

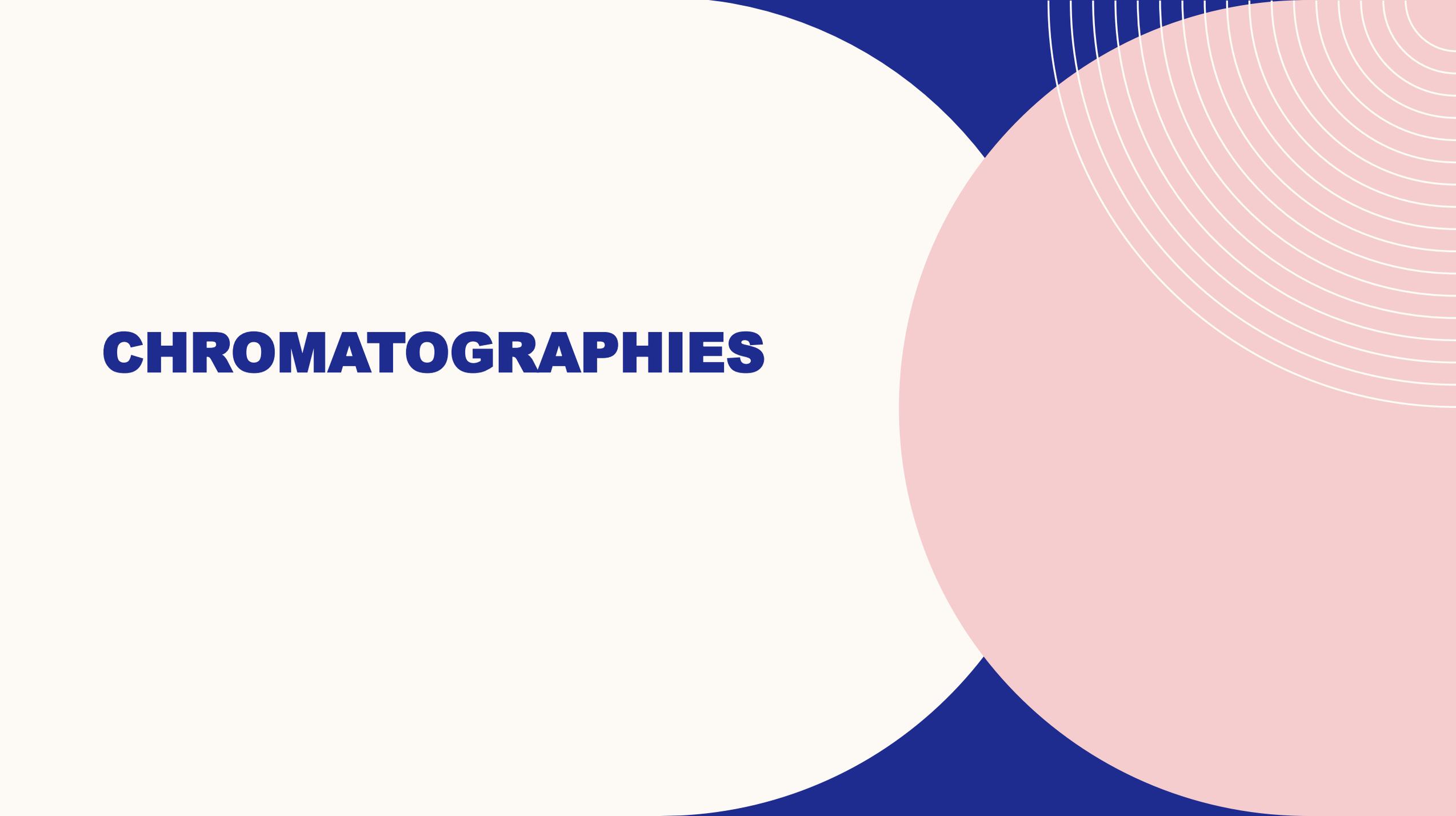
M2 Biotechnologie microbienne

**TECHNIQUES DE  
CARACTÉRISATION  
DES MOLÉCULES**

**Chargé de cours : Dr. CASASNI**

Année universitaire : 2024/2025

# **CHROMATOGRAPHIES**



## DÉFINITION

La chromatographie est une technique de **séparation** et d'**analyse** utilisée pour séparer un **mélange soluble** en **ses composants**.

# HISTORIQUE

4

**1900** : Invention de la chromatographie (**Michel TSWETT**)

**1938** : Première chromatographie sur couches minces (Ismailov et Schraiber)

**1952** : Naissance officielle de la chromatographie phase gaz (Martin et Synge, Nobel 1952)

**1955 – 1960** : Age d'or de la chromatographie en phase gazeuse

**Fin des années 60** : Naissance de la chromatographie en phase liquide à haute performance

**De nos jours** : Amélioration instrumentale (informatisation) et innovation dans le domaine de la miniaturisation (nanotechnologie)

# **DOMAINES DE LA CHROMATOGRAPHIE**

# **D'APPLICATIONS**

5

- Industrie **chimique** : production, contrôle...
- Industrie **alimentaire** : corps gras, arôme...
- Industrie **cosmétique** et **parfums**
- Industrie **pharmaceutique**
- **Energie** : raffinerie de pétrole, gaz naturel, biomasse...
- **Contrôle pollution** : eaux, sols, atmosphère
- **Exploration spatiale**
- **Police scientifique**
- **Recherche scientifique**

# UTILISATIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE

- L'analyse des **métabolites** dans les fluides corporels.
- L'extraction de **pigments** d'extraits de plantes.
- L'isolement des **principes actifs** des médicaments.
- La **purification** de composés.
- **Séparation** de mélanges de **protéines**, d'**acides aminés** ou de **nucléotides**.
- Le contrôle de la qualité de certaines **boissons** et **aliments**.

# MÉTHODE DE CHROMATOGRAPHIE

7

La chromatographie comprend les **étapes** suivantes :

- On prend un **mélange soluble**, connu sous le nom de **soluté**.
- On ajoute une petite quantité du mélange à un **solide**, un **liquide** ou un **gaz statique**. Ce milieu statique est appelé la **phase stationnaire**.
- On ajoute une sorte de **solvant**. On l'appelle la **phase mobile**.
- Le solvant dissout le mélange et le **transporte** à travers la **phase stationnaire**.
- Les différents composants du mélange traversent la **phase stationnaire** à des **vitesse différentes**. Pour cette raison, ils se séparent en **taches** ou **bandes** claires et distinctes, que nous pouvons visualiser sur un **chromatogramme**.

# PHASE STATIONNAIRE ET PHASE MOBILE

La phase **stationnaire** est un **solide**, un **liquide** ou un **gel** statique.

Le solvant transporte le mélange soluble à travers la phase stationnaire.

La phase **mobile** est le **solvant** utilisé pour transporter le mélange analysé à travers la phase stationnaire.

**C'est un solvant** qui dissout le soluté que l'on veut analyser ou séparer, et le transporte à travers la phase stationnaire.

# AFFINITÉ RELATIVE

9

En chromatographie, l'affinité relative décrit la façon dont un composant est attiré par la **phase stationnaire** ou **mobile**. Elle détermine la **vitesse** à laquelle le composant se déplace à travers la **phase stationnaire**.

# AFFINITÉ RELATIVE

10

Les composants qui subissent une plus **forte attraction** vers la phase **stationnaire** → plus **forte affinité** avec la phase stationnaire → **moins solubles dans le solvant** et plus attirés par le milieu statique → les composants **se déplacent plus lentement** à travers la phase stationnaire.

Les composants qui subissent une plus **forte attraction** de la phase **mobile** → plus **forte affinité** avec la phase mobile → **plus solubles dans le solvant** et moins attirés par le milieu statique → les composants **traversent plus rapidement** la phase stationnaire.

# FACTEURS DE RÉTENTION

11

Le rapport entre la **distance parcourue par chaque tache/composant** et la **distance totale parcourue par le solvant** pour calculer des **facteurs de rétention**, ou **valeurs Rf**.

Les valeurs Rf permettent d'**identifier les composants**. Un composant particulier produit toujours la même valeur Rf dans **certaines conditions**.

Si nous calculons la valeur Rf d'un composant particulier, nous pouvons la **comparer aux valeurs contenues** dans une **base de données** pour **découvrir l'identité** de cette **substance inconnue**.

$$\text{Valeur } R_f = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

# FACTEURS DE RÉTENTION

Certains types de chromatographie utilisent des **temps de rétention** au lieu de facteurs de rétention. Ceux-ci mesurent le temps nécessaire à chaque composant pour se déplacer à travers la phase stationnaire.

# TYPES DE CHROMATOGRAPHIES

Nom de chromatographie	Abréviation	Support des phases	Phase Stationnaire	Phase Mobile	Principe
Chromatographie sur papier		Surface	Liquide/ Solide	Liquide	Partage/ adsorption
Chromatographie sur couche mince	CCM	Surface	Solide	Liquide	Adsorption
Chromatographie d'exclusion stérique	CES	Colonne	Solide	Liquide	Tamissage
Chromatographie échangeuse d'ion	CEI	Colonne	Solide	Liquide	Charge
Chromatographie d'affinité	CA	Colonne	Solide	Liquide	Affinité
Chromatographie en phase inverse		Colonne	Solide	Liquide	Adsorption
Chromatographie d'interaction hydrophobe		Colonne	Solide	Liquide	Hydrophobicité
Chromatographie en phase gazeuse	CPG	Colonne	Solide	Gaz	Adsorption
		Colonne	Liquide	Gaz	Partage
Chromatographie liquide à haute performance	HPLC	Colonne	Solide	Liquide	Adsorption
Chromatographie en phase supercritique	CPS	Colonne	Solide	Fluide supercritique	Partage

# TYPES DE CHROMATOGRAPHIES

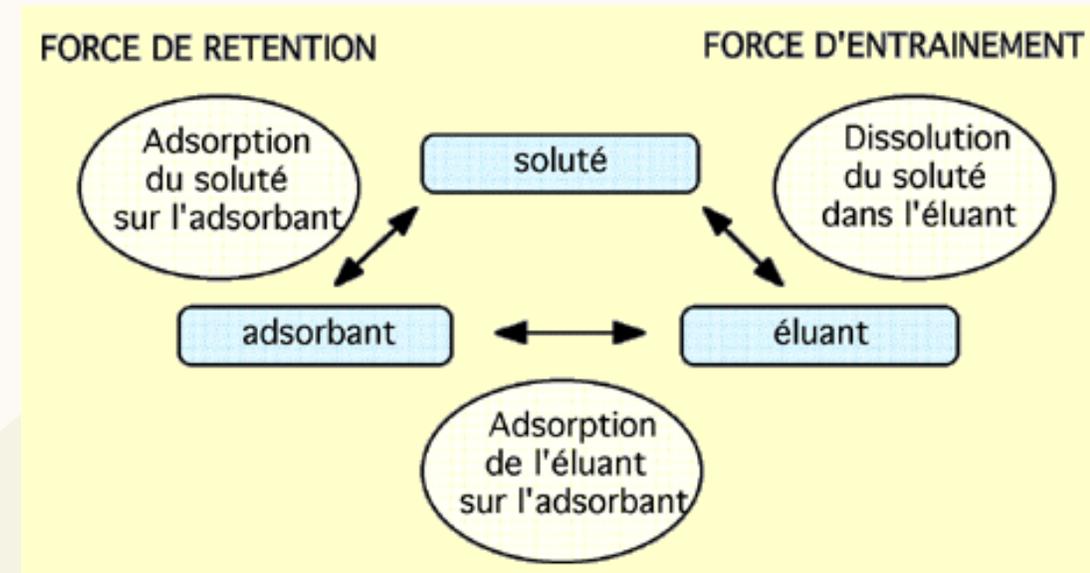
Il existe plusieurs types de **chromatographie**. Ils diffèrent par leurs **phases mobiles** et **stationnaires** et leurs **méthodes**, mais tous suivent les principes décrits ci-dessus. Les méthodes chromatographiques **peuvent être classées selon 3 façons** :

- Classification selon la **technique mise en jeu** (sur **colonne** ou de **surface**)
- 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).
- Classification selon le **phénomène chromatographique** (**adsorption, affinité, partage, échange d'ions, exclusion**).

# CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

- **Chromatographie d'adsorption :**

- L'adsorption est la **fixation** plus ou moins énergique d'un gaz, d'un liquide ou d'un soluté sur une surface solide; elle met en jeu des **liaisons à faible énergie**. Pour être utilisable à des fins **séparatives**, l'adsorption doit être **réversible**.
- L'**élution** ou **désorption** consiste à extraire le soluté adsorbé à l'aide d'un solvant appelé **éluant**.
- Les différents solutés sont plus ou moins adsorbés sur la phase stationnaire, et plus ou moins solubles dans la phase mobile; il en résulte une **migration différentielle** des solutés en fonction de la résultante entre les deux **forces** (de **rétenion** et d'**entraînement**) et donc une séparation de ces solutés.



# CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

- **Chromatographie d'adsorption :**

## Adsorbants :

- Insolubles dans le solvant et **chimiquement inertes** vis-à-vis du **solvant** et des **solutés**.
- **Granulométrie** varie entre 5 et 100  $\mu\text{m}$  et surface spécifique de 50 à 1000  $\text{m}^2/\text{g}$ ,
- L'activité d'un adsorbant dépend de sa nature et de sa teneur en eau.
- **Capacité d'adsorption** : faible (carbonate de calcium...) ou forte (silice, alumine, charbon ...).
- **Polarité** : faible (charbon...) ou forte (silice  $\text{SiO}_2$ , utilisée sous forme hydratée : gel de silice).

## Solvants :

On utilise généralement des mélanges de solvants, de **polarité voisine de celle des solutés à séparer (ceux-ci doivent être solubles dans l'éluant !)**. On classe les différents solvants selon leur "force éluante" qui traduit leur polarité : eau, méthanol, éthanol, acétone...

## **CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE**

- **Chromatographie d'adsorption :**

### **Applications :**

La chromatographie d'adsorption est utilisée pour **séparer des molécules organiques de masse molaire 100 à 1000 g/mol et de polarité moyenne;**

**Exemples :** lipides : stérols et stéroïdes, caroténoïdes, phospholipides..., pigments, médicaments..., oses et oligosides, acides aminés et oligopeptides

## CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

- Chromatographie de **partage** :

Dans la chromatographie de partage, le principe de la séparation provient d'un paramètre appelé **coefficient de partage**. Une molécule a généralement une affinité différente selon les milieux. On pense en particulier à une molécule polaire qui a une affinité supérieure pour des milieux polaires, et une molécule apolaire qui a une affinité supérieure pour les milieux apolaires.

Si ces milieux **ne sont pas miscibles** entre eux (exemple d'un liquide polaire comme l'eau et d'un liquide apolaire comme de l'huile), la molécule **va se répartir** entre ces deux milieux au prorata de son affinité respective pour chacun d'entre eux. On peut alors définir un **coefficient de partage** entre ces deux milieux. Ce coefficient est une constante tant que l'on reste dans les mêmes conditions (température, pression, etc.).

## CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

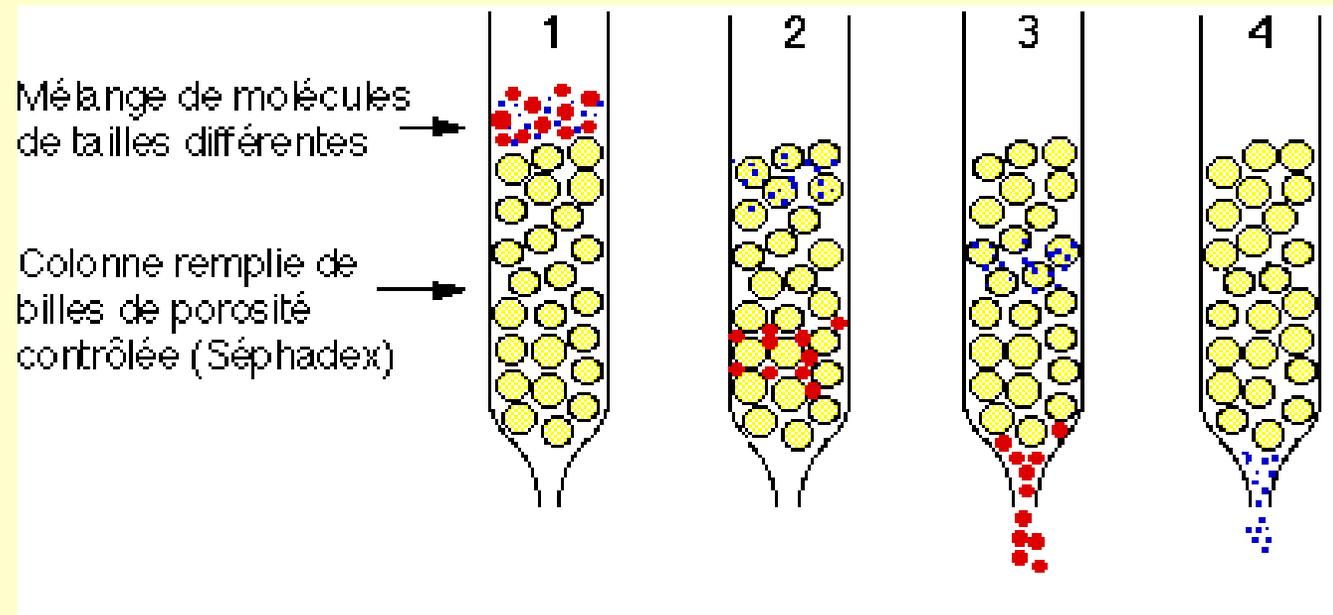
- **Chromatographie d'exclusion:**

La chromatographie d'exclusion est aussi appelée FILTRATION SUR GEL ou TAMISAGE MOLECULAIRE. Cette technique est apparue en 1959 avec un produit nouveau : le Sephadex.

Le **Sephadex** est un gel de dextrane (polymère de glucose  $\alpha$ -1-6 produit par *Leuconostoc mesenteroides*), auquel on fait subir une **réticulation**. Il se présente sous forme de billes poreuses, dont la porosité dépend du degré de réticulation. Ces billes sont très hydrophiles

et gonflent dans l'eau.

Il en existe différents types en fonction de la taille des billes et de leur porosité.



## CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

- **Chromatographie d'exclusion:**

Dans ce type de chromatographie, la **phase stationnaire** est donc solide (les billes) et la phase mobile est **liquide** (un tampon dont le flux entraîne les molécules). Selon la taille des pores des billes, on peut **séparer** efficacement des molécules dont la masse moléculaire est comprise dans une fourchette différente.

C'est une technique très **simple** à mettre en œuvre, **peu onéreuse**, qui est très **peu destructrice** pour les constituants à séparer, mais dont la **résolution** (capacité à séparer des molécules dont les caractéristiques sont proches) est **modeste**.

Cette technique est très utilisée pour **la séparation ou l'élimination de sels** ou de petites molécules dans **les solutions protéiques** : dessalage, échange de tampons...

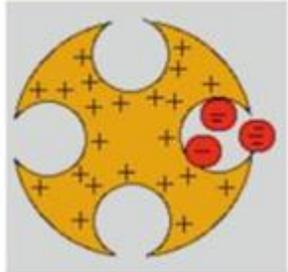
# CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

- Chromatographie d'échange d'ions:

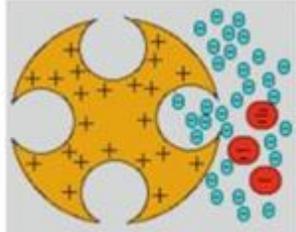
Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire comporte des groupements ionisés (+ ou -) fixes; des ions mobiles de charge opposée assurent l'électroneutralité. Les ions retenus au voisinage des charges fixes sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile.

La séparation est basée sur cette propriété d'échange d'ions et ne peut donc s'appliquer qu'à des solutés ionisables.

✓ ADSORPTION



✓ DESORPTION



Legend:

-  = R : Résine
-  = M : Molécule
-  = S : contre ion

$R^+ + M^{X-} \longrightarrow R^+M^{X-}$

Cellulose, dextran, agarose, copolymère polystyrène / divinyl benzène...

$R^+M^{X-} + S^- \longrightarrow R^+S^- + M^{X-}$

# CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

- **Chromatographie d'échanges d'ions:**

## Les échangeurs d'ions :

- **Nature :** La phase stationnaire est constituée d'un support insoluble dans l'eau, sur lequel sont greffés des groupements fonctionnels ionisables.
- **Les supports :** minéraux : silice, ou organiques : résine polystyrénique, cellulose, dextrane
- **Les groupements fonctionnels :** fixés par des liaisons covalentes sur la matrice; ils sont de deux types :
  - Les échangeurs de cations portent des groupements chargés (-)
  - Les échangeurs d'anions portent des groupements chargés (+)

# CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

- **Chromatographie d'échange d'ions:**

Caractéristiques :

- **Porosité** : le support est un polymère plus ou moins réticulé ; la porosité dépend du taux de pontage : un polymère très réticulé a des pores de petite taille et convient pour des petites molécules.
- **Granulométrie** : le support est commercialisé sous forme de grains de diamètre variant de 30 à 800  $\mu\text{m}$  (chromatographie basse pression) Celui des colonnes HPLC a une granulométrie de 5-10  $\mu\text{m}$  (supports totalement poreux) ou légèrement supérieure (supports pelliculaires, en couche de 1  $\mu\text{m}$  sur des billes de verre). Les échanges sont d'autant plus rapides et efficaces que les grains sont petits.
- **Capacité de rétention** : c'est la quantité maximale d'ions que peut fixer l'échangeur d'ions, exprimée en mEq/g de poids sec ou en mEq/ml de poids humide. Elle dépend de la densité du support en groupements fonctionnels et il faut en tenir compte pour ne pas trop charger une colonne.

## CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

- **Chromatographie d'échange d'ions:**

Les **éluants** sont des solutions aqueuses qui contiennent des ions échangeables avec les solutés fixés sur l'échangeur :

- Solutions contenant un ion de densité de charge plus élevée et (ou) de concentration plus élevée.
- Solutions d'un pH tel qu'il modifie la charge des ions fixés et (ou) des groupements fonctionnels et provoque leur libération dans l'éluat.

On peut éluer avec une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou avec un gradient de pH et (ou) de force ionique, pour **décrocher successivement** les différents ions fixés sur l'échangeur.

## **CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE**

- **Chromatographie d'échange d'ions:**

La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour **séparer des molécules ionisables**, quelle que soit leur taille: **ions minéraux** (tous les cations alcalins, alcalino terreux ou métalliques), **acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés**. C'est une méthode analytique de référence en analyse des **eaux**, et est adaptée aux **milieux biologiques**.

## CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

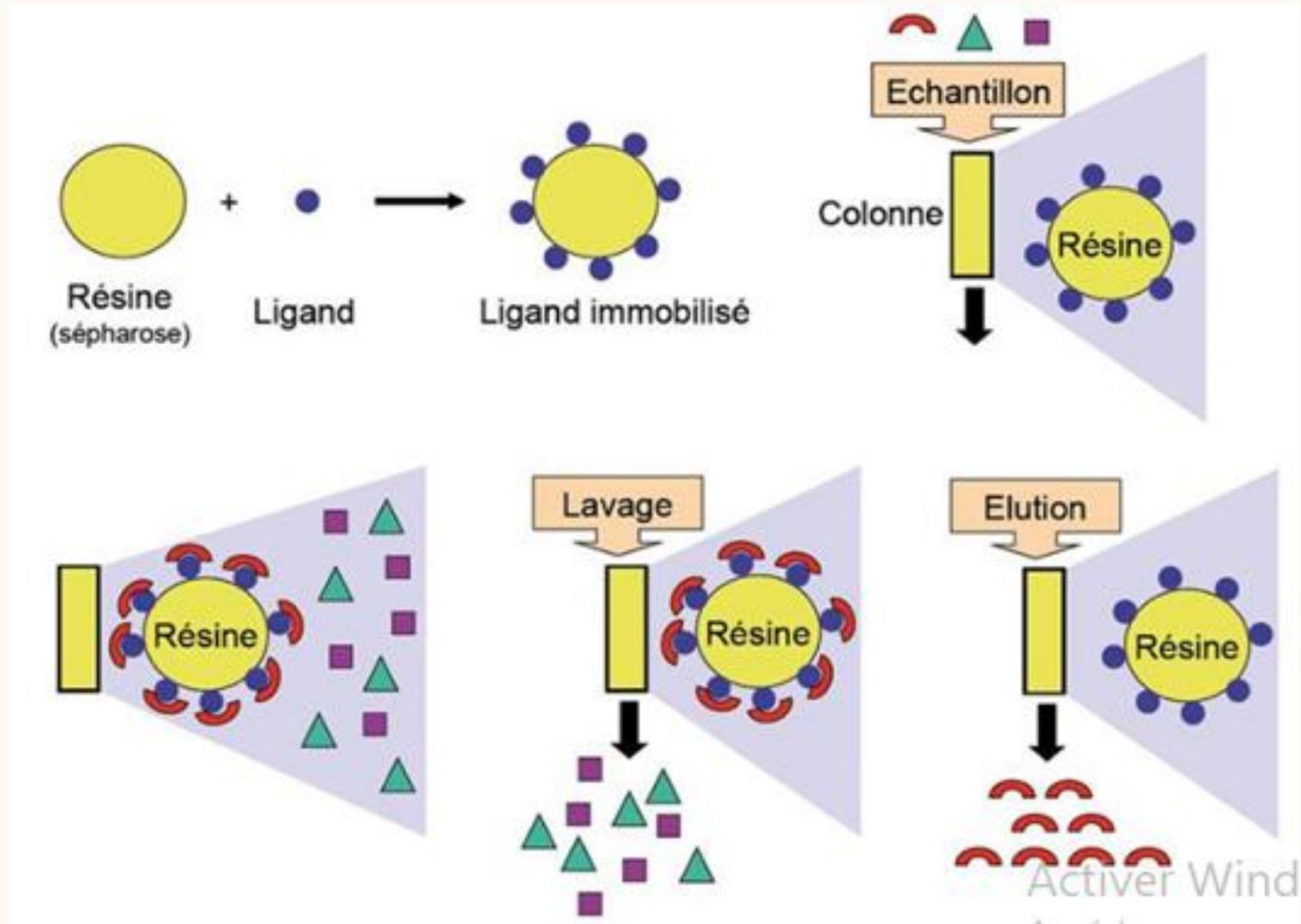
- **Chromatographie d'affinité:**

Ce mode de chromatographie connaît depuis 1970 un développement sans précédent et est appelé à prendre une place encore plus grande avec l'essor des biotechnologies.

Le principe consiste à utiliser une **phase stationnaire** constituée d'un support (silice, polymère) sur lequel on a **greffé une molécule organique** particulière qui présente une **affinité sélective** pour certains constituants d'un mélange dont on cherche à les isoler. Ceux-ci vont être sélectivement adsorbés ou tout au moins retenus sur la colonne, tandis que les autres composants sont très rapidement élués. Un changement de la phase mobile (pH, force ionique ou ajout d'un compétiteur) permet ensuite d'éluier les substances intéressantes, avec un facteur de purification pouvant atteindre 1000.

# CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

- Chromatographie d'affinité:



## CLASSIFICATION SELON LE PHÉNOMÈNE CHROMATOGRAPHIQUE

- **Chromatographie d'affinité:**

La chromatographie d'affinité s'utilise avec des colonnes basse pression ou des supports à haute performance (HPLAC).

Exemple :

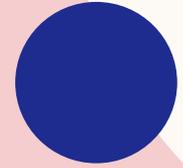
- En **enzymologie**, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extraits enzymatiques.
- En **immunologie**, pour la purification d'anticorps.
- En **protéinochimie**, pour l'étude des protéines membranaires.

# TYPES DE CHROMATOGRAPHIES

Nom de chromatographie	Abréviation	Support des phases	Phase Stationnaire	Phase Mobile	Principe
Chromatographie sur papier		Surface	Liquide/ Solide	Liquide	Partage/ adsorption
Chromatographie sur couche mince	CCM	Surface	Solide	Liquide	Adsorption
Chromatographie d'exclusion stérique	CES	Colonne	Solide	Liquide	Tamissage
Chromatographie échangeuse d'ion	CEI	Colonne	Solide	Liquide	Charge
Chromatographie d'affinité	CA	Colonne	Solide	Liquide	Affinité
Chromatographie en phase inverse		Colonne	Solide	Liquide	Adsorption
Chromatographie d'interaction hydrophobe		Colonne	Solide	Liquide	Hydrophobicité
Chromatographie en phase gazeuse	CPG	Colonne	Solide	Gaz	Adsorption
		Colonne	Liquide	Gaz	Partage
Chromatographie liquide à haute performance	HPLC	Colonne	Solide	Liquide	Adsorption
Chromatographie en phase supercritique	CPS	Colonne	Solide	Fluide supercritique	Partage

# TYPES DE CHROMATOGRAPHIE

- Chromatographie sur couche mince (CCM)
- Chromatographie ionique
- Chromatographie en phase gazeuse
- Chromatographie en phase liquide



# CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE CCM

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**.

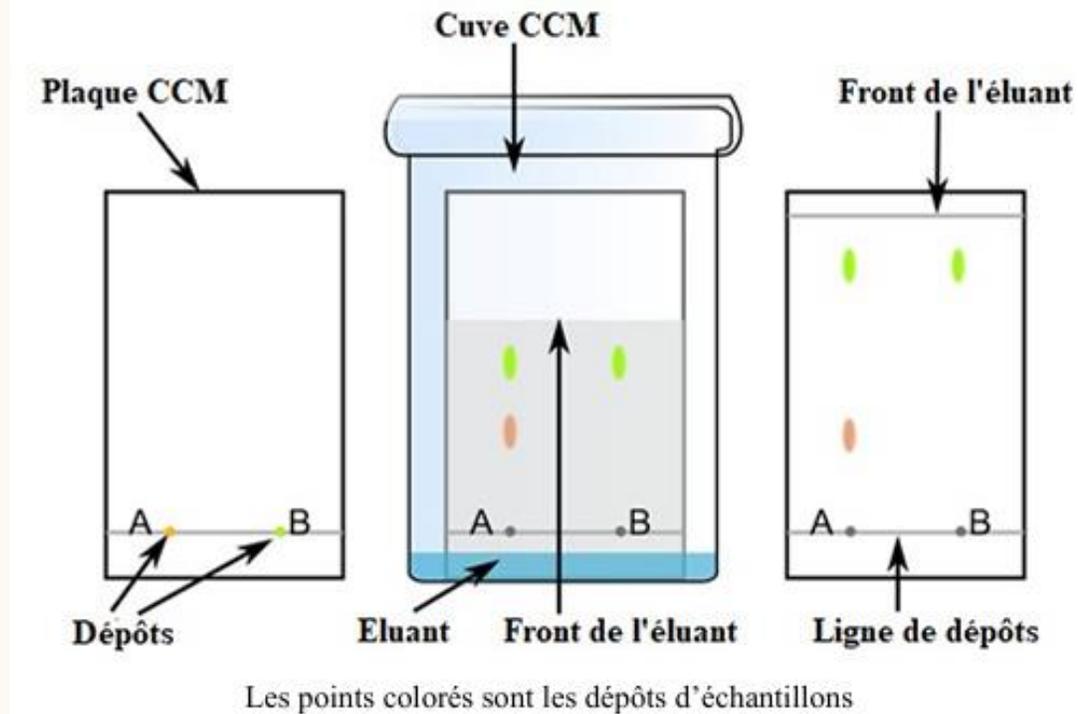
Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de **leur nature** et de celle du **solvant**.

# CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE CCM

**Cuve chromatographique:** un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

**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 l'amidon.

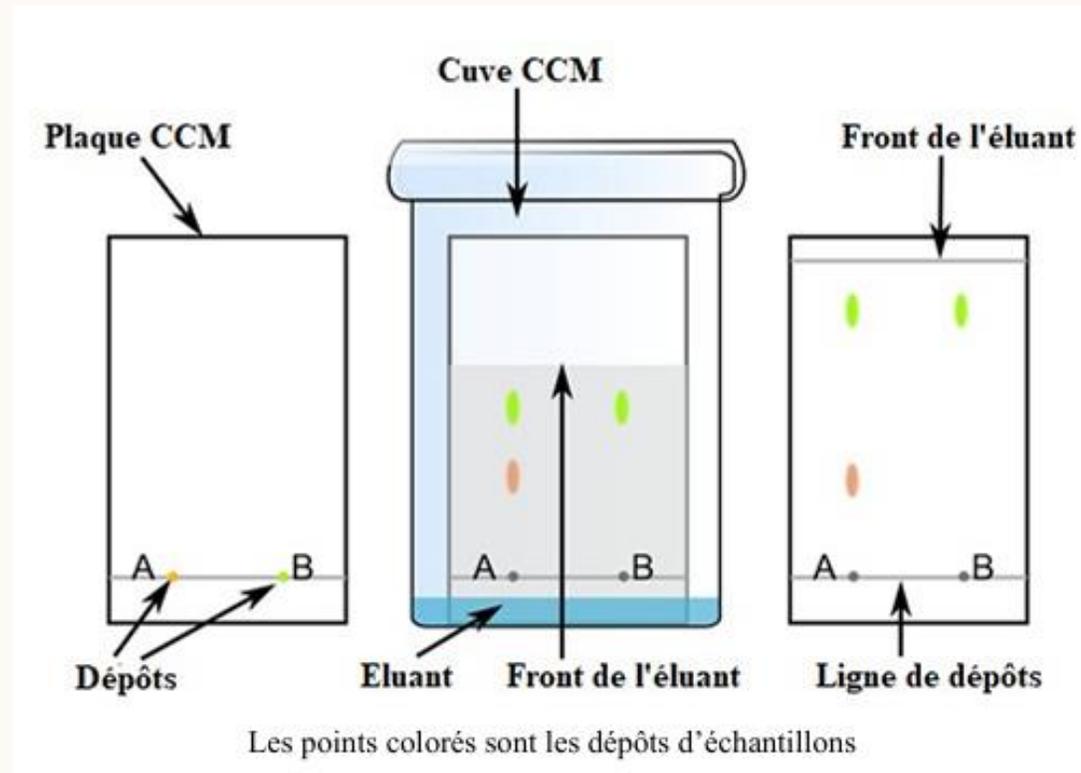
**Echantillon:** environ un microlitre (ml) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposer en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.



# CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE CCM

**Eluant (phase mobile):** un solvant pur ou un mélange: il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon. L'éluant peut être composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants ; il ne doit pas être ni trop polaire (entraînant les composants) ni trop apolaire (empêchant leur migration).

**Adsorbant:** le gel de silice, l'alumine et la cellulose. Ils sont utilisés dans une granulométrie plus grande en chromatographie sur colonne.



# CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE CCM

Après migration les taches doivent être révélées; c'est la détection qui peut se faire soit:

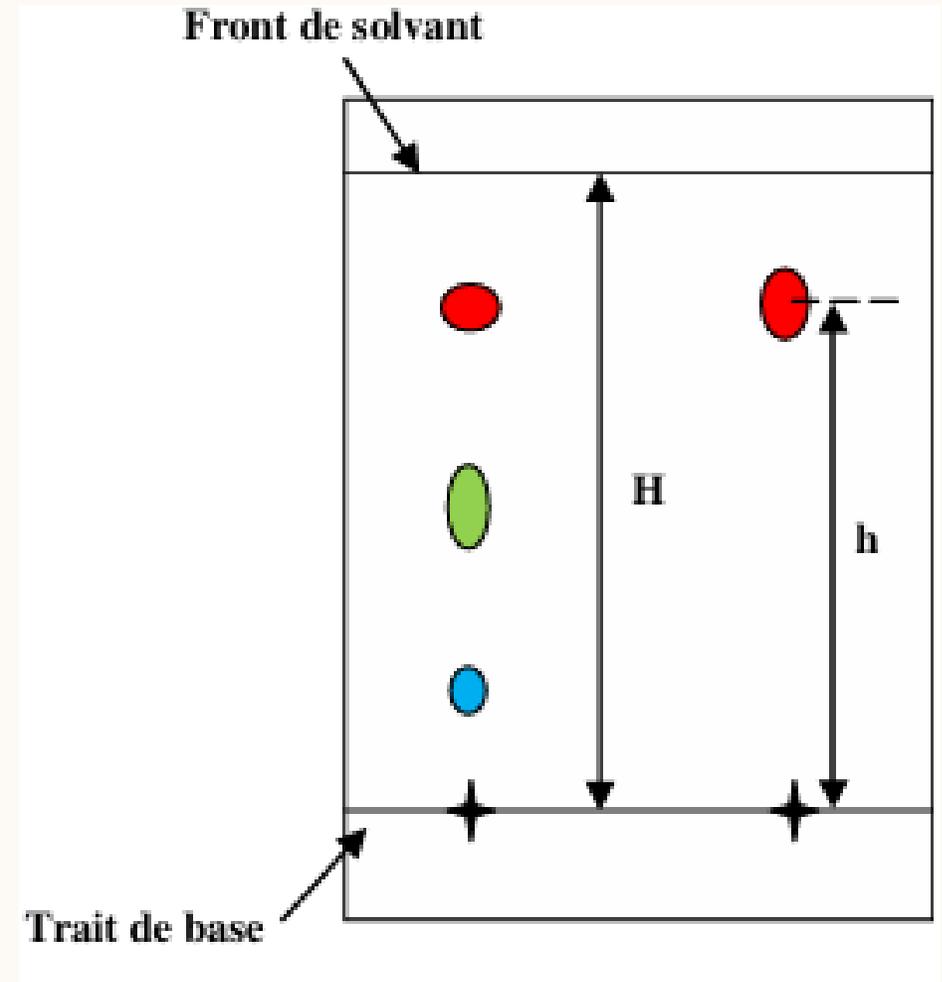
- Pulvérisation d'un réactif caractéristique
- Par immersion dans un bain de permanganate de potassium
- Par pulvérisation de vapeur de diiode
- Par observation à la lumière Ultra-Violet (UV) si la plaque de silice comporte un indicateur de fluorescence.

# CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE CCM

Le rapport frontal, noté  $R_f$ , est caractéristique d'un produit dans un éluant donné et pour une phase stationnaire donnée. On mesure la hauteur  $H$  parcourue par le solvant et la hauteur  $h$  atteinte par chaque tâche.

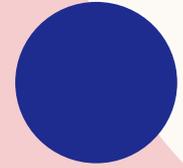
$$R_f = \frac{\text{hauteur de migration}}{\text{Hauteur de front de solvant}}$$

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



# TYPES DE CHROMATOGRAPHIE

- Chromatographie sur couche mince (CCM)
- Chromatographie en phase gazeuse
- Chromatographie en phase liquide
- Chromatographie ionique



# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)

La **chromatographie en phase gazeuse** (CG) est une technique d'analyse qui **sépare** et **analyse** les composants d'un **échantillon gazeux**. Elle est utilisée pour les **composés** qui se **vaporisent** lorsqu'ils sont chauffés sans se décomposer.

La **chromatographie en phase gazeuse** permet non seulement de séparer les composants d'un échantillon, mais aussi de mesurer la **quantité relative** de chaque espèce présente. Cette technique est donc utile pour permettre aux chimistes d'analyser des mélanges complexes, tant sur le plan **qualitatif** que **quantitatif**.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)

La **phase mobile** est un **gaz vecteur**. On distingue :

- Chromatographie de **partage** : La chromatographie **gaz-liquide** : la phase **stationnaire** est un **liquide** immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.
- Chromatographie d'**adsorption** : La chromatographie **gaz-solide** : la phase **stationnaire** est un **solide** poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)

## Principe :

- La **phase mobile** est plutôt un **gaz non réactif** (hélium, azote...).
- La **phase stationnaire** est un **liquide visqueux** (tel qu'un hydrocarbure à longue chaîne). Le liquide est en suspension sur un solide fin (tel que la silice), qui est emballé dans un tube capillaire long et fin (ou colonne). Le tube n'a généralement que quelques millimètres d'épaisseur, mais peut atteindre 10 mètres de long.
- Les composants quittent le système chromatographique à des moments différents et peuvent être **détectés** individuellement par un **détecteur**. Le détecteur produit un signal, qui est utilisé pour créer un chromatogramme.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)

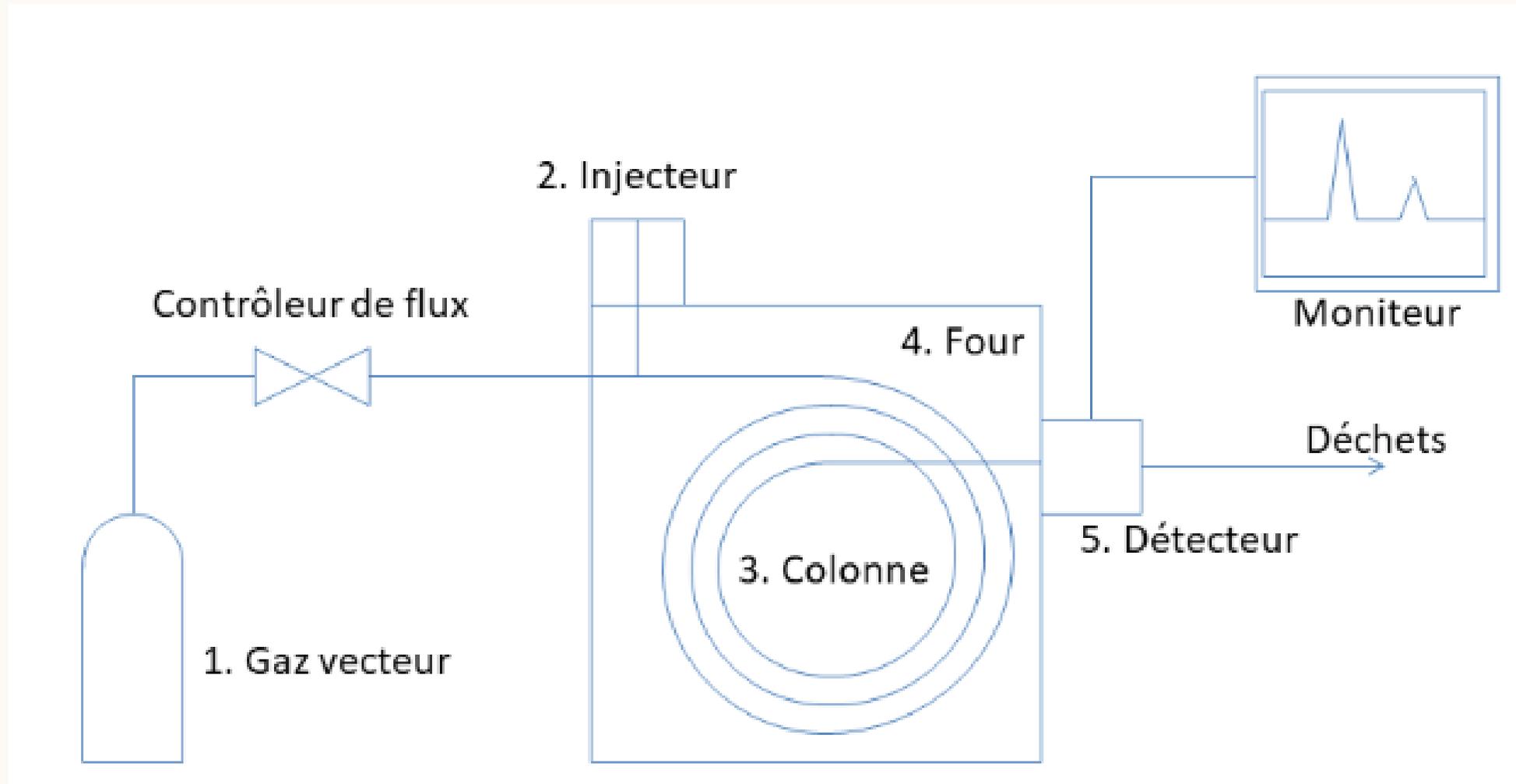
## Principe :

- En **chromatographie en phase gazeuse**, le chromatogramme fournit également des données **quantitatives** sur la composition en **pourcentage** de l'échantillon, c'est-à-dire la quantité de chaque composant qu'il contient.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)

41

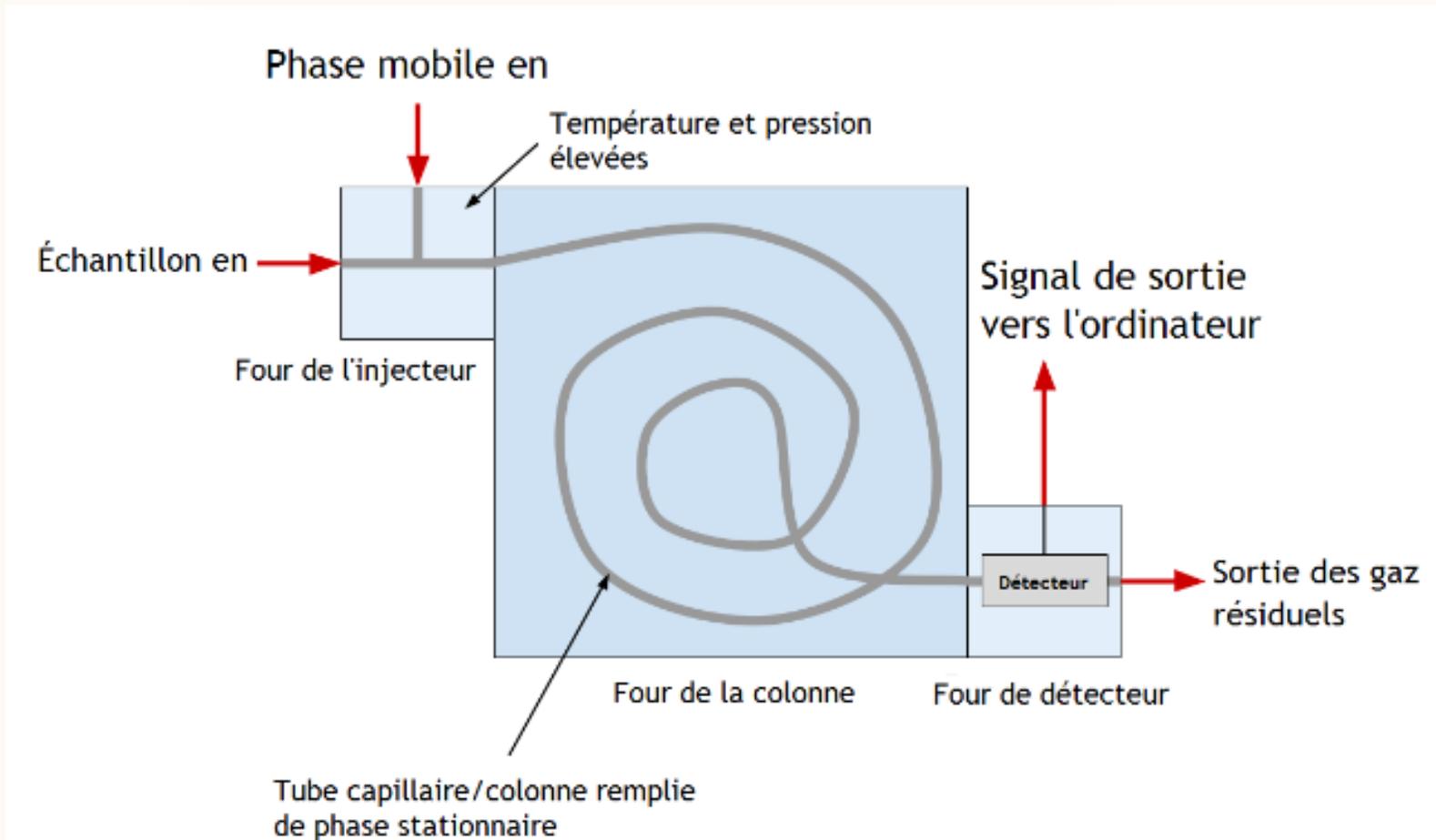
Appareillage :



# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)

42

Appareillage :



## Appareillage :

### 1. Gaz vecteur (phase mobile) :

- Entraîne les analytes à travers la colonne, depuis l'injecteur jusqu'au détecteur. Son choix dépend du type de détecteur utilisé (hélium, azote...).
- Le débit de ce gaz vecteur est de l'ordre de 30 à 40 mL/min pour les colonnes remplies et de 0,2 à 2 mL/min pour les colonnes capillaires.

Appareillage :

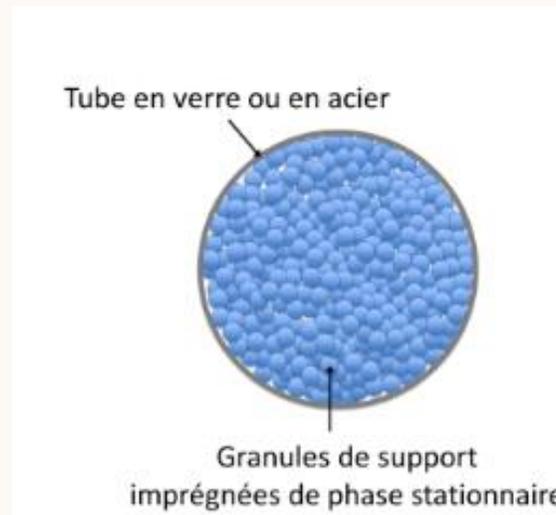
## 2. Système d'injection :

- Ce système permet à la fois l'**introduction de l'échantillon** dans la colonne du chromatographe, ainsi que la **volatilisation** des analytes. La température de l'injecteur doit être réglée de manière à entraîner la vaporisation de tous les analytes de l'échantillon.
- Certains injecteurs peuvent être munis d'une fonction « **Split/Splitless** ». La fonction « split » permet de **ne pas injecter la totalité** de l'échantillon ; cela peut être utile dans le cas d'échantillon en **solution concentrée**, pour éviter de surcharger la colonne.

## Appareillage :

### 3. Colonne (phase stationnaire) : Il existe deux types de colonnes :

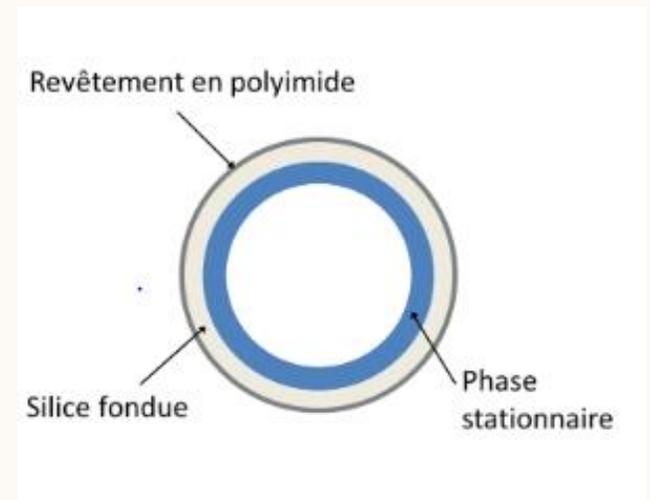
- Les **colonnes remplies** : avec un diamètre de quelques millimètres et une longueur de l'ordre du mètre. Elles sont remplies de granules de support inerte, généralement de la silice, dont la surface est imprégnée ou greffée avec la phase stationnaire. Elles sont aujourd'hui supplantées par les colonnes capillaires, dont le pouvoir de résolution est bien supérieur.



## Appareillage :

### 3. Colonne (phase stationnaire) : Il existe deux types de colonnes :

- Les **colonnes capillaires** : sont de simples tubes d'acier inoxydable, de verre ou de silice fondue de diamètre intérieur compris entre 0,1 et 0,5 mm, et d'une longueur typique de plusieurs dizaines de mètres, pouvant aller jusqu'à 100 m. Pour tenir dans l'appareil, la colonne est enroulée, avec des spirales ayant 10 à 30 cm de diamètre. La surface interne de ce tube est recouverte d'un film de 0,1 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur constitué de la phase stationnaire. Ce film est mis en place par greffage ou simple déposition, le greffage étant généralement préféré pour des raisons de stabilité thermique.



# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)

47

Appareillage :

## 3. Colonne (phase stationnaire) :

Afin de **maximiser l'influence de l'équilibre de partage**, la colonne est choisie de telle sorte que le temps de rétention des analytes soit important.

Une colonne capillaire de faible diamètre, longue, présentant une phase stationnaire épaisse et ayant des propriétés chimiques similaires aux molécules de l'échantillon permet typiquement d'obtenir de meilleures séparations.

## Appareillage :

### 4. Four :

- La colonne est contenue dans un four de type chaleur tournante, dont la température est précisément ajustable (typiquement entre 20 °C et 350 °C) et programmable.
- Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré.
- Une méthode pour laquelle la température est gardée constante tout au long de l'analyse est appelée « **isotherme** ». A l'inverse, on peut choisir d'augmenter la température du four au cours de l'analyse : cette méthode est appelée « **gradient** ».

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)

49

Appareillage :

4. Four :

	ISOTHERME	GRADIENT
Durée d'analyse	longue	courte
Séparation des analytes (résolution)	Bonne à temps moyen	Bonne à tout temps
Analyses successives	Idéal (la température du four n'a pas besoin de se rééquilibrer à basse température)	Non-idéal (la température du four doit se rééquilibrer à basse température avant la prochaine injection)
Conception de méthode	Plus complexe : il faut bien choisir la température du four pour que l'analyse ne soit ni trop longue ni trop courte.	Facile : en balayant une large gamme de température, on balaie une large gamme de volatilité.
Utilisations typiques	Suivi d'une réaction (injections successives facilitées)	Analyse d'un mélange nouveau (volatilités des analytes inconnues)

Appareillage :

## 5. Détecteur :

- En sortie de colonne, les analytes rencontrent le détecteur, aujourd'hui généralement couplé à un **enregistreur numérique du signal** qui permet son traitement. Cet élément mesure en continu **une grandeur proportionnelle à la quantité des différents analytes**.
- **Exemple de détecteur** : Le FID (en anglais flame ionisation detector, en français **détecteur à ionisation de flamme**), qui est le plus utilisé. La sortie de colonne traverse une flamme maintenue à une tension d'une centaine de volts. La pyrolyse ionise les composants, provoquant l'apparition d'un courant électrique entre les électrodes, ensuite amplifié. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs azote, hélium et hydrogène.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG) 51

Appareillage :

5. Détecteur :

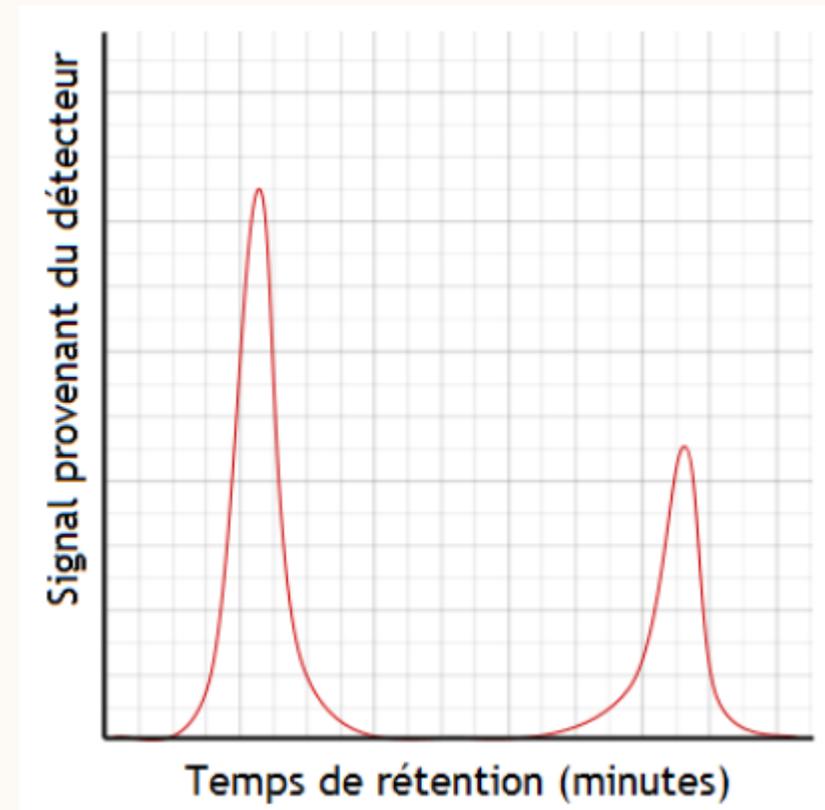
- A l'instar du rapport frontal pour une chromatographie sur couche mince, le **temps de rétention** est caractéristique d'une molécule dans exactement les mêmes conditions. Ainsi, la comparaison de temps de rétention, voire une co-injection, peuvent aider à **l'identification de composés chimiques**.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)

52

## Analyse des chromatogramme

- La chromatographie en phase gazeuse produit un **chromatogramme**. Il s'agit d'un graphique qui nous informe sur les composants de notre échantillon. Il montre les pics correspondant au **temps de rétention** et à la **quantité relative** de chaque composant.
- ✓ Les temps de rétention nous donnent des indices sur l'**identité des composants** de l'échantillon.
- ✓ Les chromatogrammes nous renseignent également de manière **quantitative** sur le **pourcentage d'abondance** de chaque composant dans l'échantillon.



## Analyse des chromatogramme

- Le temps de rétention d'un composant dans un échantillon est le **temps écoulé** entre son **injection** et sa **détection**. En d'autres termes, c'est le temps qu'il lui faut pour atteindre le détecteur.
- **Pourcentage d'abondance** : Certains pics dans les chromatogrammes sont beaucoup plus hauts que d'autres. D'autres sont beaucoup plus larges. Par conséquent, les différents pics ont des **aires différentes**. L'aire sous un pic est proportionnelle à la quantité relative du composant qui atteint le détecteur à un moment donné. Nous pouvons l'utiliser pour déterminer **quantitativement** le **pourcentage d'abondance** de chaque composant dans l'échantillon.

## Analyse des chromatogramme

▪ Voici comment procéder :

1. On trouve d'abord l'aire sous chaque pic. Les pics sont grossièrement triangulaires, et leur surface est donc approximativement égale à

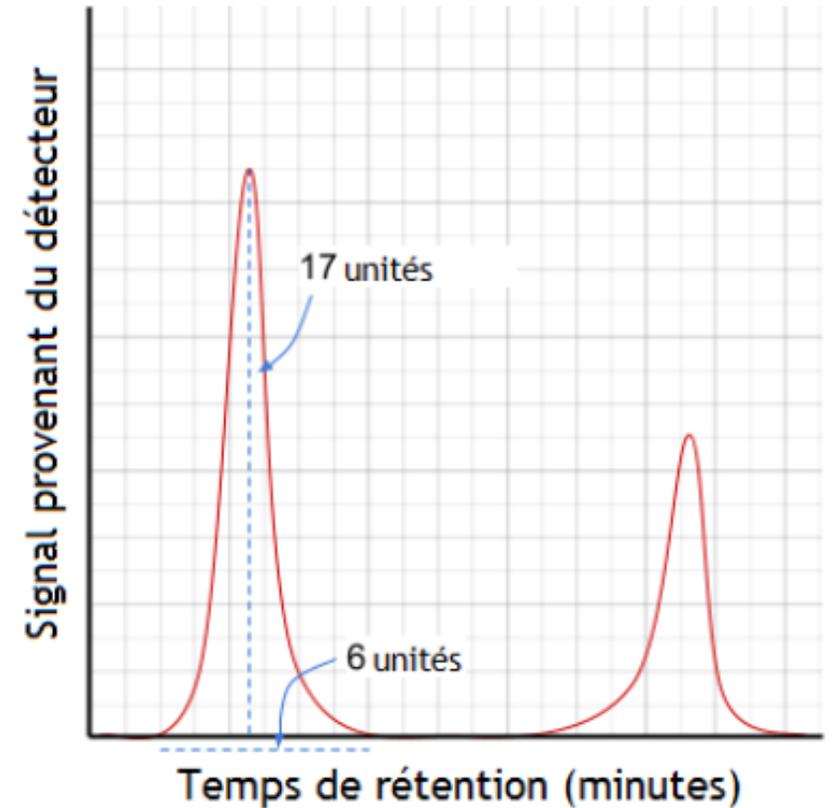
$$0,5 \times \text{la longueur de leur base} \times \text{leur hauteur}$$

2. Nous additionnons ensuite les surfaces sous tous les pics pour obtenir la surface totale ;
3. Pour trouver le pourcentage d'abondance d'un composant particulier, on divise la surface sous son pic par la surface totale sous tous les pics. Puis, multiplie ce nombre par 100;
4. On peut répéter l'étape avec les pics restants.

## Analyse des chromatogramme

### ▪ Exemple :

Calculez le pourcentage d'abondance du composant responsable du pic de gauche dans le chromatogramme illustré. L'aire totale sous les deux pics du chromatogramme est égale à 82,5 unités au carré. On suppose que chaque carré a une longueur d'une unité.



# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG) 56

## Autres types de chromatographie en phase gazeuse

Outre la chromatographie gaz-liquide, on trouve également la chromatographie gaz-solide (CGS). Il existe quelques différences essentielles entre les deux :

- La phase stationnaire de la CPGL est un liquide supporté par un solide.
- En revanche, la phase stationnaire de la CGS est simplement un solide - il n'y a pas de liquide.
- Comme son nom l'indique, la CPGL repose sur la partition : la séparation d'un soluté entre deux solvants non miscibles.
- En revanche, la CGS utilise l'adsorption : l'adhésion des molécules à un solide.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG) <sup>57</sup>

## Avantages

- La chromatographie en phase gazeuse peut être utilisée pour toutes sortes d'échantillons - la seule condition est qu'ils soient **volatils** et ne se décomposent pas à la chaleur.
- Elle produit des données **quantitatives**, contrairement à d'autres techniques telles que la chromatographie sur couche mince (CCM).
- En outre, les données sont **numériques**, ce qui réduit le risque de perte ou de dégradation.
- La chromatographie en phase gazeuse présente également **un haut niveau de sensibilité** et une **haute résolution**, ce qui permet de détecter une large gamme de composés.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG) 58

## Avantages

- Sa résolution et sa sensibilité sont toutes deux considérablement améliorées lorsqu'elle est associée à un **spectromètre de masse**. C'est pourquoi nous pouvons utiliser la chromatographie en phase gazeuse pour séparer et identifier des espèces extrêmement similaires, même si elles ne sont présentes qu'à l'état de traces.
- En outre, il existe de nombreux types de tubes capillaires, de colonnes, de détecteurs et de phases stationnaires qui peuvent être utilisés dans toute une série d'applications.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG) 59

## Inconvénients

- La chromatographie en phase gazeuse nécessite une surveillance attentive des conditions externes, afin de s'assurer que la température ne tombe pas trop bas.
- Les espèces non volatiles, ainsi que celles qui ne sont pas thermiquement stables, ne sont pas adaptées à l'analyse par cette technique. Cela inclut de nombreuses molécules organiques comme les sucres.
- Les tubes capillaires doivent être manipulés et stockés avec soin.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG) <sup>60</sup>

## Applications

- La chromatographie en phase gazeuse est utilisée pour tester le **dopage**, la **consommation de drogues** et la **présence d'exhausteurs de performance** dans les grands événements sportifs.
- De même, elle est utilisée dans les **services de sécurité des aéroports** et en **médecine légale**.
- La chromatographie en phase gazeuse joue également un rôle dans **l'industrie alimentaire**. Cette technique est utilisée pour évaluer la sécurité et la palatabilité des produits alimentaires en analysant non seulement les niveaux d'additifs et de contaminants, mais aussi en s'assurant qu'il y a suffisamment de molécules aromatiques ou de saveurs particulières.

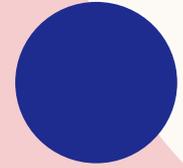
# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG) <sup>61</sup>

## Applications

- Nous vérifions également la présence de **polluants environnementaux** dans les systèmes d'eau et les habitats naturels à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse.
- Un domaine d'étude scientifique assez récent consiste à examiner les risques et les dangers des produits **chimiques organiques volatils** (COV). La chromatographie en phase gazeuse peut être utilisée pour identifier les COV libérés par des **articles ménagers courants**.

# TYPES DE CHROMATOGRAPHIE

- Chromatographie sur couche mince (CCM)
- Chromatographie en phase gazeuse
- **Chromatographie en phase liquide**
- Chromatographie ionique



## Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la **phase mobile liquide** (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la **phase stationnaire** dans un tube appelé **colonne chromatographique**.

La phase mobile poussée par une **pompe sous haute pression**, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est **injecté** puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur **affinité** entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé **chromatogramme**.

# CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) 64

L'introduction des **pompes** capables de pousser la phase mobile à **forte pression** a permis de **diminuer la taille des grains** de la phase stationnaire, et à conféré à la technique:

- Un meilleur échange entre les deux phases.
- Une meilleure séparation (meilleure efficacité).
- Une analyse rapide (quelques minutes < 1 heure).
- Des colonnes de taille réduite.
- Une simplification des manipulations par l'utilisation de différents détecteurs en ligne.

## Applications

- Industries chimiques et para chimiques
- Agro-alimentaires
- Environnement
- Pharmacie
- Biochimie

## Comparaison avec la chromatographie gazeuse

La CPG présente des limitations dans trois cas :

- Substances **peu volatiles** ( $mM > 300$ )
- Substances **sensibles à une élévation** même modérée de la **température** (la plupart des substances d'intérêt biologique)
- Substances **ionisées**.

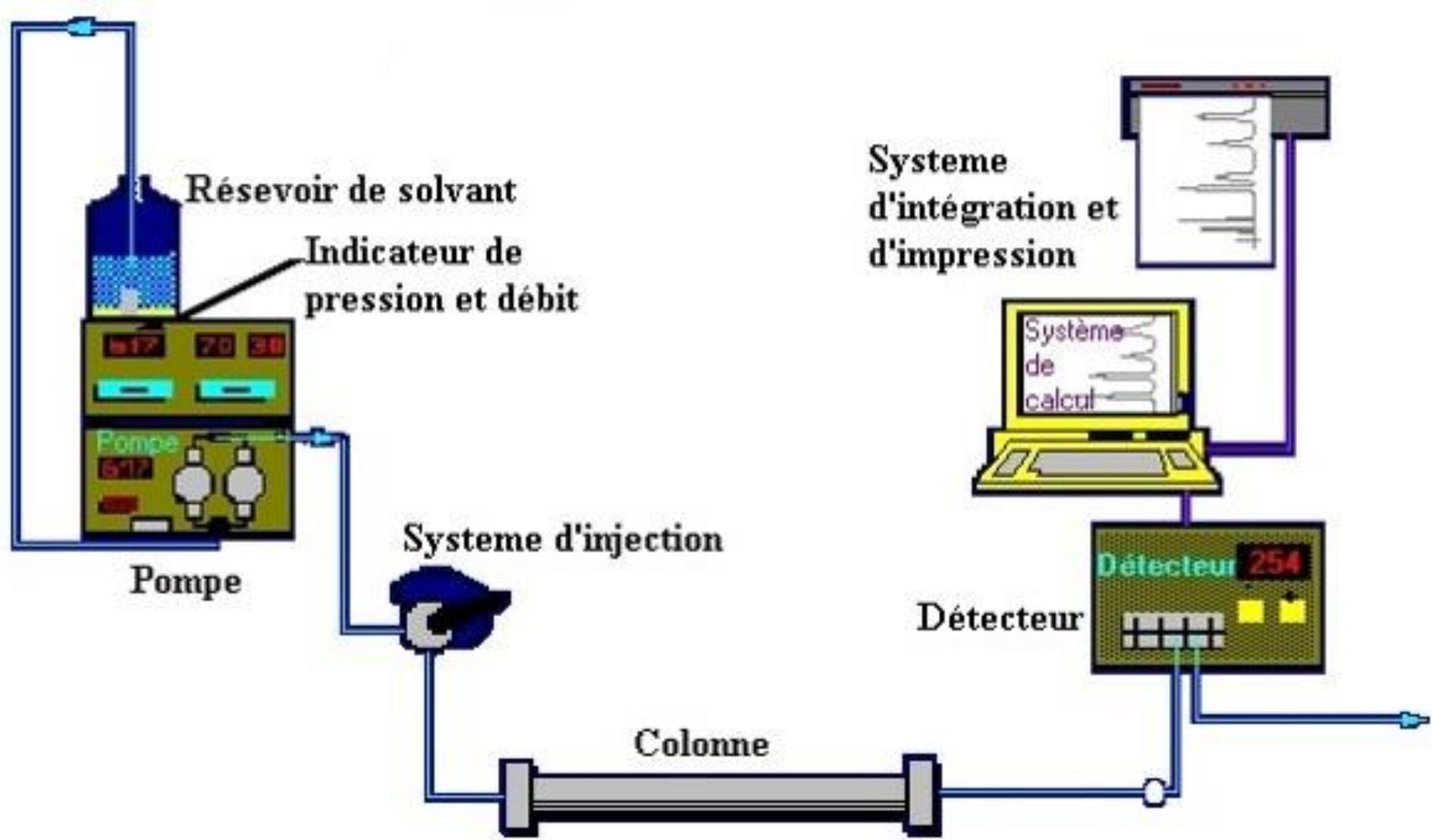
La **CPL** est souvent plus efficace que la CPG pour 3 raisons :

- 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.

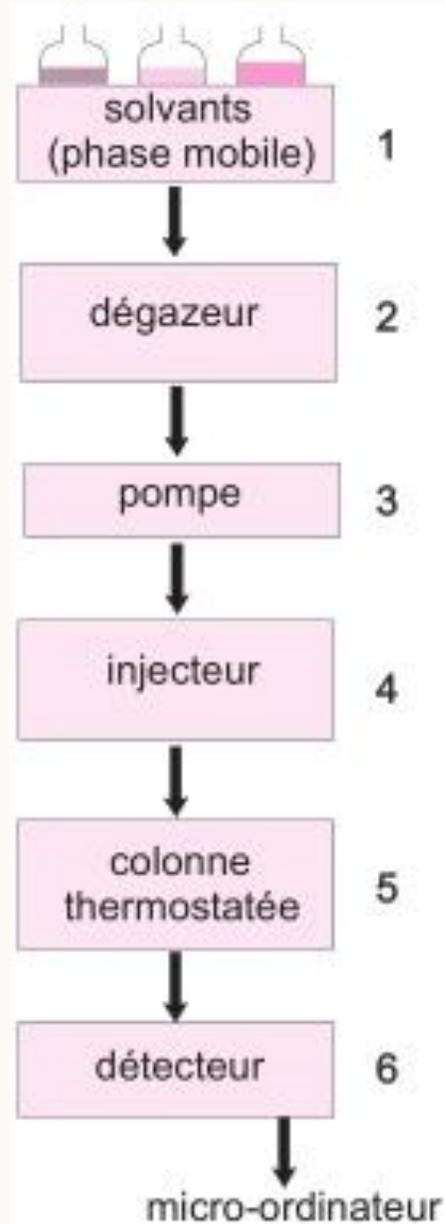
## Comparaison avec la chromatographie gazeuse

- La CPL manque par contre de aussi universels que les détecteurs à ionisation de flamme par exemple.  
détecteurs
- 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**.

# CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) 68

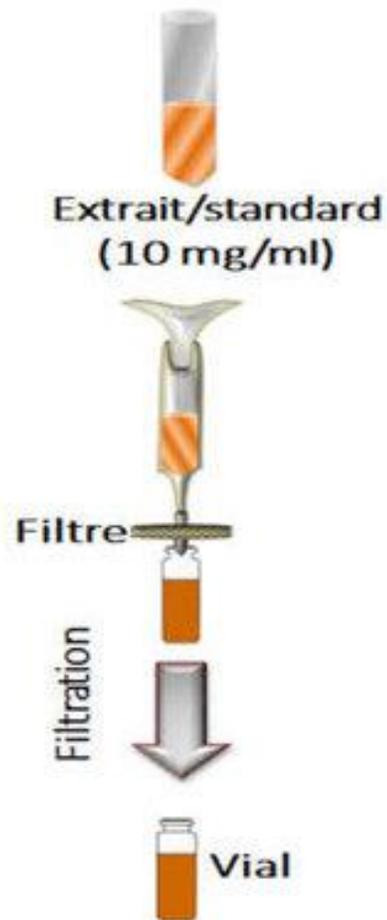


# CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) 69

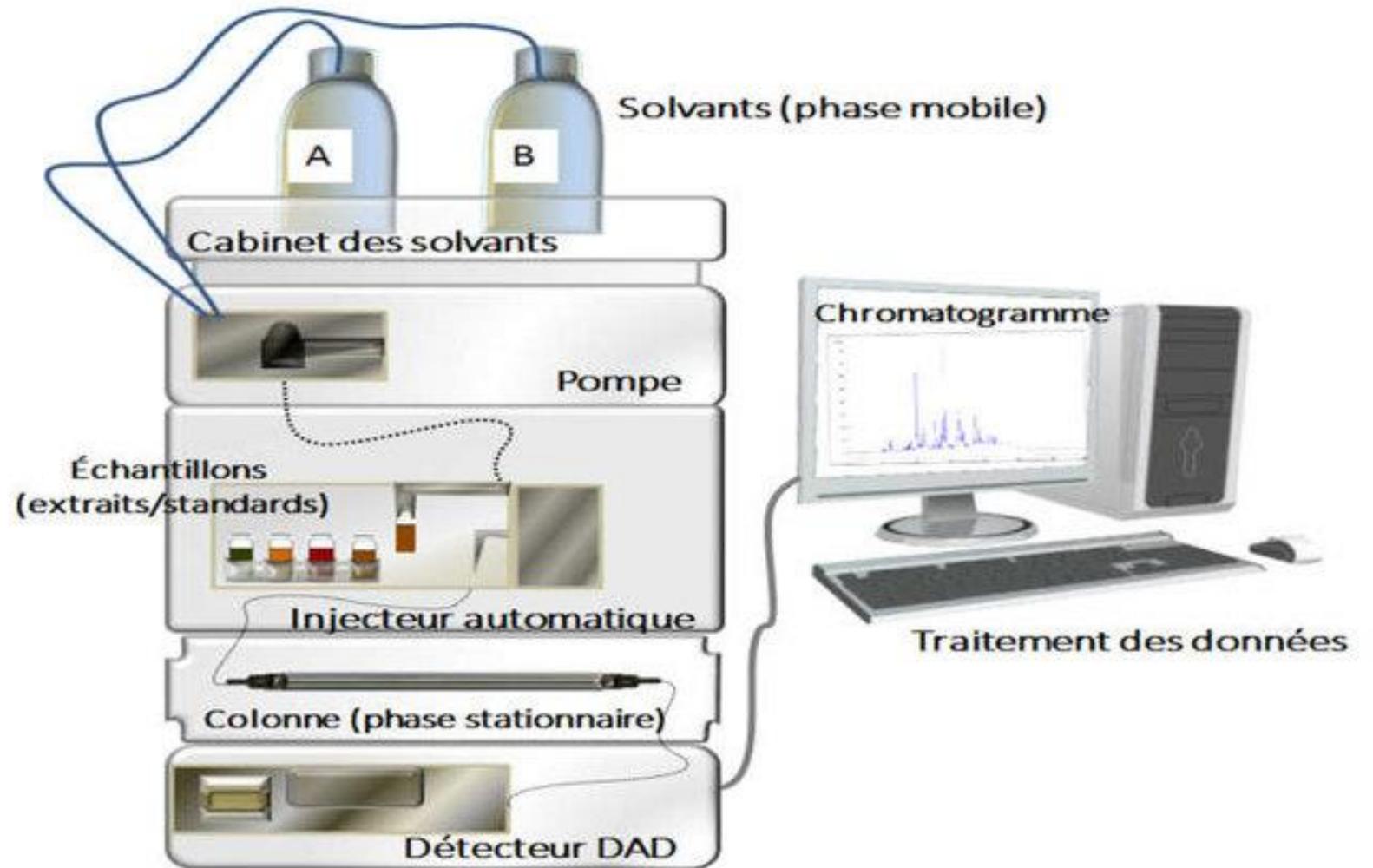


# CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) 70

## I- Préparation de l'échantillon



## II- Analyse de l'échantillon par HPLC



# CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) 71

## 1. Réservoir de la phase mobile

- Réservoir renferme la phase mobile
- En verre ou en acier inoxydable (200 à 1000 ml).
- Le réservoir doit être étanche pour éviter:
  - ✓ l'évaporation préférentielle
  - ✓ la dissolution des gaz de l'atmosphère qui se libéreraient dans le reste de l'appareil, ou au cours des opérations
- La phase mobile est privée des gaz dissous dans une cuve à ultrasons.
- La phase mobile est filtrée pour éliminer toutes particules en suspension : Car tous les tubes de l'appareil ont un diamètre extrêmement fin et risquent de se boucher.

## 2. Pompes

Sert à faire passer la phase mobile rapidement dans la colonne.

- débit : 0,01 à 10 mL/min
- stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- pression maximale > 350 bars

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'élution).

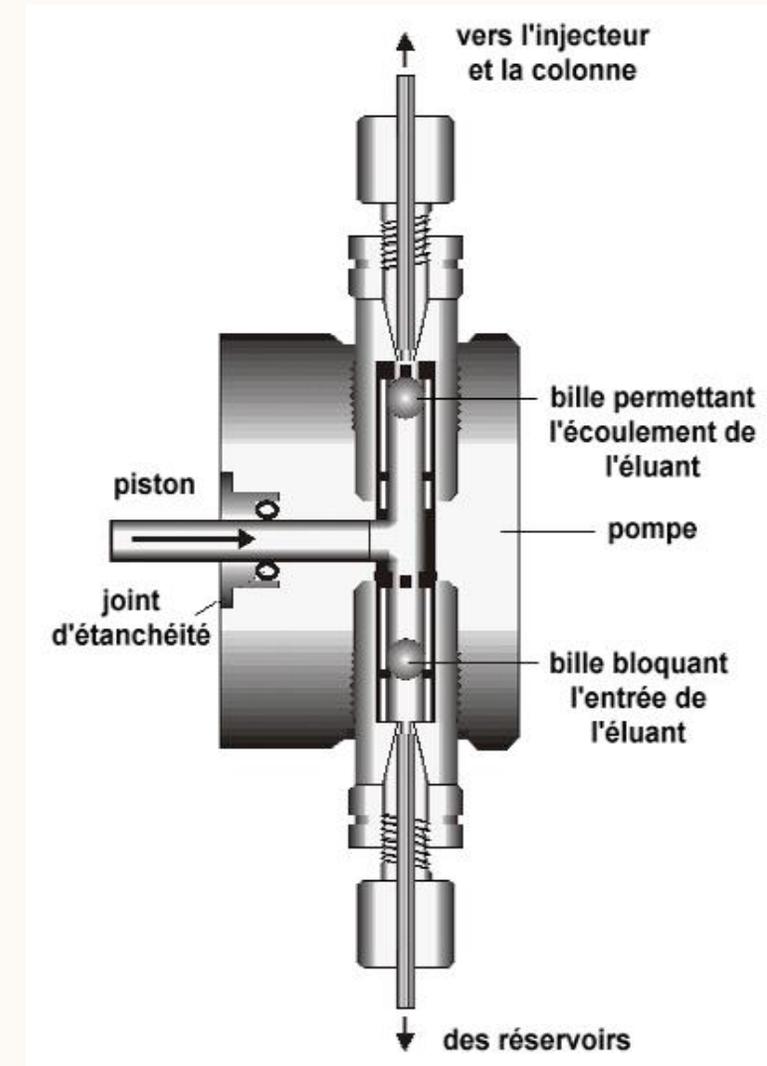
Deux types existent :

- Les pompes à pression constante.
- Les pompes à débit constant (les plus utilisées).

## 2. Pompes

On distingue:

- Pompes à **simple déplacement** : fonctionne comme une seringue : elle est munie d'un piston qui se déplace grâce à une vis sans fin. Il n'y a pas de pulsations mais le volume de solvant est limité (quelques ml).
- Pompe à **piston**: (la plus utilisée) le piston est entraîné par une excentrique, le ressort pousse le piston en permanence dans le sens du remplissage du corps de la pompe. Avantage: grand volume, mais il y a des pulsations

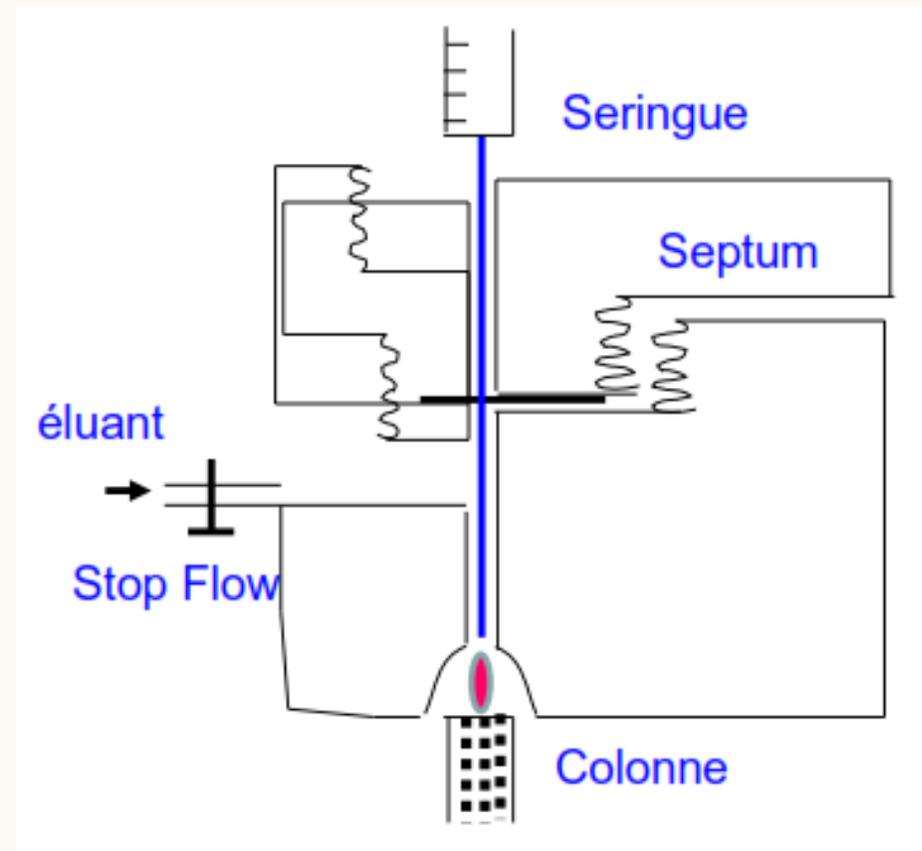


## 3. Système d'injection

- **Injecteur à seringue**

Il se rapproche des injecteurs utilisés en CPG.

On apporte l'échantillon par une **seringue** dont l'aiguille traverse un **septum** en caoutchouc ou en matière plastique, pour déposer l'échantillon au sommet de la **colonne** qui est placée sous le septum.



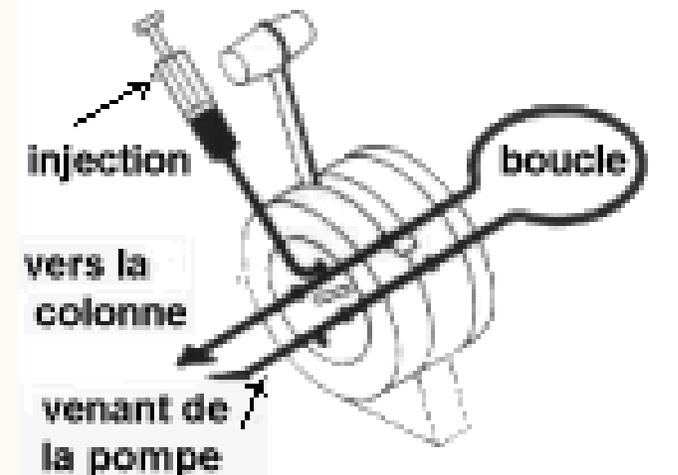
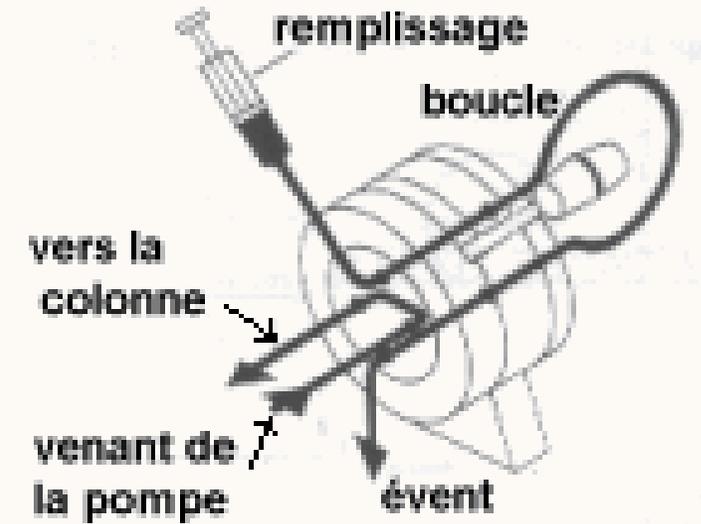
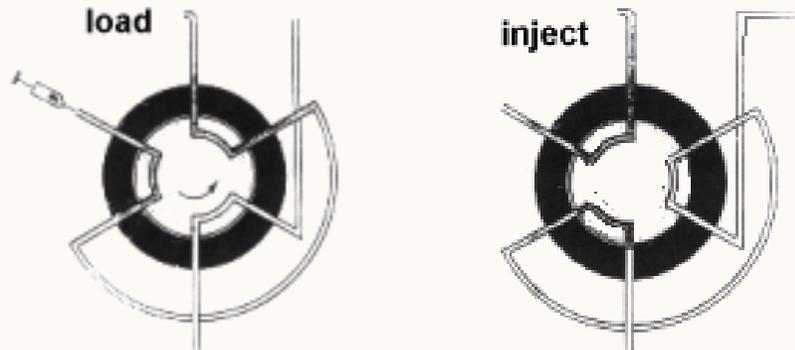
## 3. Système d'injection

### ▪ Vannes à boucle d'injection

C'est un injecteur à boucle d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes (10 à 100 $\mu$ L), on utilise en général une boucle de 20 $\mu$ L.

Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser.

Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.



## 4. Colonnes

En acier inoxydable rarement en verre mais toujours chimiquement inerte. La **phase stationnaire** est disposée à l'intérieur de la **colonne** où elle est retenue par une pastille en acier inoxydable fritté. Puis un **tube capillaire** conduit l'**éluat** vers le détecteur.

- Longueur de 10 à 30 cm
- diamètre interne de 4 à 20 mm
- granulométrie : 5 à 10  $\mu\text{m}$



## 5. Détecteur

Doivent répondre à certaines exigences :

- Signal proportionnel à la concentration (linéarité)
- Sensibilité (rapport signal/bruit)
- Réponse stable dans le temps (la dérive par rapport au temps)
- Faible temps de réponse
- Faible volume mort (volume de la cellule)

Il n'existe pas de détecteur universel, mais il faut le choisir en fonction des substances analysées.

## 5. Détecteur

Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un **spectrophotomètre d'absorption UV-visible** (190-600nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

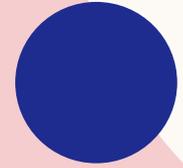
- réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes
- électrochimique
- fluorimétrique...

## 6. Enregistrement des chromatogrammes

- Enregistreur simple: Impose la mesure manuelle des pics pour l'analyse quantitative.
- Enregistreur – **intégrateur**: Obtention du chromatogramme suivi de l'inscription des aires des pics, automatiquement mesurées.

# TYPES DE CHROMATOGRAPHIE

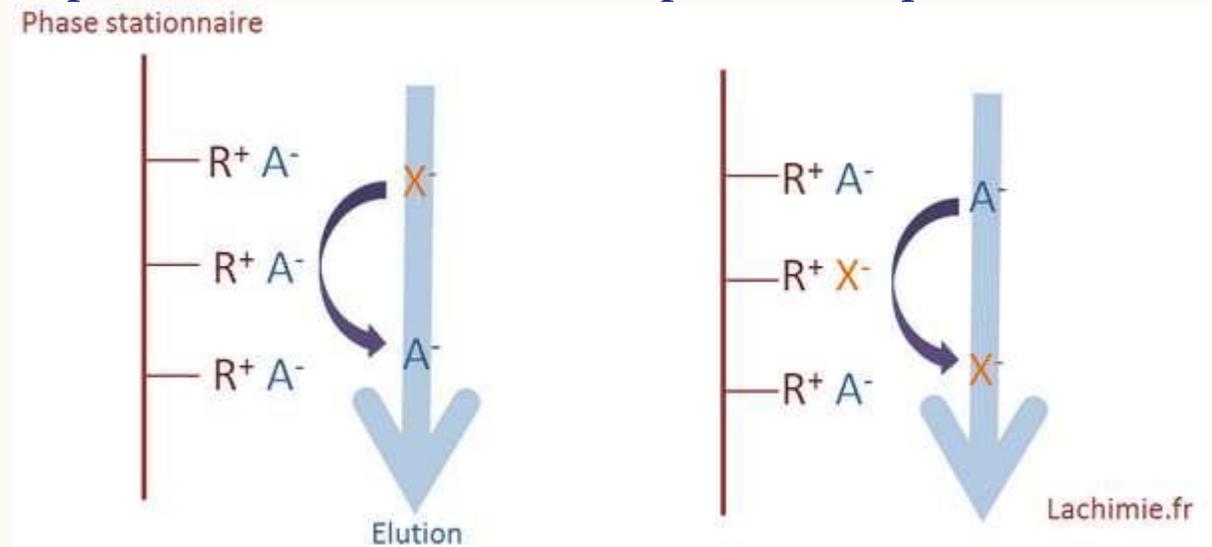
- Chromatographie sur couche mince (CCM)
- Chromatographie en phase gazeuse
- Chromatographie en phase liquide
- **Chromatographie ionique**



La chromatographie **ionique** (ou chromatographie par échange d'ions) est une technique de séparation des **ions** et des molécules polaires dans les liquides en fonction de leur affinité avec une **résine échangeuse d'ions**. Les ions sont fixés sélectivement à la résine de la colonne chromatographique d'où ils sont ensuite progressivement éliminés en fonction de leur **taille**, de leur **charge** et de leur **degré d'hydratation**. Chaque espèce ionique est ainsi séparée et détectée par **conductivité** à la sortie de la colonne.

## Principe

Prenons par exemple le cas de la séparation d'anions  $X^-$  d'une solution à analyser. Lorsque  $X^-$  est en contact avec la phase stationnaire, il y a un échange entre  $X^-$  et le contre-ion  $A^-$  de la phase stationnaire. Il sera ensuite chassé à son tour par un contre-ion présent dans la phase mobile. Au final  $X^-$  avance de sites en sites au cours de l'éluion. Selon la nature des ions élués, leur progression est plus ou moins rapide, ce qui permet une séparation des différentes espèces ioniques dans un mélange.



## Principe

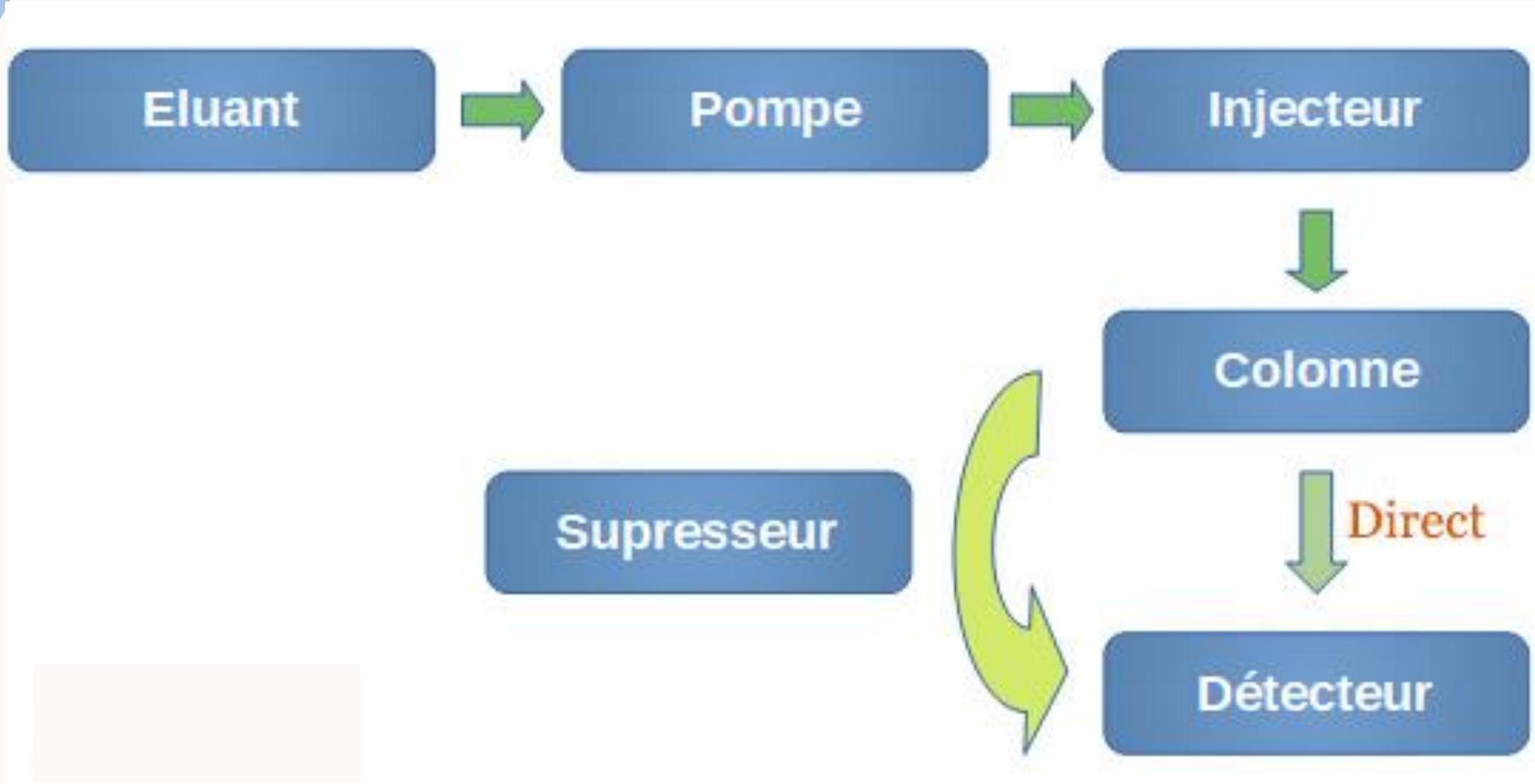
La vitesse d'éluion est dépendante des échanges ioniques entre la phase stationnaire et la phase mobile. Pour l'étude des **cations**, la colonne doit être de type **cationique** et possède des sites capables d'échanger des cations. Pour les **anions**, c'est l'inverse avec une colonne pouvant échanger des **anions**.

## Exemples de phases stationnaires

1. fortement acide:  $-\text{SO}_3-\text{H}^+$
2. faiblement acide:  $-\text{COO}-\text{H}^+$
3. fortement basique:  $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$
4. faiblement basique  $-\text{N}^+\text{H}(\text{R}_2)\text{Cl}^-$

## Applications

- **Environnement**, avec analyse des eaux usées, des eaux naturelles et de source, de l'eau de pluie et l'air ambiant, des rejets industriels liquides et gazeux, des eaux de chaudière.
- Domaines **pharmaceutique et alimentaire**.



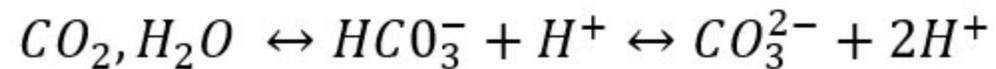
# CHROMATOGRAPHIE IONIQUE



## 1. Phase mobile (éluant)

Les éluants sont des solutions aqueuses qu'il faut préalablement traiter pour retirer le CO<sub>2</sub>.

En effet, celui-ci peut former des carbonates selon l'équilibre ci dessous :



La formation de carbonates modifie la concentration initiale de ces ions et par conséquent engendre une modification des conditions de séparation. Plusieurs solutions permettent de palier à ce problème :

- Utilisation d'un absorbant à la chaux
- Réalisation d'un bullage à l'Hélium (plus coûteux)

L'éluant est ensuite dégazé dans une enceinte sous vide.

## 2. Suppresseur

Le supprimeur d'ions est indispensable dans l'analyse des anions. Il peut être chimique, à membrane ou électrolytique. Le supprimeur est placé juste avant le détecteur et permet d'avoir un rapport signal/bruit beaucoup plus élevé en modifiant la nature des ions arrivant au détecteur.

Dans le cas des cations, le supprimeur n'est pas indispensable mais il permet toutefois de diminuer le bruit de l'analyse.

### Exemple d'analyse d'anions

- Echantillon : solution de NaCl
- Phase mobile : solution de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Supprimeur électrolytique
- Détecteur : conductimètre

## 2. Suppresseur

Le signal du détecteur est proportionnel à la concentration en ions. En l'absence de suppresseur, la solution arrivant au détecteur contient les ions **Na<sup>+</sup> de l'échantillon et de l'éluant**, les ions Cl<sup>-</sup> de l'échantillon et les ions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> de l'éluant.

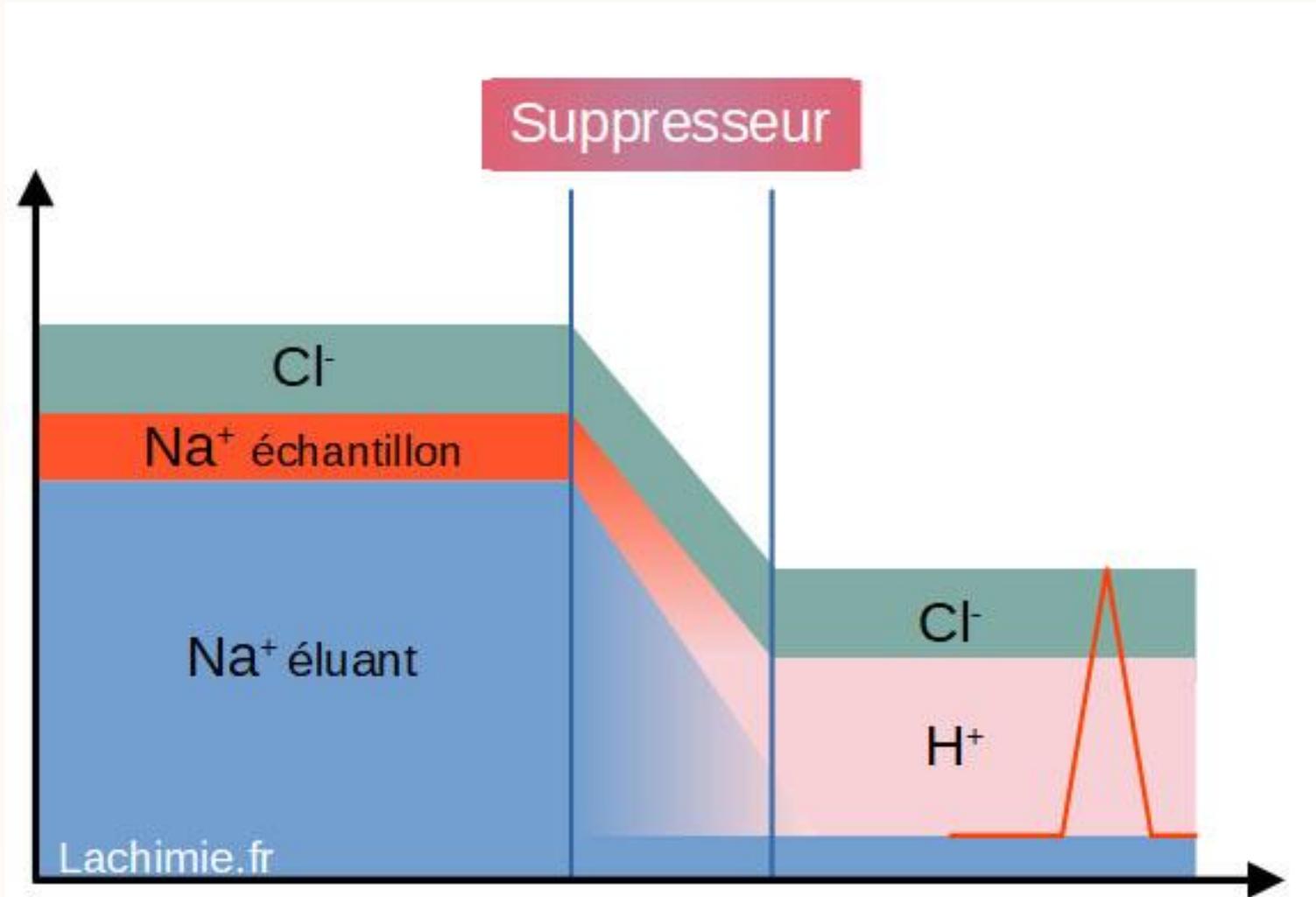
En présence d'un suppresseur électrolytique les ions Na<sup>+</sup> vont être remplacés par des ions H<sup>+</sup>.

Ces derniers vont réagir avec les ions carbonates CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> pour former de l'acide carbonique H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> qui n'est pas conducteur. Le signal obtenu sera donc uniquement dû à la présence des chlorures Cl<sup>-</sup> et des protons issus de l'échange des ions sodium Na<sup>+</sup> de l'échantillon.

La conductivité molaire des protons étant très élevée,

le signal est également amélioré.

## 2. Suppresseur



## 3. Pompe et injecteur

La pompe est identique à celle d'une HPLC mais sa pression est limitée pour protéger les colonnes, plus fragiles que pour l'HPLC. La pompe et l'injecteur sont fabriqués dans des matériaux inertes (aucune partie métallique est en contact avec les solvants).

## 4. Four et colonne

Les mesures sont sensibles aux variations de température. La colonne est donc placée dans un four. La cellule du conductimètre peut également être mise dans l'enceinte thermostatée pour une meilleure stabilité des résultats.

## 3. Détecteur

Le détecteur le plus fréquent est un **conductimètre** en ligne. La cellule est composée de 2 électrodes planes. La conductivité de la solution se situant entre ces deux plaques est mesurée. Les pics du chromatogramme correspondent à la **variation de la conductivité lors du passage des ions**.

Les détecteurs à **ampérométrie** sont également courants mais leur spécificité les rendent moins polyvalents. On peut rencontrer des détecteurs UV/visible ou électrochimiques. Des couplages masse ou ICP sont également possibles.



# CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

93

## Avantages

- Grand débit, grande sélectivité
- Grande capacité
- Très haut rendement
- Concentration de l'échantillon

## Inconvénients

- pH dépendant
- Protéines en concentration saline élevées en fin de purification
- L'échantillon doit être injecté à une faible concentration saline
- Présence de “paquets” de charges (+) peut générer une charge globale nette négative (-) de la protéine sur une résine échangeuse de cation et vice versa
- Le profil de séparation peut être modifié avec de faibles variations de pH
- La charge du tampon doit être la même que celle du mode IEX (Cation ou anion) pour ne pas interférer avec la molécule à purifier (si nous faisons un échange d'anion le tampon doit être chargé négativement et inversement pour un échange de cation)