

Techniques chromatographiques

1-Généralités :

La chromatographie, méthode d'analyse immédiate, sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé). La première chromatographie a été réalisée en 1906 par le botaniste russe Mikhaïl Tswett et consistait à séparer les pigments d'une feuille d'épinard. Tswett avait observé la séparation des colorants végétaux, dont les chlorophylles, lorsqu'il filtrait leur solution dans l'éther de pétrole, sur une colonne de carbonate de calcium (CaCO_3). Dans ces conditions, en effet, des zones colorées vertes et jaunes se forment, ce qui explique l'origine du nom de la méthode en grec. Chroma : signifie «couleur» et graphein «écrire».

2- Les grandes étapes de l'évolution de la chromatographie :

1906 - Le botaniste russe, M. TSWETT, publie son livre: "Les chromophylles dans le monde végétal et animal", où sa méthode de séparation de pigments est décrite en détail.

1931 - KHUN et LEDERER séparent à une échelle préparative les carotènes et des xanthophylles. Le long sommeil de la méthode de Tswett est rompu ; elle se développe rapidement, grâce aussi aux travaux de BROCKMANN, KARRER, WINTERSTEIN et ZECHMEISTER.

1938 - REICHSTEIN introduit le "chromatogramme liquide" permettant des séparations de substances incolores. Cette forme de chromatographie est depuis, très largement utilisée.

1940-1943 - TISELIUS met au point ses méthodes d' "analyse frontale" et de "développement par déplacement".

1941 - MARTIN et SYNGE introduisent la chromatographie d'adsorption sur gel de silice. Dorénavant, au lieu de quelques grammes de protéine, quelques milligrammes sont suffisants pour l'analyse des acides aminés neutres.

1944 - CONSDEN, GORDON et MARTIN inventent la chromatographie de partage sur papier, méthode très ingénieuse, permettant d'analyser non plus quelques milligrammes, mais quelques grammes d'acides aminés, de sucres, etc.

1940-1947 - WILSON, DEVAULT, WEISS, GLÜCKAUF, MARTIN, SYNGE et d'autres développent des théories détaillées de la chromatographie.

1947 - Un groupe de chercheurs américains, dont BOYD, MARINSKY, SPEDDING, TOMPKINS, etc., publient des détails de leurs travaux de séparation de terres rares et de corps radioactifs sur échangeurs d'ions. Ces recherches ont permis des séparations importantes à une échelle industrielle et sont à la base de la fabrication de certains isotopes actuellement sur le marché. La chromatographie s'est ainsi assurée une place importante en Chimie minérale.

3-Principe :

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

Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille, la forme, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers, la polarité, la charge électrique.

4-les différents types de chromatographie

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon trois modalités différentes :

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

4.1 Classification selon la nature physique 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 fixé sur un support solide.

Donc selon le type des phases mobile et solide on distingue:

La chromatographie liquide-solide(LSC).

La chromatographie liquide-liquide(LLC).

La chromatographie gaz-liquide (GLC ou GC).

La chromatographie gaz-solide (GSC-GC).

La chromatographie supercritique (SFC).

4.2 Classification selon le phénomène chromatographique

Ce dernier dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée. On distinguera donc :

- ☞ La chromatographie d'adsorption : c'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide.
- ☞ La chromatographie de partage : c'est une chromatographie liquide-liquide. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte. cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.
- ☞ La chromatographie sur échangeurs d'ions : la phase stationnaire est un échangeur d'ion constitué par une résine porteuse de groupement ionisés négativement ou positivement exerçant des interactions de type électrostatiques avec les solutés ioniques du milieu.
- ☞ La chromatographie d'exclusion : appelée aussi tamisage moléculaire ou perméation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel.
- ☞ La chromatographie d'affinité : la phase stationnaire est un support chimiquement inerte, sur lequel est greffé un secteur qui présente une bio-affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité entre enzyme-substrat, enzyme-effecteur, antigène-anticorps).

4.3 Classification selon les procédés utilisés :

Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :

- ☞ La chromatographie sur colonne.
- ☞ La chromatographie sur papier.
- ☞ La chromatographie sur couche mince.

Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera :

- ☞ La chromatographie par développement (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire).
- ☞ La chromatographie d'élution (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).

5-Terminologie générale de la chromatographie :

- ☞ élution : percolation d'un composé sur une colonne.
- ☞ éluat : solution recueillie au bas de la colonne.
- ☞ Soluté: toute substance constituant d'un mélange, séparée par chromatographie.
- ☞ Phase mobile: le vecteur, liquide ou gazeux, qui déplace le soluté.
- ☞ Phase stationnaire: le produit qui, par ses affinités avec les solutés, va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace.
- ☞ Support: Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire.
- ☞ Remplissage: l'ensemble des produits (adsorbant, support + phase stationnaire, etc...) qui garnissent une colonne chromatographique.
- ☞ Colonne chromatographique: tube de diamètre et longueur variable, en verre, métal, ou autre substance, à l'intérieur duquel s'opèrent les séparations chromatographiques.
- ☞ Développant: une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, de telle manière qu'ils demeurent dans celle-ci : cas de la CP et de la CCM.
- ☞ Éluant: une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, jusqu'à ce qu'ils sortent de celle-ci.
- ☞ Rapport frontal: rapport entre la distance parcourue par un soluté dans une phase stationnaire et la distance parcourue en même temps par le développant(solvant).
- ☞ Coefficient de partage: rapport des concentrations respectives du soluté dans la phase stationnaire et la phase mobile, au cours de l'analyse.
- ☞ Valeurs de rétention: toutes données qui permettent de chiffrer l'action spécifique d'une phase stationnaire donnée sur un soluté donné, au cours d'une analyse chromatographique.
- ☞ Chromatogramme: trace sur un papier enregistreur des réponses successives du détecteur, au cours de l'élution des solutés hors des colonnes.