, est un mélange liquide de solvants qui migrent par capillarité dans le papier, entraînant les espèces déposées sur celui-ci.

L'échantillon 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 la phase stationnaire sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement.

5.2. Chromatographie sur couche mince

5.2.1. Définitions et appareillage

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une

phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

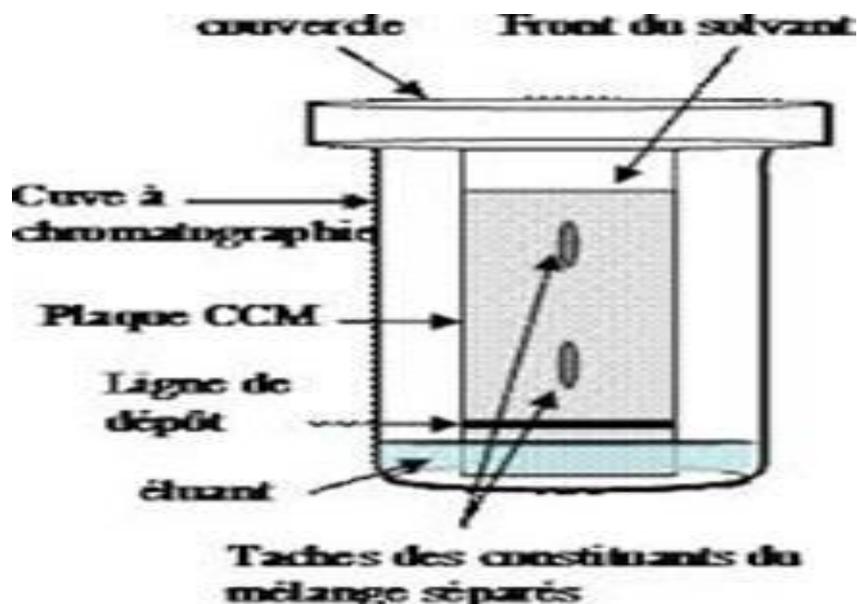
Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont:

- la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche ;
- la phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre;
- l'échantillon : environ un microlitre (μl) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant ;
- l'éluant : un solvant pur ou un mélange qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Le résultat est appelé chromatogramme.

Il y a plusieurs façons d'identifier les endroits où se trouvent les produits ainsi séparés :

- ✓ les produits sont colorés (absorbent dans le visible), rien de spécial à faire.
- ✓ les produits sont fluorescents, on peut les identifier sous une lampe ultraviolette.
- ✓ sinon, il faut utiliser un révélateur (l'iode par exemple) qui réagira chimiquement avec les produits (en les transformant) et dont le résultat sera des taches apparentes.



5.2.2. Calcul de R_f (retarding factor ou rapport frontal)

On appelle rapport frontal R_f d'une espèce chimique le quotient de la distance h parcourue par l'espèce par la distance H parcourue par l'éluant pendant le même temps.

- Pour chaque espèce chimique, le R_f dépend de la phase fixe et de l'éluant

$$R_f = \frac{\text{Hauteur de migration}}{\text{Hauteur du front de solvant}} = \text{valeur entre 0 et 1}$$

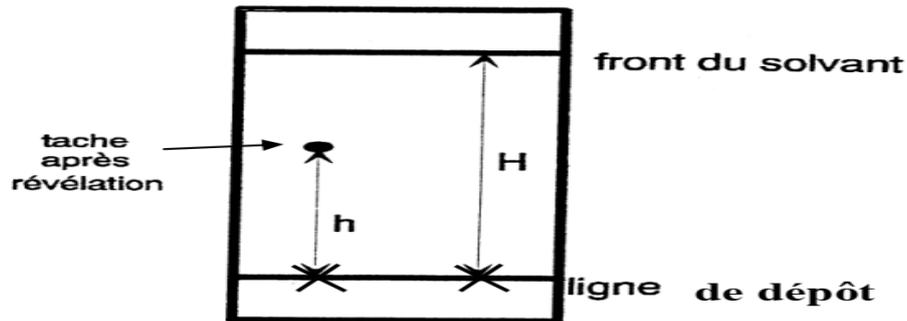


Figure 2. Calcul du rapport frontal.

5.3. Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est une chromatographie d'adsorption. La phase stationnaire est un solide, remplit une colonne de longueur et de section variables. La séparation des espèces chimiques est obtenue par l'écoulement continu d'une phase mobile, ou éluant, à travers la colonne. La séparation est basée sur des différences des vitesses d'entraînement des substances contenues dans l'échantillon. Ces vitesses dépendent de la capacité d'adsorption de l'espèce par la phase stationnaire, et de la force d'entraînement de cette espèce par l'éluant.

5.3.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'HPLC est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces et il est possible de la coupler à un spectromètre de masse.

✓ Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution. 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 stationnaire et la phase mobile.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

✓ Appareillage

Un appareil de chromatographie en phase liquide comporte quatre parties : système de pompage, injecteur, colonne et détecteur à travers lesquelles un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer.

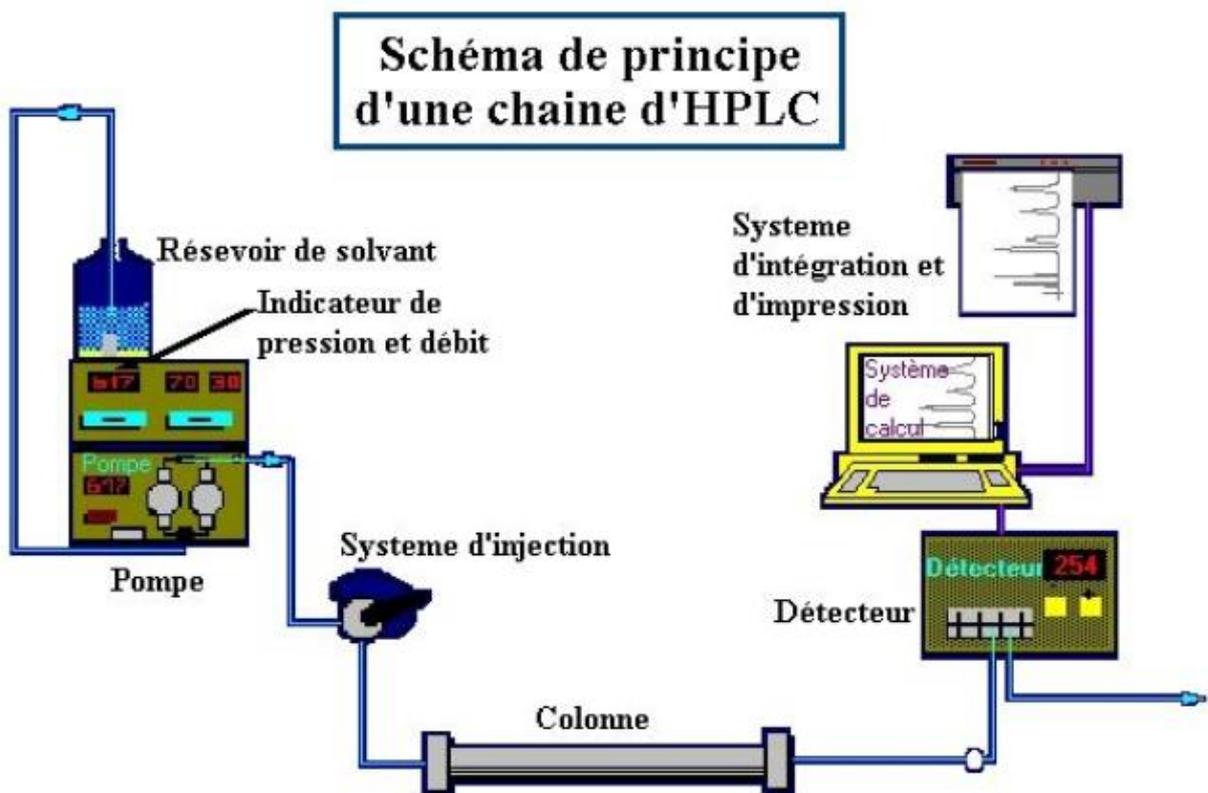


Schéma d'un appareil à chromatographie en phase liquide haute performance.

Un appareil de chromatographie en phase liquide haute performance, est constitué de :

Réservoirs de solvants : Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution.

Phase mobile : solvant pur ou mélange de solvants

la pompe : passage en continu de la phase mobile au travers de la phase stationnaire; contrôle le débit et la composition de la phase mobile

- ✓ *en mode isocratique*, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- ✓ *en mode gradient*, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

Injecteur : Introduction de l'échantillon liquide dans une boucle d'injection

Colonne chromatographique : Tube en acier contenant la phase stationnaire solide

Détecteurs: Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.



Chromatographie en phase liquide haute performance

5.2.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition, permet l'analyse et l'identification des composés volatils.

Dans cette technique la phase mobile est constituée d'un neutre dit gaz vecteur. et la phase stationnaire est un solide.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation dont les principes généraux sont les mêmes que ceux énoncés pour la chromatographie en général, c'est-à-dire fondés sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser au travers d'un substrat choisi.

Appareillage

Un appareil de CPG comprend schématiquement : gaz vecteur, un injecteur, une colonne contenue dans un four thermostaté et un détecteur relié à un intégrateur ou un ordinateur sur lequel apparaît le chromatogramme.

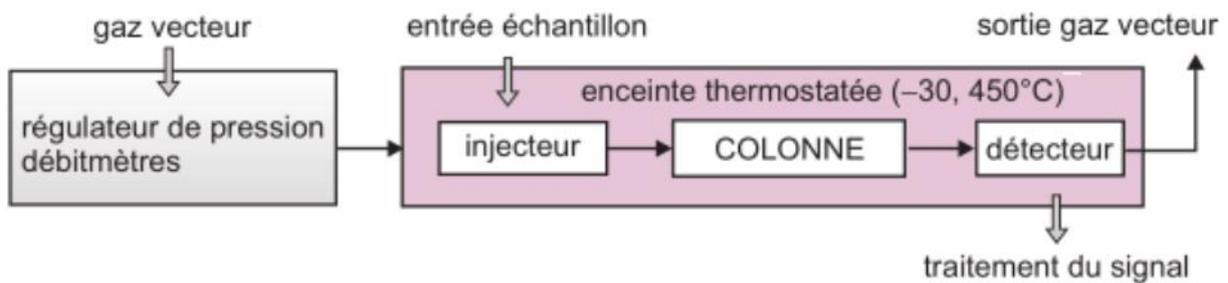
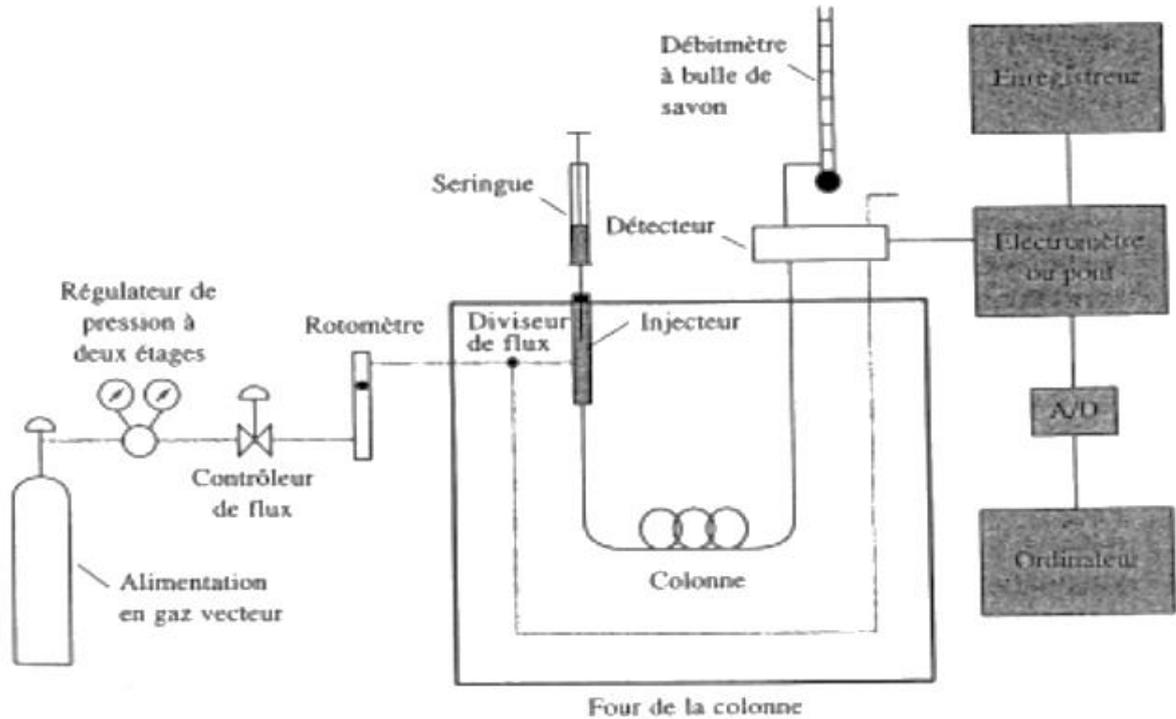


Schéma d'un appareil à chromatographie en phase gazeuse.



Un appareil de chromatographie en phase gazeuse, est constitué de :

Phase mobile : la phase mobile est un gaz inerte (N_2 , H_2 , Ar , He) contenu dans une bouteille sous pression.

Injecteur : permet d'introduire et de vaporiser l'échantillon en tête de colonne la température de l'injecteur est maintenue à $200\text{ }^\circ\text{C}$

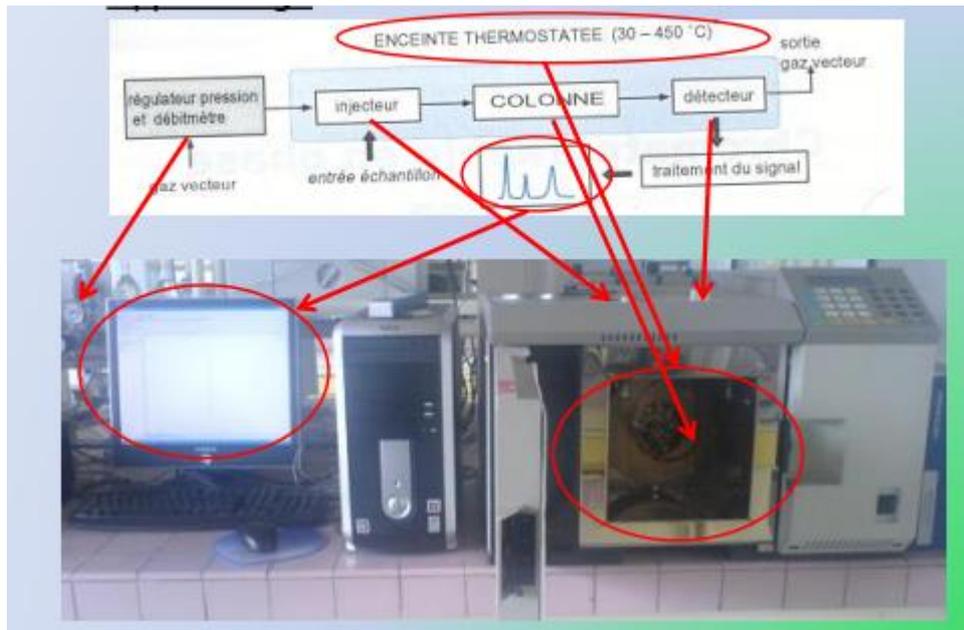
Colonne : tube renferme la phase stationnaire

Four : contient la colonne chromatographique et régule la température d'analyse

Phase stationnaire : molécules greffées sur la paroi de la colonne

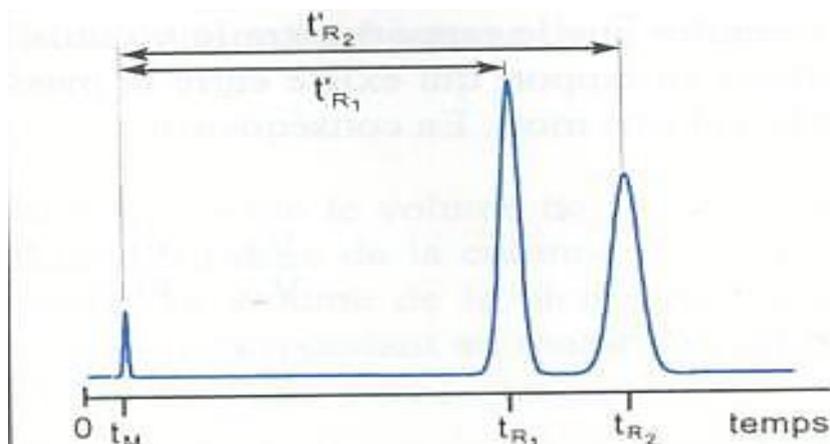
Détecteur : placé en sortie de colonne, le détecteur enregistre un signal (électrique, optique) en fonction du temps, caractéristique du passage progressif des solutés

Enregistrement du Chromatogramme



6. Analyse et traitement des signaux

6.1. Analyse qualitative



- **Le temps mort t_M** : est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)
- **Le temps de rétention t_R** : est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée.
- **Le temps de rétention réduit t_R'** : est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire

$$t_R' = t_R - t_M$$

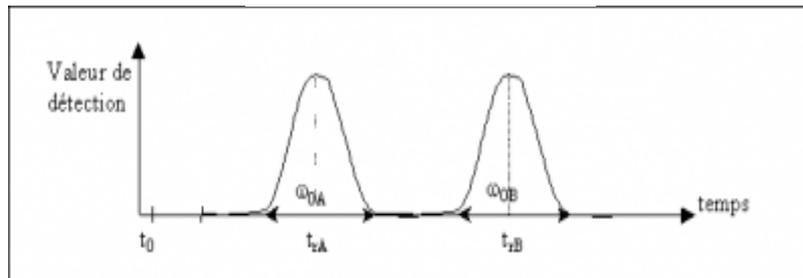
- ✓ **Débit de la phase mobile D** = volume de phase mobile circulant au travers de la colonne chromatographique par unité de temps ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)
- ✓ **Volume mort V_M** = volume de la phase mobile contenu dans la colonne chromatographique

- ✓ **Volume de rétention V_R** = volume de phase mobile nécessaire pour faire migrer le soluté au travers de la phase stationnaire

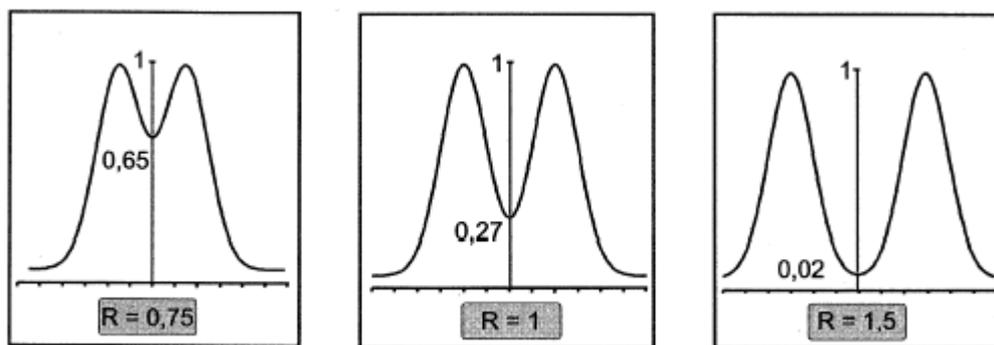
$$V_R = t_R \times D$$

- ✓ **Facteur de résolution R** entre deux solutés : permet de traduire numériquement la qualité de la séparation entre deux pics.

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_1 + \omega_2}$$



ω : largeur à la base (unité de temps)



6.2. Analyse quantitative

Relation fondamentale : la quantité massique du soluté injecté est proportionnelle à l'aire du pic donnée par le détecteur (ou mesurée sur le chromatogramme)

$$m_i = K_i * A_i$$

m_i = masse du soluté i Elle est déterminée par la connaissance du volume de solution introduit et sa concentration.

K_i = coefficient de réponse absolue du détecteur pour le soluté i (dépend du réglage du chromatographe et des conditions expérimentales)

A_i = aire du pic d'éluion du soluté i , mesurée par le détecteur ou déterminée sur le chromatogramme

- ✓ Pour déterminer la concentration massique d'un soluté i donné, qui produit un pic d'aire reproductible sur le chromatogramme, il faut :

- disposer d'une référence (= étalon) du soluté, de concentration donnée
- connaître les aires des pics d'élution dans des conditions expérimentales définies

6.2.1. Méthode de l'étalonnage externe

Il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante du produit afin de faire une courbe d'étalonnage $Aire = f(\text{masse ou concentration du produit})$, pour un volume injecté constant V .

L'injection ultérieure du même volume V de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la masse ou la concentration recherchée. Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire qu'une mesure avec l'étalon et à utiliser une règle de trois :

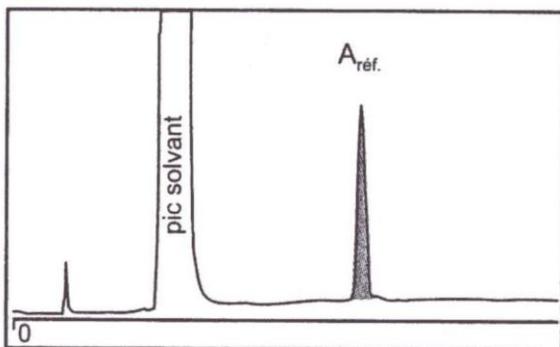
$$A_e/M_e = A_{et}/m_{et}$$

A: Aire des pics

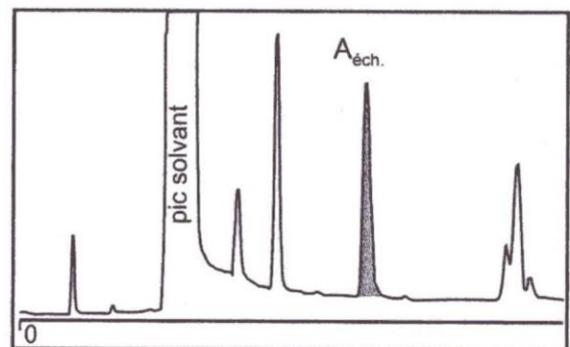
e : échantillon

et : étalon

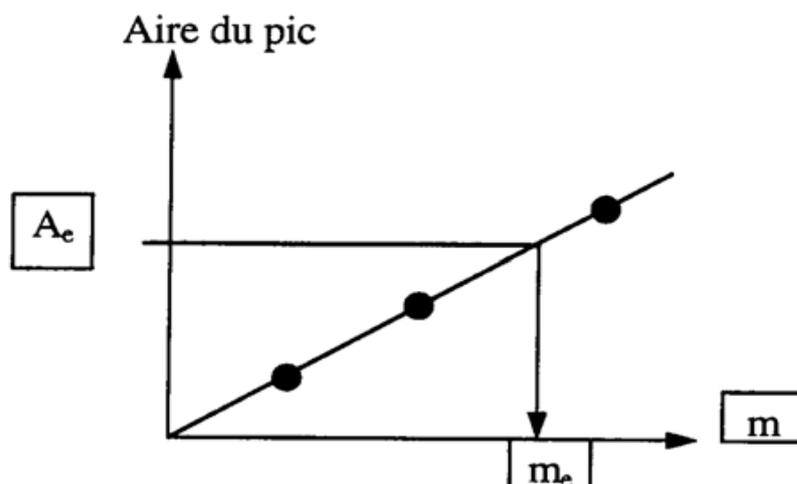
m : masse du produit remplaçable par la concentration



chromatogramme d'étalonnage ($C_{réf.}$)



chromatogramme de la solution à doser ($C_{éch.}$)



6.2.2. Méthode de l'étalonnage interne

On compare la réponse du ou des produits à analyser à celle d'un étalon interne, donc introduit dans le mélange à doser et convenablement choisi.

Une solution étalon est préparée avec le ou les produits que l'on veut doser. Les masses sont connues $m'1$, $m'2$, et ... me par l'étalon ; à ces masses correspondent les aires $A'1$, $A'2$, ..., $A'e$, sur le chromatogramme. Dans l'échantillon contenant les masses $m1$, $m2$, ... de solutés on ajoute me de l'étalon, ce qui donne les aires $A1$, $A2$, Ae .

On obtient :

$$m'1 = \alpha 1 A'1$$

$$m'2 = \alpha 2 A'2$$

$$me = \alpha e A'e$$

avec α coefficient de proportionnalité

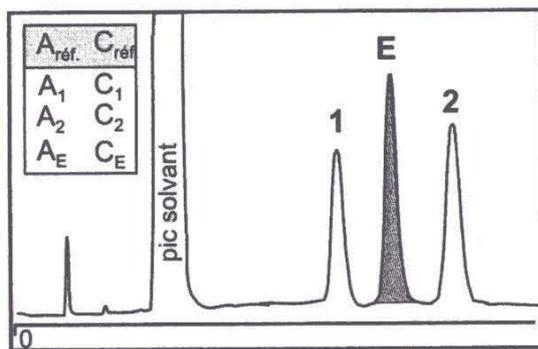
$$\text{et } k1 = (\alpha 1 / \alpha e) = (m'1 A'e / me A'1)$$

d'où la valeur $k1$ puisque toutes les données sont connues.

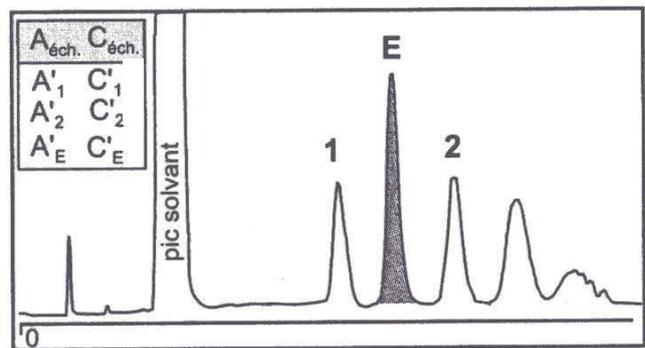
Dans l'échantillon inconnu on aura : $m1 = \alpha 1 A1$

$$me = ae Ae (m1/me) = (\alpha 1 A1 / \alpha e Ae) = k1(A1/Ae)$$

me , $k1$, $A1$, Ae sont connus.



chromatogramme d'étalonnage



chromatogramme de la solution à doser

Pour limiter les erreurs :

- Si on dispose de plusieurs solutions de concentrations connues en soluté 1 (masse $m'1$), il est préférable d'ajouter une masse me constante de soluté étalon e interne à chacune de ces solutions puis de faire leur injection successive dans les mêmes conditions expérimentales
- On tracera ensuite une droite d'étalonnage

$$m1'/me = f(A1' / Ae')$$

Remarques

- ✓ Les analyses se font dans les mêmes conditions expérimentales de température, débit et composition de la phase mobile, même colonne et phase Stat .
- Avantage : Cette méthode permet de s'affranchir de l'imprécision et la reproductibilité du volume injecté V.
- Choix de l'étalon interne ajouté :
 - il doit être pur
 - il ne doit pas exister initialement dans l'échantillon
 - son pic d'éluion doit être bien résolu, pas de chevauchement des pics d'éluion pour déterminer l'aire de chaque pic avec précision
 - son temps de rétention doit être proche de celui des solutés à doser
 - sa concentration doit être proche à celle des autres solutés pour obtenir une réponse linéaire du détecteur
 - il doit être inerte vis à vis des autres constituants de l'échantillon