

## La chromatographie

### 1— Définition

La chromatographie, 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.

**Phase stationnaire** : phase fixe soit sur la surface intérieure d'une colonne soit sur une surface plane.

**Phase mobile** : phase qui se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant les analytes. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire, mais uniquement avec les analytes.

### 2— Principe

Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la **phase stationnaire** (emprisonnée dans la colonne) et la **phase mobile** qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la **colonne**.

Plus une espèce chimique est soluble dans l'éluant et moins elle est adsorbée par la phase fixe, Plus elle est rapidement entraînée par l'éluant et plus elle migre haut.

### 3— Application

La chromatographie peut être analytique, visant à l'identification des substances présentes ou préparatifs, visant à la séparation des constituants d'un mélange. La chromatographie analytique est largement utilisée à l'échelle du laboratoire, la chromatographie préparatifs est rarement utilisée sur de grandes quantités en raison de son coût et de sa lenteur.

### 4— La révélation

La chromatographie est une technique de séparation et d'identification d'espèces chimiques présentes dans un mélange.

- Dans le cas d'espèces **colorées**, la technique de chromatographie est couplée à la spectroscopie.
- Dans le cas d'espèces **incolores** présentes dans le mélange, la révélation, effectuée après l'éluion, consiste à faire apparaître les tâches correspondant aux espèces incolores. Deux types de méthodes peuvent être utilisés :

#### 4-1 — la **révélation aux UV**

Si la plaque comporte un révélateur UV, la plaque, soumise à des rayons UV, devient fluorescente : une espèce incolore absorbant les rayons UV donne alors une tache sombre sur un fond clair.

#### 4-2- **les méthodes chimiques**

- la plaque peut être plongée dans une **solution de permanganate de potassium** : une espèce incolore qui réagit avec le permanganate donne une tache blanche ou jaune sur un fond rose.
- une autre technique de révélation peut se faire avec des **vapeurs de diiode**.

**Identification d'une espèce chimique par comparaison.**

Sur la **ligne de dépôt** tracée près du bord inférieur de la plaque, on dépose une goutte d'une espèce A et une goutte d'une espèce B (schéma N°1)

- pour une phase fixe et une phase mobile données, **à deux espèces chimiques identiques correspondent deux tâches à la même hauteur** (schéma N°2)
- pour une phase fixe et une phase mobile donnée, une espèce chimique peut être caractérisée par son **rapport frontal R<sub>f</sub>** défini par la relation :

$$R_f = \frac{h}{H}$$

**h** est la hauteur atteinte par la tâche correspondant à l'espèce.

**H** est la hauteur atteinte par le front du solvant (schéma N°3)

Pour une phase fixe et une phase mobile données, des tables répertorient les rapports frontaux de différentes espèces chimiques : deux espèces chimiques identiques auront donc le même rapport frontal.

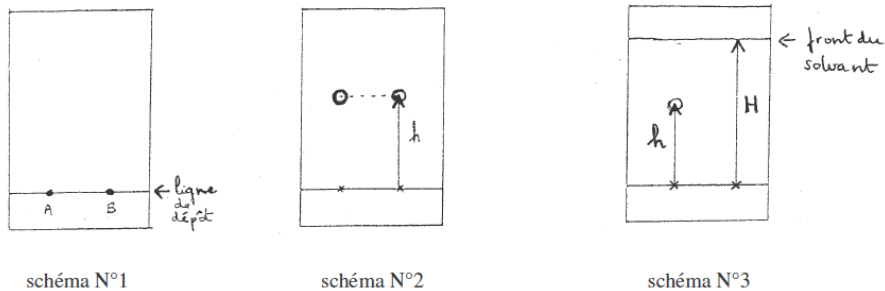


schéma N°1

schéma N°2

schéma N°3

**5— classification des méthodes chromatographiques****5-1- Classification selon la nature des phases**

Selon la nature de la phase mobile, on distingue:

- la chromatographie en phase liquide **CPL**
- la chromatographie en phase gazeuse **CPG**

Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue:

- la chromatographie gaz / solide **CGS**
- la chromatographie gaz / liquide **CGL**
- la chromatographie liquide / solide **CLS**
- la chromatographie liquide / liquide **CLL**

**5-2- Classification selon le support de la phase stationnaire**

- **la chromatographie sur colonne** (regroupant notamment HPLC et CPG) : la phase stationnaire est dans un tube étroit en verre ; la migration de l'éluant a lieu sous l'effet de la gravité et non de la capillarité

- **la chromatographie planaire** (qui recouvre CCM et chromatographie sur papier) : la phase stationnaire est sur la surface d'un support plat (CCM) ou dans une feuille de cellulose poreuse (chromatographie papier) et la phase mobile se déplace par capillarité ou par gravité.
- la **chromatographie sur papier** : la phase fixe est une bande de papier poreux.
- la **chromatographie sur couche mince (C.C.M.)** : la phase fixe est une mince couche de silice ou d'alumine finement divisée qui recouvre une plaque d'aluminium, de plastique ou de verre.

### 5-3- 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, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique.

## 6-Les techniques chromatographiques

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

### 6-1- La chromatographie d'adsorption

C'est la méthode la plus ancienne et "encore" la mieux connue. La séparation entre les molécules est fondée sur le processus répété d'adsorption et désorption par la phase stationnaire. Dans les premières études les phases stationnaires « modèles d'études » étaient la silice et la cellulose. En conséquence, les phénomènes étudiés correspondaient essentiellement à des interactions de type liaison hydrogène. D'autres phases ont été utilisées depuis avec des mécanismes d'échange impliquant des liaisons Van der Waals, hydrogène et des interactions hydrophobes.

### 6-2- La chromatographie de partage

La séparation est fondée sur les différences de solubilité des molécules à séparer entre phase mobile et phase stationnaire liquide (phase qui imprègne ou qui est greffée sur un solide inerte).

Il s'agit alors de chromatographie liquide-liquide. On multiplie ici les partages entre phases de la même façon que si l'on disposait de plusieurs milliers d'ampoules à décanter contenant deux solvants non miscibles.

### 6-3- La chromatographie d'échange d'ions

La phase stationnaire est un solide à la surface duquel se trouvent des groupements ionisés négativement ou positivement: échangeur d'ions. Un soluté ionisé de charge opposée se trouvera d'autant plus retenu que sa charge (opposée à celle de la phase stationnaire) sera plus forte.

La phase stationnaire solide est généralement poreuse et renferme dans ses pores une phase liquide qui peut jouer un rôle très important dans les séparations. On peut ainsi parler pour ce type de chromatographie de CLS, mais aussi de CLL.

### 6-4- La chromatographie d'exclusion encore qualifiée de chromatographie de perméation ou de filtration sur gel

La phase stationnaire est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine de celle des molécules à séparer : celles qui sont trop volumineuses pour pénétrer dans les pores sont exclues de la phase stationnaire

Et sont éluées les premières, en revanche les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel. Ici encore on peut parler indifféremment de CLS ou de CLL.

### 6-5- La chromatographie d'affinité

Il s'agit là d'une association entre une molécule polyfonctionnelle et une phase stationnaire comportant des sites stériquement définis et de capacité d'échange multiple. Il s'agit souvent d'un système coopératif d'interactions différentes (ionique, hydrophobe, Van der Waals hydrogène).

La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bioaffinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser trois affinités sont utilisées : affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur et antigène-anticorps.

### 7- Comparaison entre la CPG et la CPL

**Dans la CPG**, la phase mobile est un gaz vecteur. On distingue dans ce cas :

- **la CGL** qui est une chromatographie de partage. La phase stationnaire est un liquide fixé par imbibition d'un support inerte.

- **la CGS qui** est une chromatographie d'adsorption. La phase stationnaire est un solide adsorbant.

20 % environ des substances organiques connues sont justiciables de la CPG sans modification préalable de l'échantillon. La CPG présente des limitations dans trois cas :

- substances peu volatiles
- substances sensibles à une élévation même modérée de la température (la plupart des substances d'intérêt biologique)
- substances ionisées.

La CPL est souvent plus efficace que la CPG pour 3 raisons :

- en CPG il n'existe que des interactions soluté-phase stationnaire alors qu'en CPL il y a des interactions additionnelles avec la phase mobile.
- les phases stationnaires sont plus variées en CPL (échange d'ions, exclusion).
- la température est moins élevée en CPL qu'en CPG. Or les interactions moléculaires diminuent quand la température augmente.

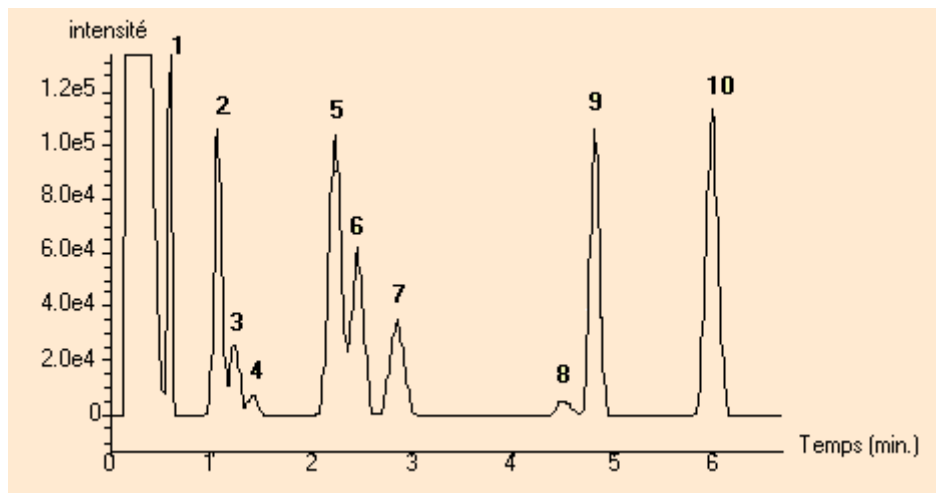
La CPL manque par contre de détecteurs aussi universels que les détecteurs à catharomètre ou à ionisation de flamme. D'autre part l'appareillage est plus complexe donc plus onéreux.

La CPG est une méthode simple, souvent plus rapide et plus sensible que la CPL. De ce fait, les deux méthodes ne sont pas concurrentes, mais complémentaires.

### 8- L'instrumentation

Les appareils de chromatographie sont constitués d'un système d'**injection** de l'échantillon, d'une **colonne**, d'un **détecteur** et d'un système d'enregistrement et/ou d'analyse des chromatogrammes.

Les analyses chromatographiques aboutissent à l'obtention d'un **chromatogramme** qui représente l'évolution d'un paramètre (signal électrique provenant du détecteur) lié à la concentration instantanée du constituant élué (ou soluté), en fonction du temps. Le chromatogramme est une représentation graphique où des **pics** émergent de la **ligne de base**, tracé obtenu en l'absence de composés.



**Exemple de chromatogramme (obtenu par CPG)**

## 9- Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

C'est une technique de séparation analytique et/ou préparatrice de molécules présentes dans un mélange. Cela permet d'adapter les méthodes chromatographiques usuelles (sur colonne) sur un montage haute pression. Le **P** du sigle, à l'origine signifiait Pression, mais lorsque la méthode a été, le P a été attribué à Performance afin de marquer cette innovation. La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance ».

- L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile) dans une colonne
- La phase stationnaire est composée de fine granulométrie (les « grains » sont de très petite taille). La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les « grains » qui la composent sont de diamètre plus petit.
- Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système.
- Le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire est diminué.
- Les pics obtenus reliés à un système d'intégration et de calcul sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas).
- Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit « gradient » ou « élution graduée » en opposition pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de la séparation.
- L'HPLC est applicable à tous les principes chromatographiques : adsorption, partage, gel-filtration, échange d'ions, affinité...