

1 Principe général

1.1 Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités d'un ou des composé(s) avec la phase fixe et mobile.

L'échantillon (constitué de différents composés) est entraîné par la phase mobile au travers de la phase fixe qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène.

Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une ou pour l'autre des deux phases. Il en résulte une différence de vitesse de progression des composés. Ceci permet de les séparer les uns des autres voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement dépendante de la phase mobile et fixe.

1.2 Les différents éléments d'une chromatographie

1.2.1 Les phases mobile et fixe

La chromatographie comporte deux phases principales :

- Phase fixe : phase qui ne se déplace pas pendant la séparation. Elle peut être sous forme solide (chromatographie sur colonne ou sur couche mince) ou liquide (chromatographie liquide sur colonne). Les composés de l'échantillon qui ont une forte affinité avec la phase fixe sont retenus par la phase fixe.
- Phase mobile : phase qui se déplace à travers la phase fixe. Elle peut être un liquide (chromatographie liquide sur colonne) ou un gaz (chromatographie gazeuse). Les composés de l'échantillon qui ont une forte affinité avec la phase mobile sont transportés par la phase mobile.

1.2.2 La colonne

La colonne est l'élément majeur de la chromatographie. La colonne est constituée de la phase fixe et est traversé par un débit continu de phase mobile.

Elle se présente sous la forme d'un tube d'une dizaine de centimètres en acier d'un diamètre de 2 à 5 mm. Cependant des colonnes capillaires sont de plus en plus utilisées (diamètre intérieur = 1 mm)

Différents types de colonne

Colonne tube :

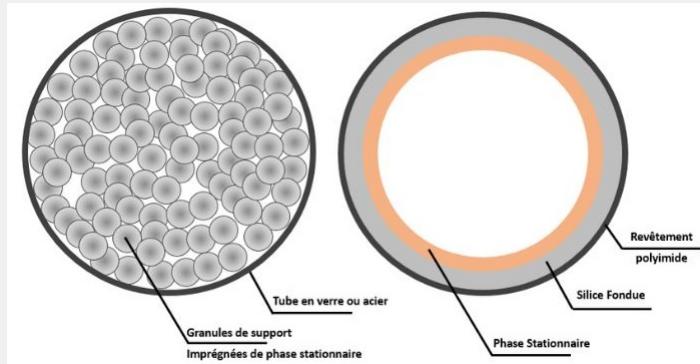


Colonne capillaire :



Les tubes des colonnes peuvent être garnis (billes de silice recouvertes d'un gel) ou capillaires (tube de silice fondu renforcée par un revêtement de polyimide dont les parois sont recouvertes d'un gel). Une meilleure séparation est obtenue avec une colonne capillaire.

Vue en coupe d'une colonne remplie (à gauche) et d'une colonne capillaire (à droite)



1.2.3 Le détecteur

Le détecteur permet de mettre en évidence le passage des différents composés séparés par la colonne. C'est un élément essentiel d'un système de chromatographie. Le détecteur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

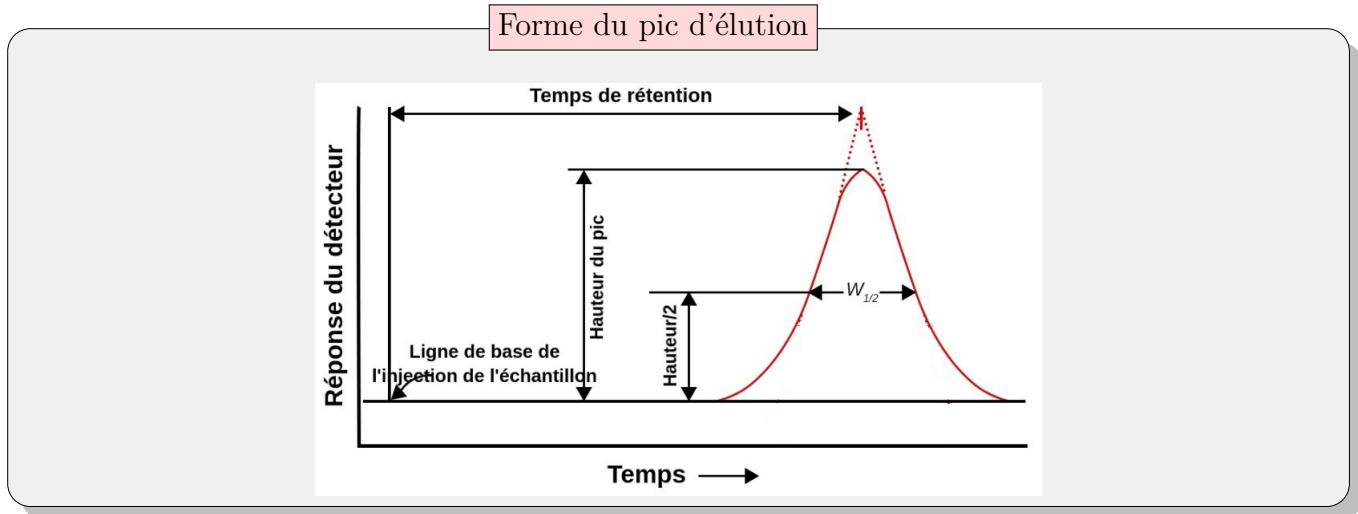
La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes :

- détecteur UV-Visible (spectromètre UV-Visible) : il mesure l'absorbance des composés dans l'ultraviolet ou le visible. Il est utile pour analyser les composés qui ont une forte absorption des UV, tels que les composés aromatiques et certains composés inorganiques.
- détecteur IR : il mesure l'absorbance d'une substance dans l'infrarouge et permet l'acquisition du spectre IR des composés séparés par chromatographie.
- détecteur à fluorescence : il est utilisé pour analyser le spectre de fluorescence émis par des composés fluorescents. Il mesure la fluorescence obtenue à une ou à plusieurs longueurs d'onde.
- détecteur à spectromètre de masse : On réalise l'ionisation et la fragmentation des composés chimiques isolés à la sortie de la colonne et leurs rapports masse/charge sont calculés. Il en résulte un spectre de masse qui peut être utilisé pour identifier les composés chimiques et calculer leur concentration.

1.2.4 Le pic d'élution

Le pic d'élution correspond à la représentation graphique de la détection d'un composé au cours du temps lors de son passage à travers la colonne chromatographique. Il est la représentation graphique de la réponse du détecteur.

Le pic d'élution est la courbe observée sur un chromatogramme. Sur le chromatogramme, le temps est en abscisse et l'intensité du signal est en ordonnée. La ligne de base du chromatogramme correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. La séparation est complète quand le chromatogramme présente autant de pics d'élution revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser.



Les caractéristiques du pic d'élution sont les suivantes :

- Temps de rétention : temps au sommet du pic, caractéristique du composé.
- Hauteur et aire du pic : proportionnelles à la quantité de composé détectée.
- Largeur du pic : renseigne sur l'efficacité de la séparation (plus il est étroit, meilleure est la séparation).
- Symétrie : un pic idéal est symétrique (forme de cloche), un pic asymétrique peut indiquer un problème (interactions résiduelles, surcharge, etc.).

Sur un chromatogramme, chaque pic d'élution correspond à un composé différent, séparé selon ses interactions avec la phase fixe et sa solubilité dans la phase mobile.

2 Les différents types de chromatographie

Les techniques chromatographiques peuvent être classées de trois manières différentes :

- la classification est basée sur la nature de phase mobile : chromatographie en phase gazeuse, chromatographie en phase liquide ...
- la classification est basée sur la nature du support de la phase stationnaire : chromatographie sur surface, chromatographie sur colonne.
- la classification est basée sur les processus chimiques ou physiques qui isolent les composants de l'échantillon : chromatographie d'adsorption, chromatographie de partage, chromatographie d'affinité, chromatographie d'exclusion.

2.1 La chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption est basée sur le partage des composants entre l'adsorbant solide de la phase fixe et la phase mobile. Chacun des composés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile. Il en résulte une migration différente des composés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

La séparation est basée sur les interactions entre chaque composé et la phase fixe. Cette interaction dépend essentiellement de la polarité des composés.

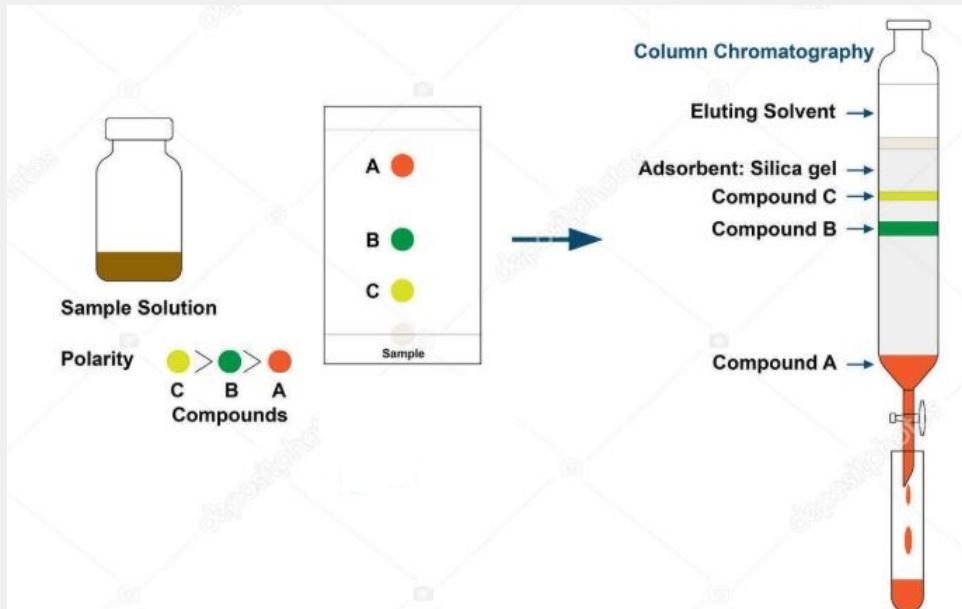
Exemple : Chromatographie sur colonne avec silice

- Un composé non polaire (comme l'hexane) traverse rapidement la silice polaire.
- Un composé polaire (comme l'alcool) reste adsorbé plus longtemps sur la silice polaire.

La phase fixe est un solide adsorbant (silice, alumine) et la phase mobile est un liquide ou un gaz qui traverse la phase fixe.

Les molécules du mélange sont adsorbées plus ou moins fortement sur la surface du solide selon leurs propriétés (polarité, liaisons hydrogène, etc.). Les composés qui ont une faible affinité avec le solide sont élués plus rapidement. Ceux qui ont une forte affinité sont retenus plus longtemps.

Chromatographie sur colonne et chromatographie sur couche mince



2.2 La chromatographie de partage

Dans le cas d'une chromatographie de partage, la phase fixe et la phase mobile sont liquides.

Elle est basée sur la différence de solubilité du composé dans la phase mobile et la phase fixe. Le composé se distribue selon le coefficient de partage K

Expression du coefficient de partage

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

avec C_s la concentration du composé dans la phases fixe et C_m la concentration du composé dans la phases mobile

Pour séparer deux constituants, il faut qu'ils aient des coefficients de partage différents. Et plus le composé est soluble dans la phase mobile, plus il migre vite.

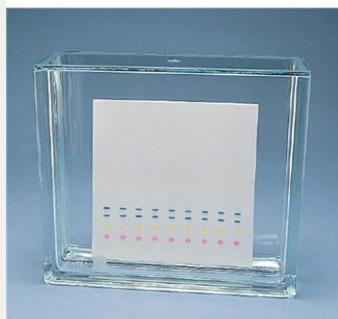
Remarque : Les deux phases fixe et mobile sont non miscibles.

Exemple : Chromatographie sur papier

Dans une chromatographie sur papier :

- La phase fixe est l'eau fixée dans les fibres du papier.
- La phase mobile est un solvant organique (butanol, ...).
- Les composés hydrophiles restent proches de l'eau (bas du papier).
- Les composés lipophiles migrent avec le solvant (haut du papier).

Chromatographie sur papier



2.3 La chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité repose sur une interaction spécifique entre une molécule cible (le composé) et un ligand fixé sur une phase fixe.

C'est une technique très sélective, utilisée notamment pour purifier protéines, enzymes, anticorps, hormones, etc.

La phase fixe est un solide (souvent une résine ou un gel) sur lequel est greffé un ligand spécifique (substrat, anticorps, ion métallique) et la phase mobile est une solution contenant un mélange de biomolécules.

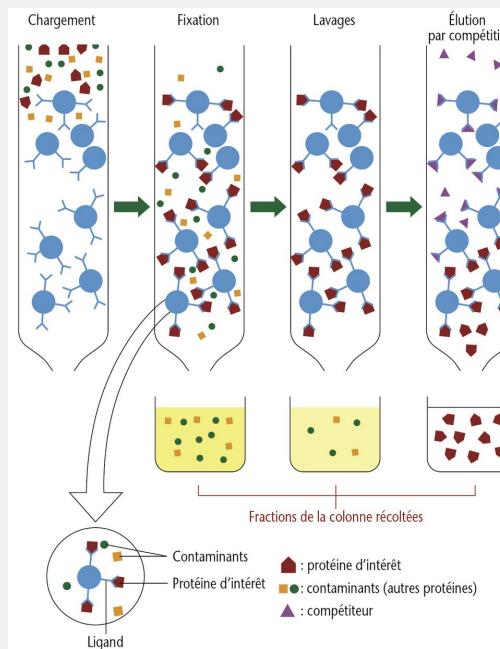
Seule la molécule ayant une affinité spécifique pour le ligand se fixe à la colonne. Les autres composants du mélange sont éliminés (lavés) car ils ne se lient pas.

La molécule d'intérêt est ensuite élueée en changeant les conditions (pH, force ionique, ajout d'un compétiteur ...).

Exemple : Purification d'une protéine avec une étiquette poly-histidine

- La colonne contient des ions Ni^{2+} fixés à un support.
- Les protéines poly-histidine se fixent aux ions nickel.
- On les élue ensuite avec de l'imidazole, qui entre en compétition.

Principe de la chromatographie d'affinité



2.4 La chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion permet de séparer les molécules selon leur taille (et parfois leur forme), sans interaction chimique entre les composés et la phase fixe. Le critère de séparation est la taille moléculaire (ou la masse moléculaire).

La phase fixe est une colonne remplie de billes de gel poreuses. Ces billes contiennent des pores de taille définie. La phase mobile est une solution contenant un mélange de molécules de différentes tailles.

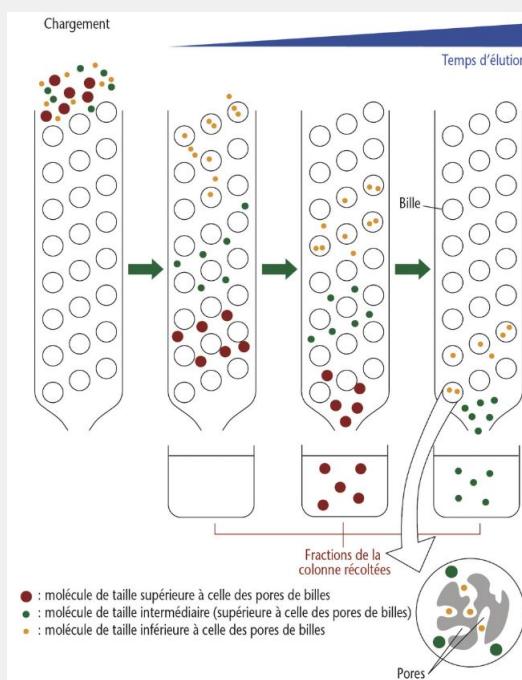
Les grosses molécules ne pénètrent pas ou peu dans les pores donc elles passent rapidement à travers la colonne. Les petites molécules entrent dans les pores donc elles prennent un chemin plus long et leur élution est plus lente.

Les molécules sont éluées dans l'ordre décroissant de taille : D'abord les grosses molécules, ensuite les petites molécules.

Exemples d'utilisation :

- Séparation de protéines ou de polymères selon leur masse moléculaire.
- Détermination de la masse moléculaire d'une molécule inconnue.

Principe de la chromatographie d'exclusion



3 Étude de différentes chromatographies

3.1 La chromatographie sur couche mince (CCM)

3.1.1 Principe

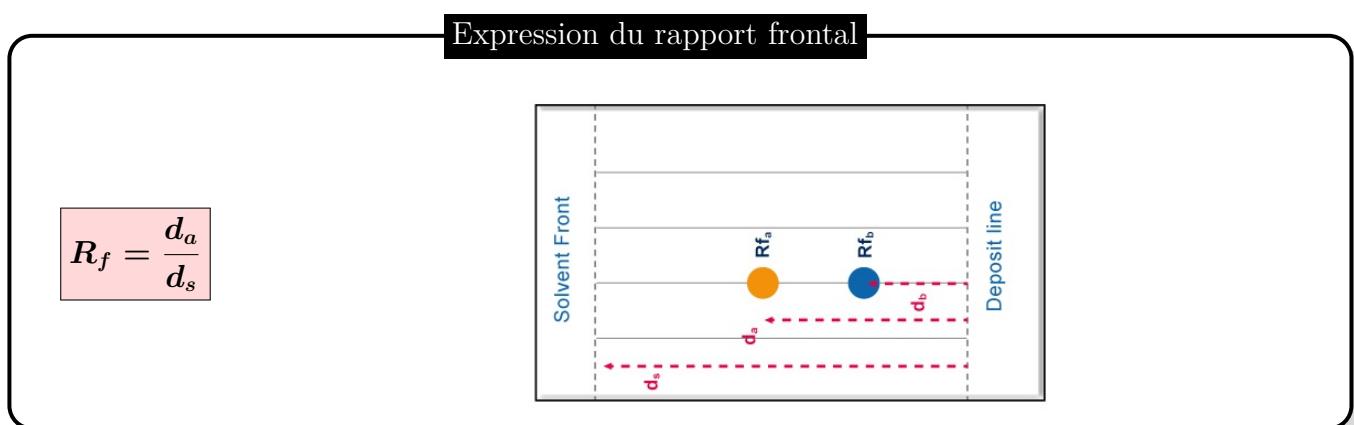
- La phase fixe est un solide, généralement de la silice ou de l'alumine, étalé en couche mince sur une plaque en matière plastique ou en aluminium.
- La phase mobile ou éluant est un liquide qui monte par capillarité, entraînant les composés déposés au bas de la plaque.

- La séparation est basée sur la différence de vitesse de déplacement des espèces, cette vitesse dépendant de la capacité d'adsorption de l'espèce par la phase fixe et de la force d'entraînement de cette espèce par l'éluant.
- Après migration, les taches incolores du chromatogramme doivent être révélées : c'est la détection. Plusieurs méthodes sont possibles suivant la nature des espèces :
 - Révélation aux UV
 - Révélation à l'aide de réactifs adaptés permettant d'obtenir des taches colorées (permanaganate de potassium, vapeur de diode).

3.1.2 Exploitation du résultat d'une CCM

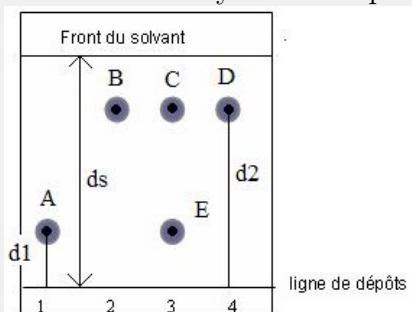
La position finale d_a la tache est caractéristique de la molécule. On lui attribue une valeur, le R_f de Retention factor en anglais qui a été fort habilement traduit comme rapport frontal.

Le rapport frontal (ou facteur de rétention) R_f est défini comme le rapport de la distance parcourue par le composé (d_a) sur la distance parcourue par l'éluant (d_s).



Exemple : Interprétation d'une CCM

On réalise la synthèse du paracétamol à partir de 4-aminophénol. On réalise la CCM suivante :



- Dépôt 1 : 4-aminophénol de référence
- Dépôt 2 : paracétamol de référence
- Dépôt 3 : produit brut
- Dépôt 4 : produit pur

- Calcul des rapports frontaux :

$$R_f(A) = R_f(E) = \frac{d_1}{d_s} = \frac{1}{4,2} = 0,24$$

$$R_f(B) = R_f(C) = R_f(D) = \frac{d_2}{d_s} = \frac{3,2}{4,2} = 0,76$$

- Dépôt 3 produit brut : Il y a deux taches donc le produit brut contiendrait à priori deux composés. Les deux taches ont pour rapports frontaux les rapports frontaux du 4-aminophénol et du paracétamol donc le produit brut contient du 4-aminophénol et du paracétamol.
- Dépôt 4 produit pur : Il y a une tache donc le produit pur ne contiendrait à priori qu'un composé. La tache a le même rapport frontal que celui du paracétamol donc le produit pur ne contient que du paracétamol.

3.2 La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

3.2.1 Principe

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation et d'analyse de composés volatils, basée sur leur répartition entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire fixée dans une colonne.

La phase mobile est un gaz inerte (hélium, diazote ou dihydrogène) qui transporte les composés à travers la colonne. La phase stationnaire est un liquide ou un polymère fixé sur un support solide à l'intérieur d'une colonne (souvent en silice).

Le mélange à analyser est vaporisé et injecté dans la colonne. Chaque composé interagit différemment avec la phase stationnaire :

- Ceux qui interagissent faiblement avec la phase fixe sont entraînés plus rapidement par le gaz.
- Ceux qui interagissent fortement avec la phase fixe avancent plus lentement.

À la sortie de la colonne, un détecteur mesure la quantité de chaque composé séparé.

Exemples d'applications :

- Analyse des parfums, hydrocarbures, solvants organiques.
- Contrôle qualité en chimie, pétrochimie, agroalimentaire.
- Détection de substances dans les échantillons biologiques ou environnementaux.

3.2.2 Exploitation du résultat d'une CPG

L'exploitation d'un chromatogramme de CPG (chromatographie en phase gazeuse) permet d'identifier et quantifier les composés d'un mélange.

Un chromatogramme est un graphique avec sur l'axe des abscisses, le temps de rétention (en minutes) et sur l'axe des ordonnées, l'intensité du signal.

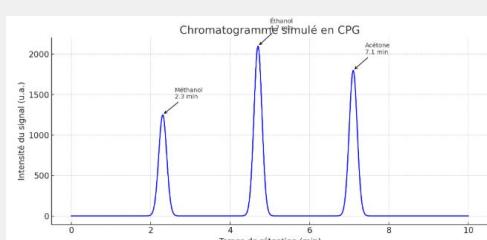
Chaque pic correspond à un composé séparé.

Le chromatogramme permet :

- une identification des composés (qualitative) : Chaque composé sort à un temps caractéristique, appelé temps de rétention. Pour identifier les pics, on les compare aux temps de rétention de standards connus analysés dans les mêmes conditions. (Si un standard de méthanol sort à 2,3 min, un pic inconnu à 2,3 min peut être identifié comme du méthanol.)
- une quantification des composés (quantitative) : La surface sous chaque pic est proportionnelle à la quantité de composé injectée. On peut établir une courbe d'étalonnage (courbe de la surface en fonction de la concentration) avec des standards pour déterminer la concentration des échantillons inconnus.

Exemple : Interprétation d'un chromatogramme d'une CPG

On réalise la chromatographie en phase gazeuse d'un mélange :



- Chaque pic correspond à un composé reconnu par son temps de rétention (comparé à un standard). On met donc en évidence trois composés dans ce mélange.
- Le pic d'éthanol est le plus grand, indiquant que c'est le composé le plus abondant dans le mélange.
- Le pic du méthanol est le plus petit, indiquant que c'est le composé le moins abondant dans le mélange.
- Les pics sont nets et bien résolus : pas de chevauchement donc la séparation est efficace.

3.3 La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

3.3.1 Principe

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une technique de séparation, qui utilise une pompe à haute pression pour faire passer la phase mobile à travers une colonne remplie de phase fixe.

Elle permet de séparer, identifier et quantifier des substances présentes dans un mélange, même en très faibles quantités.

La phase mobile est un liquide (eau, méthanol, acetonitrile ...) qui entraîne les composés du mélange. La phase fixe est un solide (généralement silice modifiée) placée dans une colonne à haute pression. Cette phase fixe peut être polaire ou apolaire, selon le type de séparation (phase normale ou inverse).

Une pompe haute pression introduit la phase mobile dans la colonne à une pression allant de 50 à 400 bars. Un injecteur permet d'introduire une petite quantité du mélange à analyser dans le système. Ensuite un détecteur mesure la sortie des composés permettant d'obtenir le chromatogramme. Ce chromatogramme est le résultat de l'analyse c'est à dire le graphique des intensités de détection en fonction du temps.

Un composé qui interagit fortement avec la phase fixe met plus de temps à sortir de la colonne (temps de rétention élevé). Et un composé qui reste dans la phase mobile sort plus rapidement de la colonne.

Exemples d'applications :

- Analyse de médicaments, additifs alimentaires, pesticides, protéines, acides aminés, etc.
- Contrôle qualité pharmaceutique.
- Analyse en biochimie et chimie analytique.

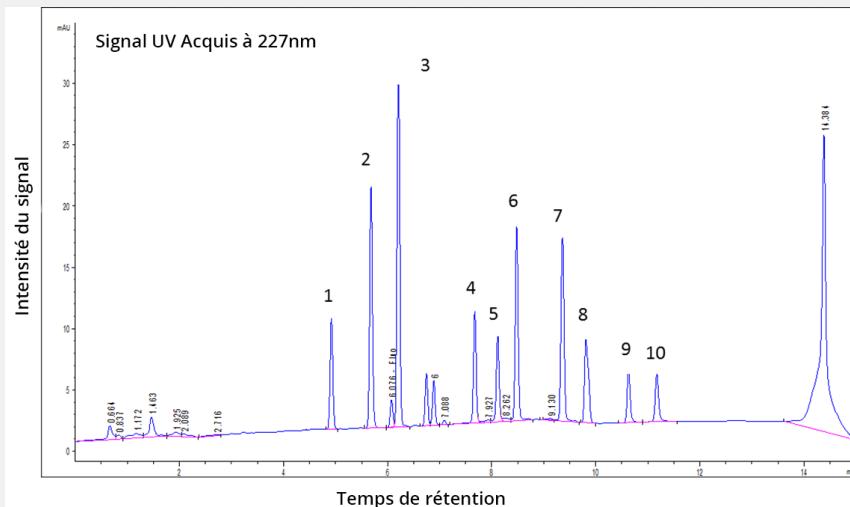
3.3.2 Exploitation du résultat d'une HPLC

Même si le chromatogramme d'une HPCL peut être légèrement différent de celui d'une CPG, l'analyse du chromatogramme d'une HPLC est semblable à celui d'une CPG.

Le chromatogramme permet :

- une identification des composés (qualitative)
- une quantification des composés (quantitative)

Exemple : Chromatogramme d'une HPLC



4 La chromatographie sur résine échangeuse d'ions

4.1 Le principe

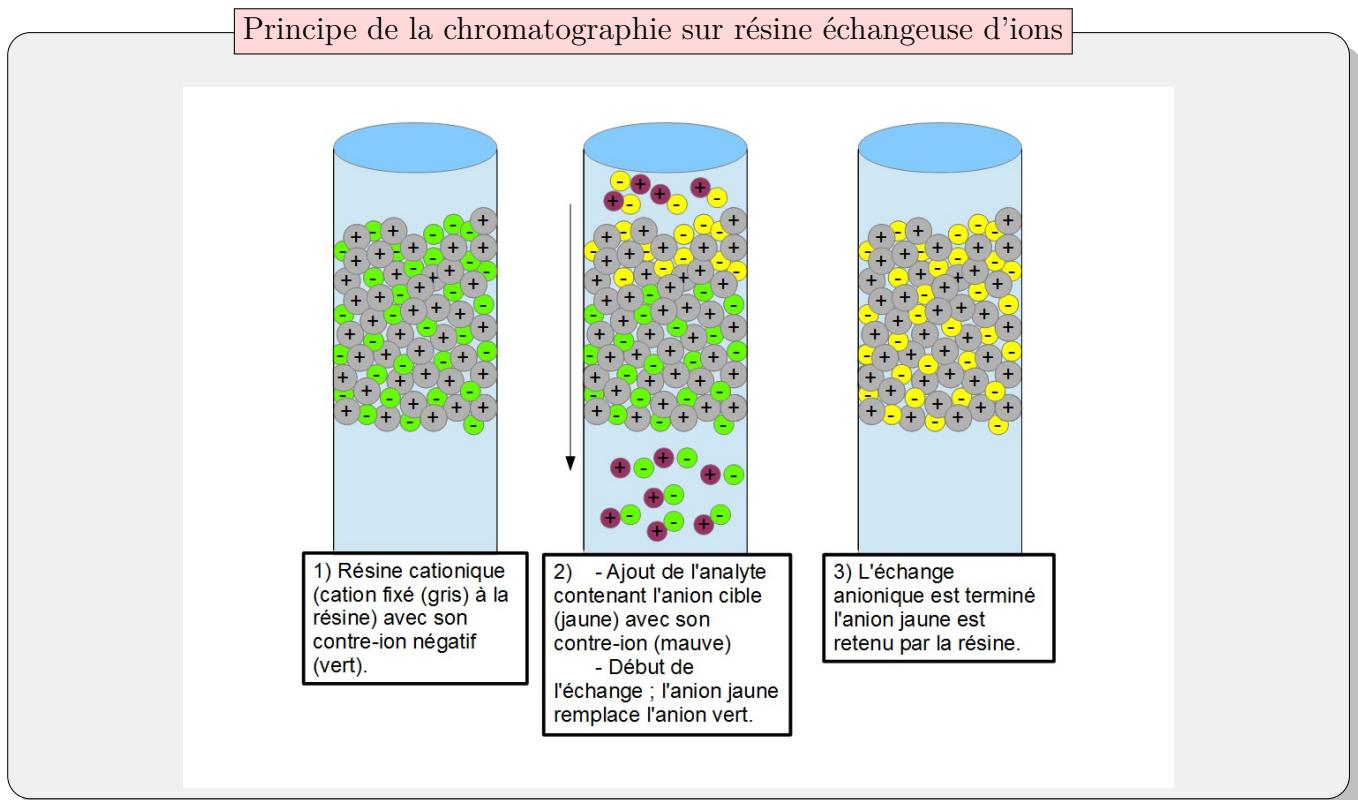
La chromatographie d'échange d'ions est une technique de séparation basée sur les différences d'affinité des ions pour une résine échangeuse d'ions (cationique ou anionique).

La colonne contient une résine échangeuse d'ions :

- Résine cationique : échange des cations (Na^+ , Ca^{2+} , H^+),
- Résine anionique : échange des anions (Cl^- , NO_3^- , OH^-).

L'échantillon contenant des ions est injecté dans la colonne. Les ions ou les groupes chargés des molécules interagissent avec la résine. Selon leur charge, taille, et affinité, certains se fixent plus longtemps que d'autres.

Cette chromatographie consiste à un échange réversible d'ions entre la phase mobile et la phase fixe (résine). La résine est régénérée en fin d'élution.



4.2 Fonctionnement d'une résine échangeuse d'ions

Une résine échangeuse d'ions est un matériau polymère contenant des groupes fonctionnels ionisés capables d'échanger des ions avec ceux d'une solution qui la traverse.

Il existe deux types principaux :

- Résines cationiques : échangent des cations
- Résines anioniques : échangent des anions

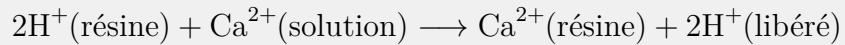
La résine est un solide constitué de microbilles polymères poreuses. Les billes contiennent des groupes fixés (chargés positivement ou négativement) et des ions mobiles liés faiblement à ces groupes

Quand la solution passe à travers la résine les ions présents dans la solution remplacent les ions faibles déjà fixés sur la résine. Le remplacement se fait selon la charge et l'affinité chimique.

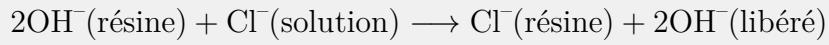
L'échange est réversible : la résine peut être régénérée (par exemple avec HCl ou NaOH).

Exemples :

- Résine cationique forte : Contient des ions H^+ initialement fixés. Si une solution contenant Ca^{2+} passe :

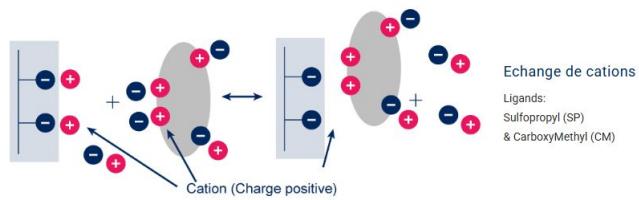


- Résine anionique forte : Contient des ions OH^- initialement fixés. Si Cl^- est présent dans la solution :



Les deux types de résine échangeuse d'ions

Résine négative



Résine positive

