

III.1. Généralités

Le nom de chromatographie dérive du mot grec *chrôma* qui signifie *couleur*, parce que le premier scientifique à utiliser cette technique, le botaniste russe Mikhail Tswett, sépara en 1905 les pigments colorés d'une plante verte sur des colonnes remplies d'une substance adsorbante. Ce fut la première application de la chromatographie d'adsorption sur colonne. Une chromatographie utilise une **phase stationnaire**, une **phase mobile**. Le produit qui sera chromatographié sera selon ses affinités soit plutôt attiré par la phase stationnaire (et migrera), soit par la phase mobile (et ne migrera pas). La technique de séparation est donc la conséquence d'un processus complexe d'interactions favorables ou défavorables entre le produit et les deux phases.

La découverte des principaux modes de chromatographie apparaît dans la liste suivante par ordre chronologique :

- la *chromatographie sur couche mince* (CCM) (1938). (TLC : **Thin Layer Chromatography**)
- la *chromatographie sur papier* (1944).
- la *chromatographie en phase gazeuse* (CPG) (1952). (GC : **Gas Chromatography**)
- la *chromatographie sur gel* (1959).
- la *chromatographie liquide à haute pression* (CLHP) (1967). (HPLC : **High Pressure Liquid Chromatography**)

III.1.1. Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation des constituants d'un mélange basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de **deux phases**, l'une **stationnaire ou fixe**, l'autre **mobile**. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur **adsorption** et de leur **désorption** successive sur la phase stationnaire, soit de leur **solubilité différente** dans chaque phase.

On définit un coefficient de partition K :

$K = \frac{\text{masse de soluté dans la phase stationnaire}}{\text{masse de soluté dans la phase mobile}}$ par unité de volume.

Le principe de la chromatographie est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans l'échantillon analysé et obtenue par partition des solutés entre les phases fixe et mobile. Chaque molécule du mélange à séparer est soumise à une force de **rétenion**, affinité du soluté pour la phase fixe, et à une force de **mobilité**, entraînement du soluté par phase mobile (entraînement qui dépend essentiellement de la solubilité de la molécule dans la phase mobile). La résultante de ces deux forces étant variable selon la mobilité, chacune d'elle migrera à une vitesse qui lui est propre.

La chromatographie est également une méthode d'analyse quantitative permettant le dosage des constituants d'un mélange analysé.

III.1.2. Nature des phases

III.1.2.1. 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.

III.1.2.2. 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**.

III.1.3. Les différents types de chromatographie

III.1.3.1. 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 le solvant liquide, la taille, la forme, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers, la polarité, la charge électrique.

On peut classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation.

Les méthodes chromatographiques sont classées en trois modalités différentes :

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

A. Classification selon la nature des phases

- la phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz (soit encore un fluide "supercritique") ;
- la phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide.

La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- **chromatographie liquide —solide (cas de Tswett) (LSC)**
- **chromatographie liquide —liquide (LLC)**
- **chromatographie gaz —solide (GSC ou GC)**
- **chromatographie gaz —liquide (GLC ou GC)**
- **la chromatographie supercritique (SFC)**

La SFC représente un cas intermédiaire entre LC et GC, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

B. Classification selon le phénomène chromatographique

➤ Chromatographie en phase liquide

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

1. **La chromatographie d'adsorption (LSC)** (lorsque la phase stationnaire est un solide) ; c'est une chromatographie **liquide —solide**. La phase stationnaire est un **adsorbant** solide polaire.
2. **La chromatographie en phase inverse**. C'est une chromatographie **liquide —solide** dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.

3. La chromatographie de partage (LLC) c'est une chromatographie **liquide-liquide**. La phase stationnaire est un **liquide fixé** sur un support inerte ; cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides, lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).

4. La chromatographie d'exclusion-diffusion (SEC) où 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. Se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille ; appelée **tamissage moléculaire** ou **perméation de gel** (GPC).

5. La chromatographie d'affinité. La phase stationnaire est un support macromoléculaire. Chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une **bio-affinité** pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, enzyme-effecteur, antigène-anticorps).

6. La chromatographie d'échange d'ions (IEC), 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.

➤ **Chromatographie en phase gazeuse**

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

1. La chromatographie gaz-solide (GSC). C'est une chromatographie d'**adsorption**. La phase stationnaire est un **solide adsorbant**.

2. La chromatographie gaz-liquide (GLC). C'est une chromatographie de partage. La phase stationnaire est un **liquide fixé** par imbibition sur un support inerte.

C. Classifications selon les procédés utilisés (Classification des chromatographies en fonction de la technique)

1. Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :

- la chromatographie de surface. Il s'agit de la chromatographie sur **papier** dans laquelle la phase stationnaire est le papier lui-même ou un fluide supporté par le papier.
- la chromatographie sur **couche mince** : la phase stationnaire est constituée d'un gel de silice ou de cellulose, étalé sur un support inerte.
- la chromatographie sur **colonne**. On parle de colonne ouverte, ou de chromatographie à **pression ambiante** lorsque la phase stationnaire est placée dans une colonne à robinet, la phase mobile liquide percole par gravité.
- La CLHP (Chromatographie liquide haute performance) utilise une phase stationnaire très fine, les particules solides ont un diamètre pouvant descendre jusqu'à 5µm. le garnissage est tassé dans une colonne fermée, la phase mobile liquide circule sous l'effet d'une haute pression.
- la « chromatographie-éclair » ou « flash chromatographie » utilise des colonnes fermées garnies d'une phase stationnaire courante, identique à celle des colonnes ouvertes, la phase mobile circule sous pression-généralement par poussé de gaz. La « flash chromatographie » présente des pouvoirs de résolution identiques à ceux des colonnes ouvertes, c'est-à-dire très inférieurs à ceux de la CLHP, mais dans un temps beaucoup plus court.

2. Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera

- la **chromatographie par développement** (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire) ;

- la **chromatographie d'élution** (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).

Les méthodes chromatographiques, mettent en jeu un certain nombre de principes communs :

- les substances se répartissent entre deux phases non miscibles, selon un **équilibre** lié à un **coefficient de partition**, qui dépend à la fois de la nature des composés et de celle des deux phases considérées ;

- le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne une succession d'autres équilibres, ce qui se traduit par une **migration** des substances le long de la phase stationnaire ;

- la **séparation** est obtenue car chaque composé migre avec une vitesse qui lui est propre (et dépend du coefficient de partition).

Remarque : Classification selon les paramètres intervenant dans la séparation.

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

- La polarité et/ou l'hydrophobicité : polarité de phase normale ou inversée ;
- La charge électrique : échange d'ions ;
- La taille et la forme (en fait, le volume) : exclusion ou perméation de gel ;
- L'existence de structures particulières qui permettent d'établir des liaisons spécifiques : chromatographie d'affinité.

Les différents types de chromatographie :

Phase stationnaire	Principe de séparation	Caractéristiques de la phase stationnaire	Principe de la fixation et de l'élution
Liquide	Partage	Liquide fixé sur un support inerte (papier, silice...).	Distribution des composants du mélange à séparer dans les deux phases liquides selon leur coefficient de partage.
Solide	Adsorption	Adsorbant solide polaire.	Phénomène de surface : formation de liaisons spécifiques entre les composants et la surface adsorbante.
	Adsorption (phase inverse)	Molécules hydrophobes greffées sur de la silice.	Interactions hydrophobes et élution par diminution de la polarité de la phase mobile.
	Échange d'ions	Résine (polymères d'oses) porteuse de groupements chargés négativement ou positivement.	Interactions électrostatiques avec les composants de charge opposée.
	Exclusion (filtration sur gel)	Solide poreux.	Les composants de diamètre supérieur à celui des billes du support sont "exclus" et ceux de diamètre inférieur y diffusent et sont freinés.
	Affinité	support sur lequel est greffée une molécule (le ligand) spécifiquement reconnue par un des composants de l'échantillon à analyser.	Déplacement de l'équilibre de liaison [molécule - ligand greffé] en faveur de l'équilibre.

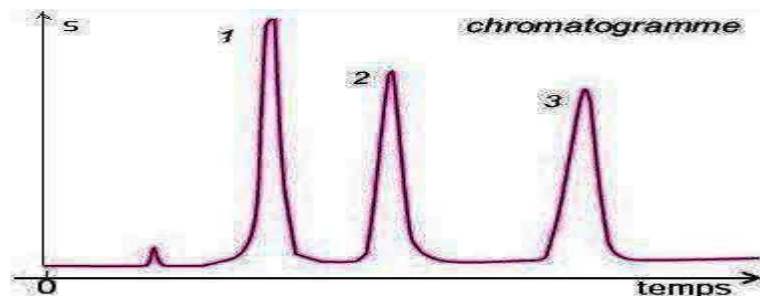
III.1.4. Paramètres d'une chromatographie sur colonne

Les définitions données ici sont valables aussi bien en chromatographie en phase gazeuse qu'en phase liquide.

III.1.4.1. Le chromatogramme

Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne :

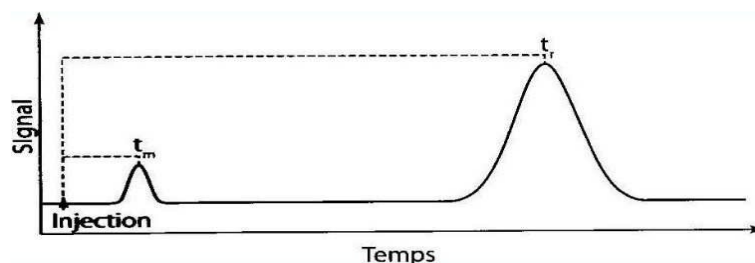
- ✓ Le temps est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée.
- ✓ La ligne de base correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. La séparation est complète quand le chromatogramme présente autant de pics chromatographiques revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser.



III.1.4.2. Notion de temps

A. Temps mort t_m (t_0) \Rightarrow Temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire de la colonne, pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne \Rightarrow temps passé dans la phase mobile.

B. Temps de rétention t_r \Rightarrow Temps mis par les molécules d'un composé à analyser pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne \Rightarrow est le temps total passé dans la colonne.



C. Temps de rétention réduit « t'_r »

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit \Rightarrow représente le temps passé dans la phase stationnaire $\Rightarrow t_r - t_0$.

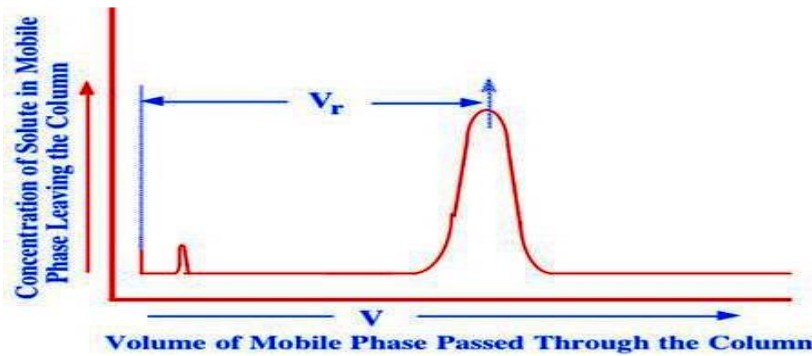
III.1.4.3. Notion de volume

A. Volume d'élution ou volume de rétention V_r

Le volume d'élution (de rétention) V_r de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne.

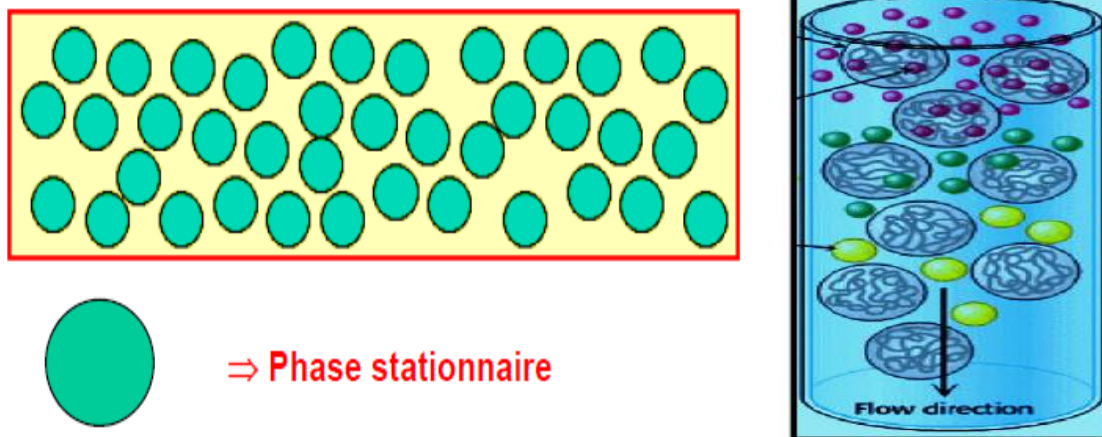
Il correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic.

$$V_r = t_r \cdot D ; D, \text{ débit de la phase mobile.}$$



B. Volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort ou V_m)

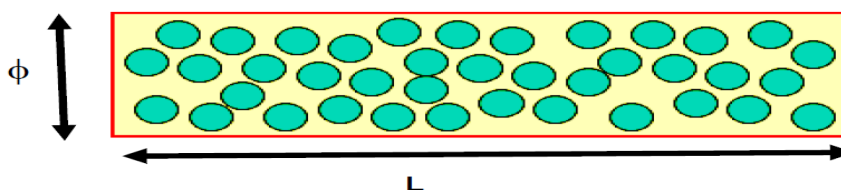
Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) V_m correspond au volume interstitiel accessible.



Il peut être calculé d'après le chromatogramme. On peut l'exprimer en fonction de t_m et du débit $D \Rightarrow V_m = t_m \cdot D$

C. Volume de la phase stationnaire

Ce volume désigné par V_s n'apparaît pas sur le chromatogramme. On le calcule en retranchant du volume total interne de la colonne V_i et le volume mort de la phase mobile (V_0).



L = longueur de la colonne

Φ = diamètre interne de la colonne

- Volume total de la colonne

$$V_i = 1/4 L \pi \Phi^2 = V_s + V_m$$

III.1.4.4. Notion de concentration

Toutes les séparations chromatographiques sont basées sur les différences de répartition des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire.

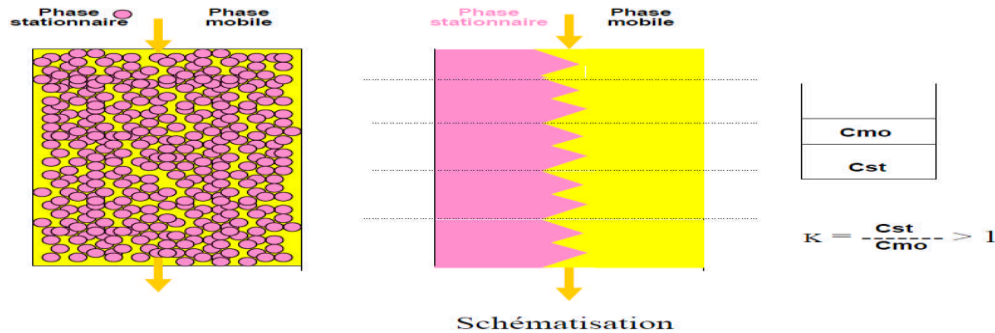
Pour le soluté A, cet équilibre est décrit par l'équation :



La constante d'équilibre de cette réaction est appelée constante de distribution, rapport de distribution, coefficient de distribution ou encore coefficient de partages elle est définie par la relation :

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

- ✓ CS = concentration de l'analyte dans la phase stationnaire.
- ✓ CM = concentration de l'analyte dans la phase mobile.



III.1.5. Analyse quantitative par chromatographie

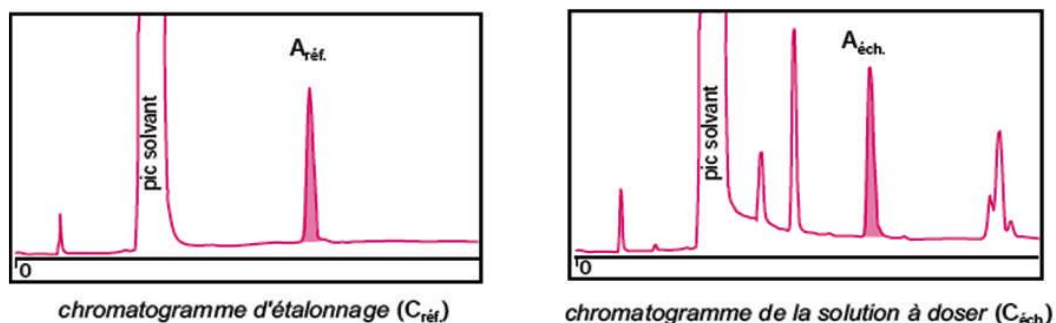
Pour calculer la concentration massique d'un composé responsable d'un pic sur le chromatogramme il faut réunir deux conditions :

- disposer d'un échantillon authentique du composé que l'on veut doser, à usage de référence, pour déterminer la sensibilité du détecteur à son égard.
- disposer d'un moyen logiciel ou autre pour connaître soit les hauteurs soit les aires des différents pics d'élution d'intérêt.

III.1.5.1. Étalonnage à l'aide de solutions connues (Étalonnage externe)

Le procédé repose sur la comparaison de deux chromatogrammes obtenus successivement sans changer les conditions de réglage de l'appareil :

- ✓ Le premier est un chromatogramme de référence acquis à partir des solutions étalons dont la composition est proche de la solution inconnue.
- ✓ Le second résulte de l'injection d'un volume identique V de l'échantillon en solution, contenant le composé à doser.



À partir des chromatogrammes des solutions étalons, on établit un graphique des hauteurs des pics ou de leurs aires en fonction de la concentration.

- La fonction ainsi obtenue doit être une droite qui passe par l'origine.
- Puisque les volumes injectés sont égaux \Rightarrow proportionnalité entre les aires, les hauteurs qui dépendent des masses injectées, et les concentrations correspondantes.