

# La chromatographie

La chromatographie, est méthode d'analyse physico-chimique, qui 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 (ré) partition 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).

Le mot **chromatographie** vient du grec ancien, **chroma**, qui signifie "couleur" et **graphō**, qui signifie "j'écris".

## LES GRANDES ÉTAPES DE L'ÉVOLUTION DE LA CHROMATOGRAPHIE

**1906** - Le botaniste russe, **M. TSWETT**, publie son. livre: "*Les chromophylles dans le monde végétal et animal*", où sa méthode de séparation de pigments est décrite en détail.

**1931** - **KHUN et LEDERER** séparent à une échelle préparative les carotènes et des xanthophylles. Le long sommeil de la méthode de Tswett est rompu ; elle se développe rapidement, grâce aussi aux travaux de **BROCKMANN, KARRER, WINTERSTEIN et ZECHMEISTER.**

**1938** - **REICHSTEIN** introduit le "chromatogramme liquide" permettant des séparations de substances incolores. Cette forme de chromatographie est depuis, très largement utilisée.

**1940-1943** - **TISELIUS** met au point ses méthodes d' "analyse frontale" et de "développement par déplacement".

**1941** - **MARTIN et SYNGE** introduisent la chromatographie de partage sur gel de silice. Dorénavant, au lieu de quelques grammes de protéine, quelques milligrammes sont suffisants pour l'analyse des acides aminés neutres.

**1944** - **CONSDEN, GORDON et MARTIN** inventent la chromatographie de partage sur papier, méthode très ingénieuse, permettant d'analyser non plus quelques milligrammes, mais quelques grammes d'acides aminés, de sucres, etc.

**1940-1947** - **WILSON, DEVAULT, WEISS, GLÜCKAUF, MARTIN, SYNGE** et d'autres développent des théories détaillées de la chromatographie.

**1947** - Un groupe de chercheurs américains, dont **BOYD, MARINSKY, SPEDDING, TOMPKINS**, etc., publient des détails de leurs travaux de séparation de terres rares et de corps radioactifs sur échangeurs d'ions. Ces recherches ont permis des séparations importantes à une échelle industrielle et sont à la base

de la fabrication de certains isotopes actuellement sur le marché. La chromatographie s'est ainsi assurée une place importante en Chimie minérale.

## Principe

La chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire. Celle-ci retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon dilué selon l'intensité des forces d'interactions de faible énergie (comme les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogène, etc.) réalisées entre les différentes espèces moléculaires et la phase stationnaire.

Les différents composants de l'échantillon ont généralement une vitesse caractéristique qui permet de les séparer, voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement dépendante de la nature de la phase mobile et de la phase stationnaire.

Souvent, l'échantillon est analysé par comparaison avec des substances déjà connues dans l'échantillon ou par comparaison avec les résultats de l'analyse d'une solution-étalon (solution commerciale contenant des substances connues, à des concentrations bien connues). Ces substances servent de références et permettent d'identifier ou de doser chaque espèce par comparaison des vitesses de séparation. Il s'agit de chromatographie *analytique*.

Dans d'autres cas, on se contente de séparer les fractions, de les récolter pour les identifier par d'autres techniques: c'est la chromatographie *préparative*.

## Paramètres intervenant dans la séparation

Les paramètres physico-chimiques sur lesquels reposent les principes de séparation sont :

Paramètres	type de chromatographie	domaine d'application
la charge électrique	échange d'ions	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>protéines</u></li> <li>• <u>polypeptides</u></li> <li>• <u>acides aminés</u></li> <li>• <u>acides nucléiques</u></li> <li>• <u>sucres</u></li> </ul>
la taille et la forme (en fait, le volume)	exclusion ou gel de filtration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• protéines</li> <li>• polypeptides</li> <li>• acides nucléiques</li> <li>• sucres</li> <li>• lipides</li> </ul>
l'existence de structures particulières qui permettent d'établir des liaisons spécifiques	affinité	<ul style="list-style-type: none"> <li>• protéines</li> </ul>
la polarité et/ou l'hydrophobicité	<p>polarité de phase inversée</p> <p>ou phase reverse</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• protéines</li> <li>• polypeptides</li> <li>• acides aminés</li> <li>• acides nucléiques</li> <li>• sucres</li> <li>• acides gras</li> </ul>
	interactions hydrophobes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• protéines</li> </ul>

## Nature des phases:

### **Phase fixe:**

La phase fixe peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitées, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (chromatographie sur couche mince ou CCM)

La phase fixe peut aussi être constituée par un liquide imprégnant un support solide ou encore par une chaîne carbonée fixée sur un support (phase greffée). Ainsi en chromatographie sur papier, la phase fixe est formée par l'eau que les molécules de cellulose du papier adsorbent, alors qu'en chromatographie en phase gazeuse, elle est constituée d'un liquide peu volatil et thermiquement stable imprégnant un granulé poreux.

### **Phase mobile:**

La phase mobile est:

-soit un gaz (ex: chromatographie en phase gazeuse): la phase mobile est appelée **gaz vecteur** ou **gaz porteur**.

-soit un liquide (ex: chromatographie sur papier, couche mince ou colonne): la phase mobile est appelée **éluant**.

## **Classification des méthodes chromatographiques**

### **1. Classification selon la nature physique des phases**

- Chromatographie liquide – liquide
- Chromatographie liquide – solide
- Chromatographie gaz – liquide
- Chromatographie gaz – solide

### **2. Classification selon le phénomène chromatographique**

**Chromatographie d'adsorption**

**Chromatographie de partage,**

**Chromatographie par échange d'ions**

**Chromatographie d'exclusion diffusion ou chromatographie sur gel**

### **3. Classification selon le procédé utilisé**

**Chromatographie sur colonne**

**Chromatographie sur papier**

**Chromatographie sur couche mince (CCM)**

**Chromatographie par développement**

**Chromatographie d'éluion**

Il existe de nombreux types de chromatographie ; on peut notamment les classer selon la nature de la phase mobile :

- la chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC en anglais) ;
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC en anglais) également appelée CPV (chromatographie en phase vapeur) ;
- la chromatographie en phase liquide (CPL ou LC en anglais) ;
- la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP ou HPLC en anglais) ;

- la chromatographie en phase supercritique (CPS ou SFC en anglais).

On peut aussi les nommer selon les interactions développées par la phase stationnaire :

- la chromatographie d'adsorption/d'affinité ;
- la chromatographie de partage ;
- la chromatographie à échange d'ions ;
- la chromatographie chirale (qui est, soit de la CPG, soit de la CPL) ;
- la chromatographie d'exclusion stérique (CES ou SEC en anglais).

ou selon le support de la phase stationnaire :

- la chromatographie sur colonne (regroupant notamment HPLC et CPG) ;
- la chromatographie plane (qui recouvre chromatographie sur couche mince et chromatographie sur papier) ;

Enfin, un nouveau type de chromatographie commence à trouver des applications : la chromatographie à 2 dimensions.

## 1- La chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier est une technique de chromatographie en phase liquide. Pour effectuer une telle séparation, une petite quantité de la ou des solutions à analyser est déposée sur le bord d'une bande de papier de chromatographie. Cet échantillon est adsorbé par le papier ; ce qui signifie que les molécules interagissent avec ce dernier et qu'elles auront tendance à rester au même endroit.

Le papier est ensuite trempé dans un solvant (éluant) comme un mélange eau/éthanol et placé dans un récipient fermé. Pendant que le solvant (éluant) monte le long du papier par capillarité, il rencontre l'échantillon et l'entraîne.

Les différentes substances, constituant l'échantillon migrent à différentes vitesses selon qu'elles interagissent plus ou moins fortement avec le papier.

La chromatographie sur papier demande un certain temps (généralement plusieurs heures). Une fois l'opération terminée, généralement quand le front de solvant (éluant) est presque arrivé en haut du papier, le papier est retiré de la cuve et on laisse évaporer le solvant. Le résultat est appelé *chromatogramme*.

Le chromatogramme est utilisé pour comparaison avec d'autres analyses effectuées sur des substances connues et prises dans des conditions identiques, pour identifier les substances de l'échantillon. Les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur  $R_f$  qui peut être comparée à celles se trouvant dans les tables. Cette valeur est calculée de la façon suivante :

$$R_f = (\text{distance parcourue par l'échantillon}) / (\text{distance parcourue par le solvant})$$

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

1. les produits sont colorés, il n'y a rien de spécial à faire.
2. les produits sont fluorescents, on peut les identifier sous une lampe ultraviolette.
3. sinon, il faut utiliser un révélateur qui réagira chimiquement avec les produits (en les détruisant) et dont le résultat sera coloré.

### 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.

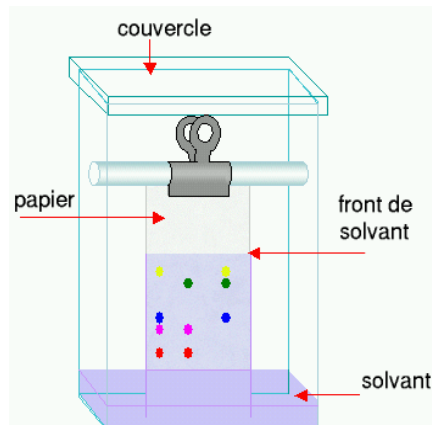


schéma d'une chromatographie sur papier

## 2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

### 2.1. Définition 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. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique ccm 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 à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.

-**l'échantillon** : environ un microlitre ( $\mu\text{l}$ ) de solution diluée ( 2 à 5 %) 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 : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

### 2.2. Principe de la technique.

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. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

### 2.3. Applications de la CCM.

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.

De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

La chromatographie sur couche mince est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne.

### 2.4. Adsorbants et plaques chromatographiques.

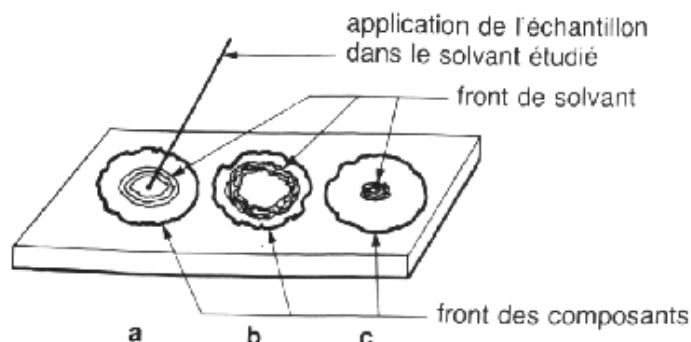
Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose.

### 2.5. Choix de l'éluant.

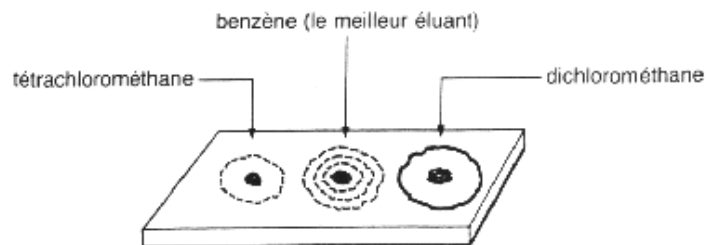
L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants.

Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est trop polaire; celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment.

Une méthode simple pour trouver l'éluant approprié consiste à préparer des solutions de l'échantillon dans différents solvants, en concentration d'environ 2 à 5% en volume. A l'aide d'une micropipette, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée d'environ 1 cm. Le meilleur éluant est celui qui, lorsqu'il a terminé sa migration, a entraîné le soluté à une distance d'environ la moitié de celle qu'il a parcourue.



Une autre méthode consiste à déposer une solution des substances à analyser en plusieurs points, séparés d'environ 2 cm. Après séchage, on applique au centre de chaque point une micropipette remplie de solvant; Après diffusion, l'éluant qui convient sépare les solutés.



Choix de l'éluant en chromatographie sur couche mince

Choix de l'éluant dans le cas d'analyses :

-D'hydrocarbures : hexane, éther de pétrole ou benzène.

-De groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique forment un éluant de polarité moyenne.

-de composés polaires : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol.

## **2.6. Dépôt de l'échantillon.**

L'échantillon est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : on emploie fréquemment le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution est déposée en un point de la plaque situé à environ 1 cm de la partie inférieure.

Il est important que le diamètre de la tache produite au moment du dépôt soit faible; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3 mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large.

L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité de la pipette sur la couche d'adsorbant en prenant soin de ne pas le détériorer.

On vérifie l'identité des composants présumés d'un échantillon, en procédant à un dépôt séparé d'une solution de chacun d'eux puis à celui de leur mélange. Ces solutions témoins permettent de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à analyser.

## **2.7. 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; on place souvent du papier filtre contre les parois de la cuve pour saturer plus rapidement la cuve en vapeurs d'éluant et éviter les effets de bords. 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.

## **2.8. Révélation.**

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes (valable également pour la chromatographie sur papier):

-directement si les substances sont colorées

-à l'aide de révélateurs si elles sont incolores afin de les transformer en taches colorées; les produits sont souvent décelés par leurs réactions fonctionnelles classiques: les acides aminés par la ninhydrine qui donne avec la plupart une couleur bleu-violet, les acides organiques par des indicateurs colorés, les sucres par le réactif de Molisch qui utilise le pouvoir réducteur des sucres. Quelques réactifs comme l'iode ou le permanganate donnent des colorations non spécifiques avec la plupart des composés organiques.

-toutes les substances ayant une absorption dans la région au-dessus de 230 nm sont étudiées sur des supports additionnés de corps fluorescents par irradiation de lumière UV à ondes courtes ( $\lambda_{\text{max}} < 254 \text{ nm}$ ). L'emploi de couches non additionnées de

produits fluorescents permet aussi la mise en évidence de beaucoup de substances dans l'UV à ondes courtes ( $\lambda_{\max} < 254 \text{ nm}$ ) ou à ondes longues ( $\lambda_{\max} > 366 \text{ nm}$ ) par suite de la fluorescence propre des composés.

Dans tous les cas, il faut noter les positions des taches colorées juste à la fin de la chromatographie en les cerclant car certains produits disparaissent avec le temps.

## 2.9. Calcul de $R_f$ (retarding factor ou rapport frontal)

### Error!

$d_j$  : distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache)

$d_s$  : distance parcourue par le front du solvant

Pour un couple éluant et support déterminé,  $R_f$  est une caractéristique de chaque soluté à la température de l'expérience.  $R_f$  est toujours indépendant de la longueur de bande utilisée.

**TD CCM** Voir le lien [exo ccm.pdf](#)

### Adsorbants:

Les adsorbants figurant dans la liste ci-dessous sont classés selon l'ordre croissant de leurs forces d'interactions avec des composés polaires.

- Papier, cellulose
- Kieselguhr, terre de diatomées
- Amidon
- Sucres
- Talc
- Carbonate de sodium
- Oxyde de magnésium
- Gel de silice
- Alumine
- Charbon activé

Le gel de silice et l'alumine sont les adsorbants les plus utilisés. En général, plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires. Il est cependant possible de traiter un adsorbant pour modifier ses capacités d'adsorption et ses propriétés: Plus la teneur en eau d'un adsorbant est faible (ce qui a pour conséquence la présence d'un plus grand nombre de sites d'adsorption pour le soluté), plus il est polaire ou actif.

### **Eluant:**

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.