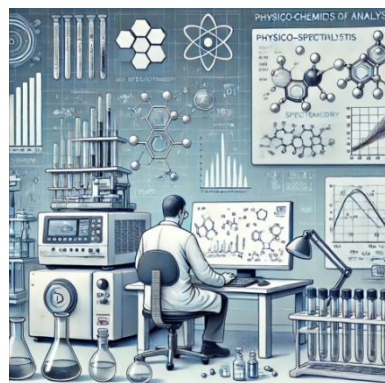


CHAPITRE II:

Méthodes de séparation en chromatographie



II.1 Généralités :

1- Introduction générale :

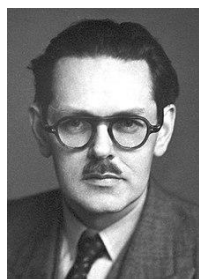
La chromatographie est une méthode analytique fondamentale de séparation, largement utilisée dans les laboratoires de chimie, pharmacie, et nanotechnologie. Cette technique repose sur la séparation des composants d'un mélange en fonction de leur affinité pour une phase stationnaire et une phase mobile. Elle est cruciale dans les analyses de haute précision, comme l'identification et la quantification de composés chimiques dans des échantillons complexes.

Le concept de la chromatographie a été développé au début du XXe siècle par le botaniste russe **Mikhail Tswett**, qui a découvert qu'il pouvait séparer les pigments végétaux en les faisant passer à travers un tube de craie (une colonne) avec un solvant.

Mikhaïl Semionovitch Tsvet, transcrit également comme **Tswett** (à l'allemande, orthographe la plus usuelle en botanique) **Tswet**, **Zwet** ou **Cvet**) (1872-1919) est un [botaniste russe](#) qui a inventé la [chromatographie d'adsorption](#). Son nom signifie "couleur" en [russe](#)



Cette technique a évolué et a été perfectionnée par d'autres scientifiques, notamment **Archer John Porter Martin** et **Richard Laurence Millington Synge**, qui ont reçu le Prix Nobel de chimie en 1952 pour leur travail sur la chromatographie en partition.



Archer John Porter Martin

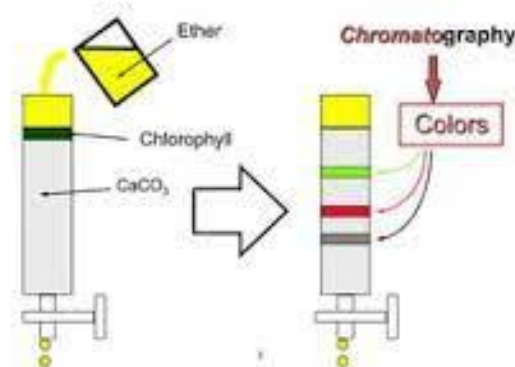


Richard Laurence Millington Synge

■ Expérience de Mikhaïl Tswett :

L'expérience de Mikhaïl Tswett en 1903 est une expérience pionnière qui a posé les bases de la chromatographie moderne. Tswett, un botaniste russe, a découvert cette technique en étudiant les pigments végétaux, notamment les chlorophylles et les caroténoïdes.

Invention of Chromatography by M. Tswett



But de l'expérience : Tswett voulait séparer et identifier les différents pigments présents dans les feuilles de plantes. Les méthodes d'analyse de l'époque ne permettaient pas d'isoler les pigments de manière efficace.

❖ Mise en place :

- Il a préparé un extrait de pigments végétaux en dissolvant des feuilles dans un solvant.
- Puis, il a rempli une colonne verticale en verre avec du carbonate de calcium finement broyé, qu'il a utilisé comme phase stationnaire.

❖ Procédure :

- Tswett a versé son extrait de pigments dans la colonne, puis il a ajouté un solvant qui a traversé la colonne par gravité.
- À mesure que l'extrait et le solvant traversaient la colonne, les différents pigments se séparaient en bandes distinctes.

❖ Résultat :

- Les pigments ont été séparés en bandes de différentes couleurs le long de la colonne, chaque bande correspondant à un pigment spécifique.
- La séparation se faisait selon les affinités des pigments avec la phase stationnaire et la phase mobile.

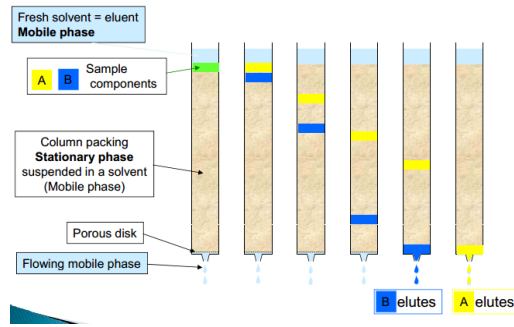
❖ Interprétation et terme "chromatographie" :

- Tswett a nommé cette technique "chromatographie", du grec "chroma" (couleur) et "graphein" (écrire), car il observait des "écritures" colorées sur la colonne.
- Il a ainsi découvert que différents composés peuvent être séparés par leur affinité pour une phase mobile (le solvant) et une phase stationnaire (le support dans la colonne).

2- Principe de chromatographie

La chromatographie est une méthode de séparation, tout comme l'extraction et la distillation, mais elle est particulièrement adaptée pour séparer des composés chimiques au sein d'un mélange complexe. Cette technique repose sur l'interaction entre un échantillon, une phase mobile (généralement un liquide ou un gaz) et une phase stationnaire (un solide ou un liquide fixé à une surface). L'échantillon dissous dans un solvant est injecté dans le système par une interface, puis il traverse une colonne contenant la phase stationnaire. Le mouvement de l'échantillon est facilité par le flux de la phase mobile, comme l'azote dans la chromatographie en phase gazeuse.

Chromatographic Separation

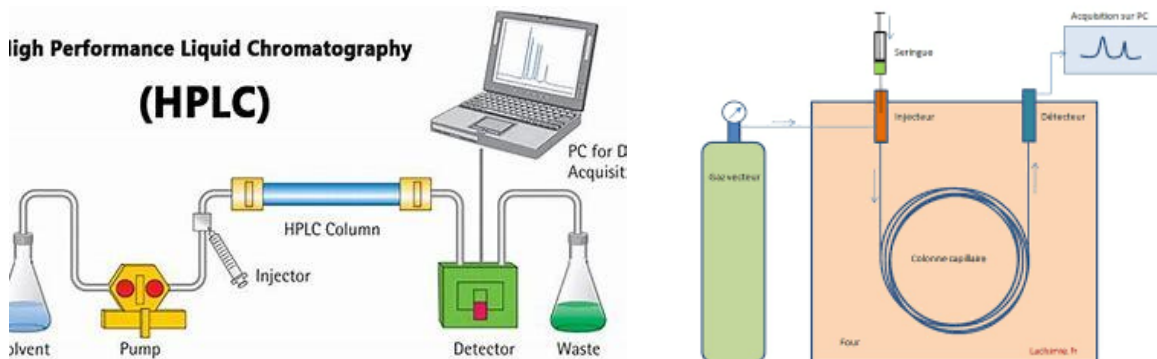


Principe de chromatographie

- ❖ **Principe général :** Le principe de base consiste en une séparation des constituants de l'échantillon selon leurs affinités respectives pour la phase mobile et la phase stationnaire. Les molécules ayant une plus grande affinité pour la phase stationnaire migreront plus lentement, tandis que celles avec une plus grande affinité pour la phase mobile migreront plus rapidement.
- ❖ **Injection et déplacement :** L'échantillon est introduit dans le système par un injecteur. Sous l'effet de la phase mobile, il se déplace à travers la colonne. La nature du gaz ou du liquide utilisé comme phase mobile dépend du type de chromatographie et du type d'échantillon à analyser.
- ❖ **Détection et analyse :** À la sortie de la colonne, les composants séparés sont détectés par différents types de détecteurs (spectromètre de masse, détecteur UV, etc.), ce qui permet de les identifier et les quantifier.
- ❖ **Utilisation pour la quantification et l'identification :** Les techniques chromatographiques permettent de quantifier les composants présents dans un échantillon et d'identifier les substances en fonction de leur temps de rétention et de leurs caractéristiques physiques.

1- Structure d'un Système Chromatographique

Un système chromatographique est composé de plusieurs éléments essentiels qui permettent la **séparation**, l'**analyse** et la **détection** des composés d'un mélange.



HPLC

CPG

Structure d'un Système Chromatographique

Un système chromatographique typique se compose des éléments suivants :

- a) **Réservoir de phase mobile**
- b) **Pompe (ou système d'entraînement de phase mobile)**
- c) **Injecteur (système d'injection de l'échantillon)**
- d) **Colonne chromatographique**
- e) **Détecteur**
- f) **Système d'acquisition de données (ordinateur et logiciel)**
- g) **Déchet ou collecteur de fraction**

■ Explication de chaque composant

a) Réservoir de phase mobile

- **Fonction** : Contient la **phase mobile**, qui est le fluide servant à transporter les analytes à travers la colonne.
- **Détails** :
 - En **chromatographie en phase liquide** (HPLC), il peut s'agir d'un solvant ou d'un mélange de solvants organiques (eau, acétonitrile, méthanol).
 - En **chromatographie en phase gazeuse** (CPG), il s'agit d'un gaz porteur (hélium, azote, hydrogène).

b) Pompe ou système d'entraînement de phase mobile

- **Fonction** : Assure le **flux** constant et contrôlé de la phase mobile à travers le système.
- **Détails** :
 - En HPLC, la pompe contrôle le débit (généralement exprimé en mL/min) et assure une haute pression pour pousser la phase mobile à travers la colonne.
 - En CPG, la pression du gaz porteur est réglée pour un débit constant.

c) Injecteur

- **Fonction** : Permet d'**introduire** l'échantillon à analyser dans la phase mobile.
- **Détails** :
 - En HPLC, l'échantillon est injecté à l'aide d'une **boucle d'injection**.
 - En CPG, l'échantillon est vaporisé et injecté dans le flux de gaz porteur.
 - L'injection doit être rapide et reproductible pour garantir une bonne séparation.

d) Colonne chromatographique

- **Fonction** : C'est le cœur du système chromatographique où la **séparation** des analytes se produit.
- **Détails** :
 - La colonne est remplie d'une **phase stationnaire** (liquide ou solide) qui interagit différemment avec chaque analyte, les séparant en fonction de leurs interactions.

- En **HPLC**, les colonnes sont souvent en acier inoxydable et remplies de particules de silice modifiée.
- En **CPG**, les colonnes sont souvent des tubes capillaires recouverts d'un film liquide de phase stationnaire.

e) Détecteur

- **Fonction** : Mesure la **concentration** des analytes après leur séparation dans la colonne.
- **Détails** :
 - Le détecteur envoie un signal électrique proportionnel à la quantité d'analyte détectée.
 - Différents détecteurs sont utilisés en fonction des analytes (UV-Vis, FID, MS, etc.).
 - Le signal généré est transformé en chromatogramme.

f) Système d'acquisition de données (ordinateur et logiciel)

- **Fonction** : Collecte et **analyse** les signaux provenant du détecteur.
- **Détails** :
 - Il permet de visualiser le **chromatogramme**, d'identifier les pics et de quantifier les analytes.
 - Les logiciels permettent des analyses statistiques et une comparaison des résultats.

g) Déchet ou collecteur de fraction

- **Fonction** : Collecte l'effluent après la détection ou permet de récupérer des fractions pour des analyses ultérieures.
- **Détails** :
 - En HPLC, le liquide est collecté dans un réservoir de déchets.
 - En CPG, les gaz sortent généralement par une évacuation.

■ Processus Général de Fonctionnement

- Préparation de la phase mobile** : La phase mobile est préparée dans le réservoir et la pompe est activée pour initier le flux à travers le système.
- Injection de l'échantillon** : L'échantillon est introduit dans la phase mobile par l'injecteur.
- Séparation dans la colonne** : Les composants de l'échantillon interagissent avec la phase stationnaire de la colonne, provoquant leur séparation en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.
- Détection** : Les analytes séparés sont détectés en fonction de leurs propriétés spécifiques.
- Acquisition et analyse des données** : Le signal du détecteur est enregistré, générant un chromatogramme permettant d'identifier et de quantifier les analytes.
- Résultat de détection : Le chromatogramme**
- g) Le **chromatogramme** est la sortie graphique de l'analyse chromatographique.

- A. Il montre l'**intensité du signal** (en ordonnée) en fonction du **temps** (en abscisse).
- B. Chaque **pic** correspond à un analyte différent.
- C. Le **temps de rétention** est utilisé pour l'identification, et la **surface du pic** pour la quantification.

2- Classification des méthodes chromatographiques

La chromatographie peut être classée en fonction du type d'échantillon, de la phase mobile, de la phase stationnaire et du coefficient de partage entre les phases :

(a) Classification selon la nature des phases

- ✚ **Chromatographie Gaz-Solide (CGS)** : Phase stationnaire solide et phase mobile gazeuse.
- ✚ **Chromatographie Gaz-Liquide (CGL)** : Phase stationnaire liquide immobilisée sur un support solide, avec une phase mobile gazeuse.
- ✚ **Chromatographie Liquide-Solide (CLS)** : Phase stationnaire solide, et phase mobile liquide.
- ✚ **Chromatographie Liquide-Liquide (CLL)** : Phase stationnaire liquide immobilisée sur un support, et phase mobile liquide.
- ✚ **Chromatographie Supercritique** : Utilise une phase mobile supercritique, généralement du CO₂.

(b) Classification selon le phénomène de séparation

- ✚ **Chromatographie d'adsorption** : La séparation repose sur l'adsorption des composants sur la phase stationnaire solide.
- ✚ **Chromatographie de partage** : Basée sur la différence d'affinité des composants entre deux phases liquides.
- ✚ **Chromatographie d'échange d'ions** : Les ions des échantillons interagissent avec des sites chargés de la phase stationnaire.
- ✚ **Chromatographie de perméation de gel (ou exclusion de taille)** : Les molécules sont séparées selon leur taille, la phase stationnaire est un gel poreux.
- ✚ **Chromatographie d'affinité** : Exploite l'affinité spécifique entre une molécule cible et un ligand immobilisé.

(c) Classification selon les procédés utilisés

- ✚ **Chromatographie en colonne** : L'échantillon traverse une colonne remplie de phase stationnaire.
- ✚ **Chromatographie en couche mince (CCM)** : La phase stationnaire est un mince film sur une plaque et l'échantillon migre sur celle-ci.
- ✚ **Chromatographie sur papier** : Utilise du papier comme phase stationnaire et le solvant migre par capillarité.
- ✚ **Chromatographie liquide haute performance (HPLC)** : Méthode en colonne utilisant des pressions élevées pour améliorer la séparation.
- ✚ **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)** : L'échantillon est vaporisé et transporté dans une colonne par un gaz porteur.

(d) Classification selon les paramètres intervenant dans la séparation

- ✚ **Température** : Principalement utilisé dans la chromatographie en phase gazeuse (CPG) où les températures élevées permettent l'évaporation et la séparation des composants volatils.
 - ✚ **Pression** : Particulièrement pertinent en HPLC pour améliorer la vitesse et la résolution de la séparation.
 - ✚ **Polarisabilité et polarité** : Affectent les interactions entre la phase mobile, la phase stationnaire, et les analytes.
 - ✚ **pH** : Dans la chromatographie d'échange d'ions, il influence la charge des analytes et des résines échangeuses.
 - ✚ **Taille moléculaire** : Primordial en chromatographie d'exclusion (perméation de gel) où les molécules sont séparées par taille.
1. **Chromatographie liquide (LC)** : Utilise une phase mobile liquide pour séparer des composés solubles dans la phase mobile. Elle est souvent utilisée pour analyser des composés thermiquement instables ou non volatils.
 2. **Chromatographie en phase gazeuse (GC)** : Utilise un gaz (par exemple, l'azote ou l'hélium) comme phase mobile pour séparer des composés volatils et thermiquement stables.
 3. **Chromatographie ionique** : Conçue pour les composés ioniques ou polaires ; elle utilise des phases stationnaires capables de retenir les ions de charges opposées à ceux de l'échantillon.
 4. **Chromatographie en phase inverse (RP-LC)** : Utilise une phase mobile polaire (comme l'eau) et une phase stationnaire non polaire, permettant de séparer des composés polaires en phase mobile.
 5. **Chromatographie par paires d'ions** : Adaptée pour des composés polaires et ionisables, avec ajout de contre-ions dans la phase mobile pour améliorer la séparation.
 6. **Chromatographie supercritique** : Utilise du CO₂ supercritique comme phase mobile, permettant une séparation rapide pour des composés semi-volatils.

3- Comment choisir la technique chromatographique ?

La sélection de la méthode dépend des propriétés physico-chimiques de l'échantillon :

- **Nature de l'échantillon** : Par exemple, les composés volatils conviendront pour la GC, tandis que les composés non volatils ou thermiquement instables conviendront pour la LC.
- **Polarité** : La polarité influence le choix de la phase stationnaire et mobile.
- **Solubilité** : En fonction de la solubilité de l'échantillon dans la phase mobile.

Chaque technique a des avantages selon le type d'analyse, et le choix final repose souvent sur les besoins de quantification, d'identification et la nature de l'échantillon.

Pour la chromatographie, l'échantillon doit idéalement être **homogène** pour garantir une séparation efficace et reproductible des composants. Si un échantillon est hétérogène, il doit être préparé par dissolution, filtration ou homogénéisation pour éviter que les particules ne perturbent le processus de séparation dans la colonne.

Tableau pour le choix de la méthode chromatographique

Critère de sélection	Chromatographie liquide (LC)	Chromatographie gazeuse (GC)	Chromatographie ionique	Chromatographie en phase inverse (RP-LC)	Chromatographie par paires d'ions	Chromatographie supercritique (SFC)
État physique de l'échantillon	Solide ou liquide	Volatil ou facilement vaporisable	Solide ou liquide, ionique	Solide ou liquide	Solide ou liquide	Solide ou liquide
Volatilité	Non requis	Requis	Non requis	Non requis	Non requis	Composés semi-volatils
Température de stabilité	Composés thermosensibles	Composés thermiquement stables	Composés sensibles aux températures élevées	Composés sensibles à la chaleur	Composés thermosensibles	Modéré
Polarité	Polaire à non polaire	Non polaire à légèrement polaire	Ionique	Polaire à légèrement polaire	Ionique	Semi-polaire
Type de phase mobile	Liquide	Gaz (azote, hélium)	Liquide (électrolyte)	Liquide (polaire, souvent eau)	Liquide (avec contre-ion)	Gaz supercritique (CO ₂)
Type de phase stationnaire	Solide ou liquide	Solide	Solide	Solide non polaire	Solide	Solide ou liquide
Type d'analyse	Quantification, identification	Quantification, identification	Quantification des ions	Quantification de composés polaires	Quantification de composés ionisables	Identification et séparation rapide
Applications principales	Produits pharmaceutiques, biomolécules	Composés organiques volatils	Anions, cations, composés polaires	Produits pharmaceutiques, composés polaires	Produits biologiques, polaires	Composés organiques et polymères

■ Considérations supplémentaires

- **Préparation de l'échantillon** : L'échantillon doit être préparé de manière à être compatible avec la phase mobile et la phase stationnaire.
- **Objectifs analytiques** : La précision et la sensibilité nécessaires pour l'analyse influencent le choix de la méthode. Par exemple, pour une analyse qualitative rapide, la GC est idéale pour les composés volatils. Pour les composés thermosensibles, la LC est préférable.

■ Intérêt et avantages de la chromatographie

- **Haute précision** : Permet une séparation et une identification de haute précision des composants dans des mélanges complexes.
- **Rapidité** : Certaines techniques, comme la CPG et la HPLC, permettent des analyses rapides, essentielles en production pharmaceutique.
- **Flexibilité** : La diversité des techniques permet de l'adapter aux propriétés chimiques et physiques des échantillons.
- **Possibilité d'étudier une quantité infime, échantillon d'ordre de nono-gramme.**