

## **1. DEFINITION et PRINCIPE**

La chromatographie, procédée d'analyse immédiate, sert à séparer des constituants d'un échantillon. Elle est utilisée en analyse pour quantifier et identifier des molécules dans un mélange. Le principe de base de tout système chromatographique est la répartition ou la distribution des composés d'un échantillon (analyte) entre deux phases non miscibles. L'une de ces phases, appelée phase stationnaire immobile (solide ou liquide), est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support, l'autre appelée phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique) est en contact étroit avec la première. Si plusieurs molécules sont présentes dans l'échantillon, chacune d'elle est soumise à une force de rétention exercée par la phase fixe (affinité de la molécule pour cette phase), et à une force de mobilité exercée par la phase mobile (l'entraînement dépend principalement de la solubilité du soluté dans la phase mobile). Le résultat de la séparation est en fonction du coefficient de partage du soluté **K** entre les deux phases, dont les molécules retenues par la phase fixe migrent lentement par rapport à la phase mobile, cependant celles solubles dans cette dernière migrent plus rapidement mais leurs vitesses de déplacement ne dépassent jamais celle de la phase mobile. Cette différence de déplacement provoque la séparation des molécules de l'échantillon en spots.

Le coefficient de partage, de partition ou de distribution est le paramètre physico-chimique de base en chromatographie qui permet de calculer le rapport de concentration du soluté entre les deux phases :

$$K = \frac{\text{Concentration de l'analyte dans la phase stationnaire}}{\text{Concentration de l'analyte dans la phase mobile}}$$

## **2. CLASSIFICATION des METHODES CHROMATOGRAPHIQUES**

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon trois manières :

- La nature physique des phases : Dans cette classification, la phase stationnaire est un solide ou un liquide immobile fixé sur un support, alors que la phase mobile est un fluide qui peut être soit liquide soit gaz.
- Le principe du phénomène mis en jeu dans la séparation : adsorption, affinité, partage, d'exclusion, échangeurs d'ions.

- La méthode mise en œuvre (support de la phase stationnaire) : colonne ou papier (couche mince).

### **3. CHROMATOGRAPHIE de PARTAGE**

#### **3.1. Principe**

La chromatographie de partage est une chromatographie liquide-liquide basée sur les différences de solubilité des solutés à séparer entre deux phases liquides non miscibles, une mobile et autre stationnaire (liquide immobilisé sur un support inerte). Le principal facteur intervenant dans cette séparation est le coefficient de partage (K) des molécules entre les deux phases. Les molécules ayant des coefficients de partage différents se séparent facilement, et plus que le coefficient de partage est faible, plus que le soluté est moins retenu. A l'équilibre et à une concentration donnée des molécules, le coefficient de partage peut-être défini comme étant le rapport des concentrations de la molécule dans les deux phases:

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

Dont :  $C_s$  et  $C_m$  représentent la concentration des molécules dans la phase stationnaire et mobile, respectivement.

Plus que le coefficient de partage, la polarité des phases est un autre facteur qui intervient dans la séparation des molécules, et selon lequel on distingue deux modes de chromatographie, mode normale et inversé.

#### **3.2. Appareillage**

##### **3.2.1. Supports**

Les supports sont des solides inertes vis-à-vis la phase stationnaire et mobile et qui, de plus, doivent être très finement divisés et présentent une très grande surface sur laquelle est fixée une grande quantité du liquide comme la poudre du cellulose et le gel de silice..

##### **3.2.2. Solvants**

Le partage d'un soluté est effectué entre deux solvants de développement non-miscibles et de polarités différentes, l'un fixe sur le support et l'autre mobile.

##### **3.2.3. Phase stationnaire**

Selon la préparation de la phase stationnaire, on distingue deux type de chromatographie : chromatographie liquide-liquide (fixation du liquide par adsorption physique sur la surface du support) et chromatographie liquide-phase greffée (fixation du liquide par vraie liaison chimique sur le support).

La phase stationnaire modernes et la plus utilisée grâce à sa grande stabilité est celle en phase greffée, dont les liaisons chimiques les plus employées sont de nature aliphatique. On distingue :

- *Chromatographie en phase normale* : la phase stationnaire hydrophile (polaire) est greffée sur la silice alors que la phase mobile est hydrophobe (apolaire).

- *Chromatographie en phase inversée* : la phase stationnaire est hydrophobe alors que celle mobile est hydrophile.

### **3.2.4. Phase mobile**

La phase mobile ou l'éluant doit posséder un pouvoir solvant et une inertie chimique vis-à-vis les mélanges à analyser. Il doit être aussi inerte chimiquement et insoluble (immiscible) vis-à-vis la phase fixe. La polarité de la phase mobile influe grandement sur le coefficient de partage des substances et donc leur élution. Au cours de la chromatographie, on distingue de régimes de la phase mobile, le régime isocratique avec une seule composition et le régime en gradient avec une composition variable.

## **4. CHROMATOGRAPHIE d'ADSORPTION**

### **4.1. Principe**

La méthode est basée sur la répartition des molécules entre l'adsorbant fixé sur un support inerte (phase stationnaire) et l'éluant (phase mobile). Chacune des molécules est soumise à deux différentes forces, une force de rétention exercée par l'adsorbant et la force d'entraînement exercée par l'éluant (Fig. 01). La migration différentielle des molécules du mélange à analyser permet leur séparation.

L'adsorption est la fixation des particules d'un échantillon par la phase stationnaire. Cette interaction est mise en place grâce à l'établissement de liaisons en surface, entre l'adsorbant et les particules adsorbées, de type dipôle-dipôle, dipôle-ion ou liaison Van der Waals. La désorption est la mise en solution des molécules adsorbées par coupure des

liaisons précédentes. Les sites actifs de l'adsorbant peuvent être liés avec les particules du soluté ou la phase mobile.

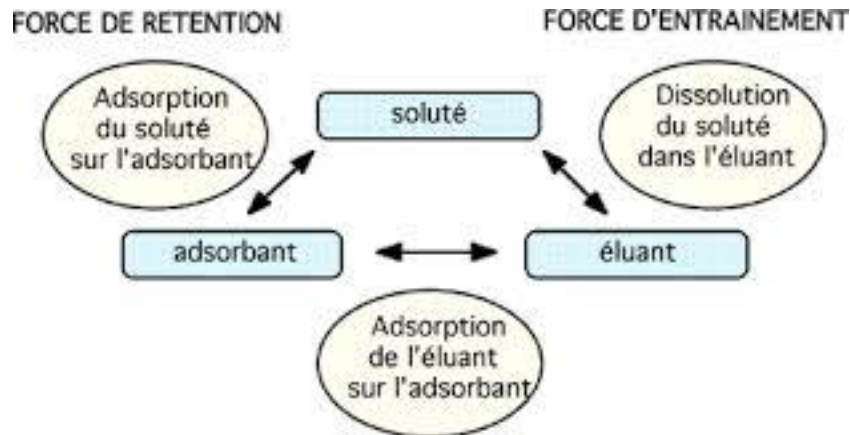


Figure 01 : Interactions entre le soluté, l'adsorbant et l'éluant

## 4.2. Élément de la chromatographie d'adsorption

### 4.2.1. Adsorbant

Il doit être poreux, finement broyé et réduit en particule de faible diamètre. Il existe plusieurs types d'adsorbants comme l'alumine  $Al_2O_3$  et la silice  $SiO_2$ .

La qualité d'un adsorbant dépend de son homogénéité, sa surface, sa teneur en eau et sa pureté. Il est caractérisé par :

- *La capacité d'adsorption* : il existe deux types d'adsorbants, forts adsorbants comme le gel de silice ou d'alumine active (capacité élevée d'adsorption) et faibles adsorbants comme l'insuline, le talc ou le carbonate de sodium (capacité faible d'adsorption).
- *La polarité* : certains adsorbants présentent une faible polarité tels que le charbon actif, cependant certains d'autres ont une forte polarité tels que le gel de silice ou l'alumine.
- *La granulométrie* : les adsorbants sont commercialisés sous forme de granules, plus que les grains sont fins plus que la séparation est bonne mais plus lente.

### 4.2.2. Solvants

Il doit être inerte vis-à-vis la molécule adsorbée et l'adsorbant. Dans chaque système chromatographique, on choisit le solvant de fixation et celui d'éluion en fonction de la nature des molécules à séparer (la polarité). Lorsque l'adsorbant est apolaire, le solvant de fixation doit être le plus polaire possible. L'éluion est débutée avec un solvant moins polaire puis poursuivie avec des solvants de plus en plus moins polaires jusqu'au solvant apolaire

qui a, dans ce cas-là, un pouvoir éluotropique le plus élevé, et vis vers ça pour les adsorbants polaires.

### **4.3. Techniques expérimentales**

#### **4.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

La CCM également connue sous le nom Chromatographie Planaire (CP), est une méthode qualitative, sensible, de faible coût et capable de réaliser plusieurs séparations en parallèle. Elle utilise une phase stationnaire plane préparée avec l'acétate la cellulose ou de silice (le plus répandu). Ce dernier doit être fixé sur un support plat en verre ou aluminium.

##### **4.3.1.1. Appareillage et Principe**

- *La cuve chromatographique* : enceinte habituellement en verre, de forme variable et close pour maintenir une atmosphère saturée en eau ou en solvant organique (Fig. 02).

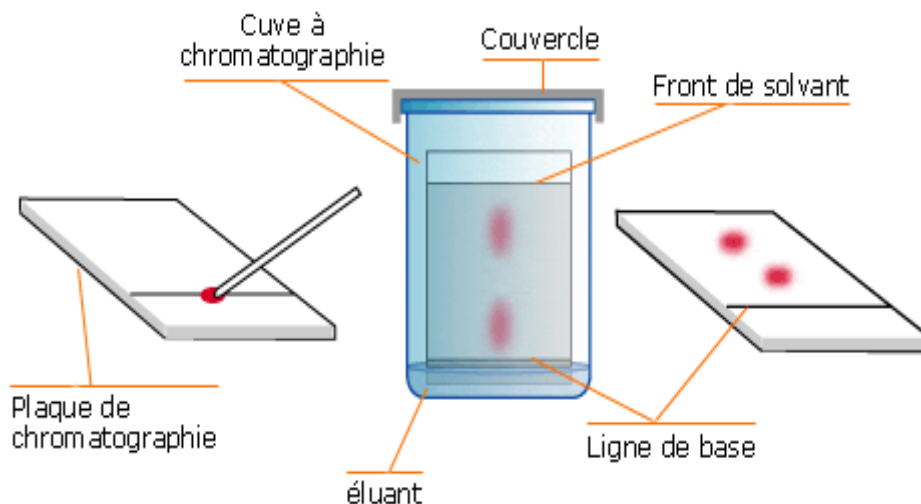
- *L'échantillon (analyte)* : mélange de molécules à séparer (entre 0.5 et 10 µl) déposé en un point fixe au bas de la plaque (la surface).

- *La phase stationnaire (les plaques ou adsorbants)* : une couche fine de l'ordre de 0.2 mm mélangée avec un liant et uniformément étalée sur un support comme : le Gel de silice, l'alumine, la célite et la Poudre de cellulose. L'homogénéité et la granulométrie déterminent l'efficacité d'une CCM.

- *La phase mobile (éluant)* : un solvant pur ou un mélange de solvants de basse polarité qui se déplace lentement le long de la plaque en entraînant les particules de l'échantillon. Le choix de l'éluant est déterminé par le procédé de sorption utilisé et par la nature des composants de l'échantillon.

##### **4.3.1.2. Dépôt de l'échantillon**

L'échantillon est dissout dans un solvant volatile, peu polaire et qui n'est pas forcément le même que l'éluant. Il doit être appliqué sur la plaque CCM avec un soin extrême soit manuellement via un tube capillaire, soit avec une micropipette ou une microsiringue en verre calibrée de telle sorte que la goutte émergente touche juste la surface de la plaque (juste un point) (Fig. 02). On peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte (0.4 - 0.5 mm<sup>3</sup>) au même point pour le concentrer, mais chaque dépôt doit être séché avant l'application d'un autre.



**Figure 02:** Différents constituants d'un montage CCM

#### 4.3.1.3. Développement de la plaque

Une fois que la plaque chromatographique est préparée et que les échantillons y sont appliqués, elle est placée dans la cuve en immergeant le bord inférieur dans l'éluant à une profondeur de 0,5 à 1 cm. Ainsi, il est important de maintenir l'atmosphère dans la cuve saturée en vapeur de la phase mobile, pour cela, un papier filtre imbibé du solvant doit être placé contre ses parois.

Le flux de solvant est forcé de s'arrêter lorsque le front atteint la ligne d'arrêt créée près du haut de la plaque avec un crayon pointu (Fig. 02). Cependant, la plaque ne doit pas être laissée debout dans la cuve pendant une longue période après que le front a atteint la ligne d'arrêt.

#### 4.3.1.4. Révélation des substances séparées

La révélation des spots est mise en place en utilisant différentes méthodes. Les substances colorées sont bien sûr visibles sous forme de taches séparées à la fin de l'analyse, cependant, celles incolores nécessitent une détection chimique ou physique (Fig. 02).

Les méthodes chimiques de détection utilisent des réactifs de localisation, ou réactifs chromogènes, sur la plaque CCM. La plaque de CCM est pulvérisée avec le mélange réactif/solvant approprié, et donc un dérivé coloré est produit qui rend les spots invisibles visibles. Le chromatogramme peut être pulvérisé avec le réactif ou complètement plongé dans une solution de réactif chromogène, mais cette dernière risque de perdre quelques

particules de la plaque ou un étalement des taches. Pour les méthodes physiques, il existe plusieurs procédés parmi lesquels les rayons ultraviolet.

#### **4.3.1.5. Etude théorique**

Le rapport de la distance de migration de l'analyte sur celle de l'éluant correspond au facteur de retardement  $R_f$  (Rate of Flow), dont la valeur est comprise entre 0 et 1.  $R_f$  est constant pour un analyte donné mais varie selon les conditions expérimentales telles que la nature de la phase stationnaire et de l'éluant, la température, l'humidité, etc.

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le front de solvant}}$$

#### **4.3.1.6. Applications de la CCM**

La CCM est une simple méthode dont les applications sont nombreuses dans différents domaines, analyses agroalimentaires, pharmaceutiques, toxicologiques, biologiques, environnementales, etc. Citons quelques exemples :

- La recherche d'impureté ou substance apparentées aux principes actifs dans ces matières premières (pharmacie) comme : la benzophénone impureté de la phénytoïne (254 nm) et 4-biphényl-ol impureté du diflunisal (254 nm).
- La recherche des molécules toxiques notamment les antidépresseurs, neuroleptiques, hypnotiques, anxiolytiques, antalgiques, etc.
- La CCM indique le nombre des analytes dans un échantillon
- Une CCM réalisée avec plusieurs éluant et adsorbant révèle la présence d'un seul composée, on peut le considérer comme pur.

### **4.3.2. Chromatographie sur Colonne**

#### **4.3.2.1 Principe et description**

Cette méthode est fondée essentiellement sur les phénomènes d'adsorptions. Une colonne de différentes dimensions est remplie de la phase fixe (alumine ou silice), l'échantillon, mis au sommet de la colonne, est entraîné à l'intérieur grâce à l'écoulement de l'éluant le long de la colonne en résultant, ainsi, la séparation des particules. Le déplacement de l'éluant (un seul solvants ou mélange) est effectué par gravité ou sous l'influence d'une faible pression externe. Les particules se répartissent dans la colonne selon leur affinité pour la phase fixe et leur solubilité dans la phase mobile. Chaque particule sortante doit être recueillie.

#### 4.3.2.2. Facteurs influant la séparation

Les quatre paramètres intervenant dans la séparation et l'isolement des particules sont : l'adsorbant, l'éluant, les dimensions de la colonne et la vitesse d'élution.

**a. Adsorbant** : les adsorbants les plus utilisés pour préparer la phase stationnaire sont le gel de silice ( $\text{SiO}_2$ ) et l'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

- *Alumine* : puissant, utilisé pour l'adsorption des composés organique stables, à savoir : les hydrocarbures aromatiques et insaturés, les caroténoïdes, les stéroïdes, les alcaloïdes et les acides aminés. Il représente quelques inconvénients qui expliquent en grande partie l'utilisation préférée du gel de silice.

- *Gel de silice* : une poudre blanche utilisée principalement pour séparer les composés organiques instable ou possèdent une stabilité insuffisante pour être adsorbés sur alumine.

**b. Eluant** : doit être soluble et interagir avec les particules de l'échantillon et non pas avec l'adsorbant. Il est souvent un mélange de solvant (polarité accroître au cours de l'opération) qui se déplace le long de la colonne en entrainant avec lui les particules de l'échantillon.

**c. Dimension de la colonne** : la colonne est le support de l'adsorbant et à travers laquelle l'éluant passe (verre, plastique ou inox). Généralement, les colonnes préparées pour cet usage ont à leur base une plaque de verre fritté qui permet l'élution de la phase mobile tout en empêchant le passage de la phase stationnaire. (Fig. 03).



**Figure 03:** Colonne classique

**d. Vitesse d'élution** : doit être plus constante possible. Pour une bonne séparation, les particules à séparer doit être plus près de l'équilibre (en équilibre) entre les deux phases et donc la vitesse doit être suffisamment lente. Elle ne doit pas trop lente ou trop rapide.

#### 4.3.2.3. Remplissage de la colonne

Le remplissage de la colonne doit être effectué avec soin et la phase stationnaire doit totalement tasser et dépourvu des bulles d'air ou fissures. Les deux surfaces de l'adsorbant doivent être parfaitement uniformes et horizontales.

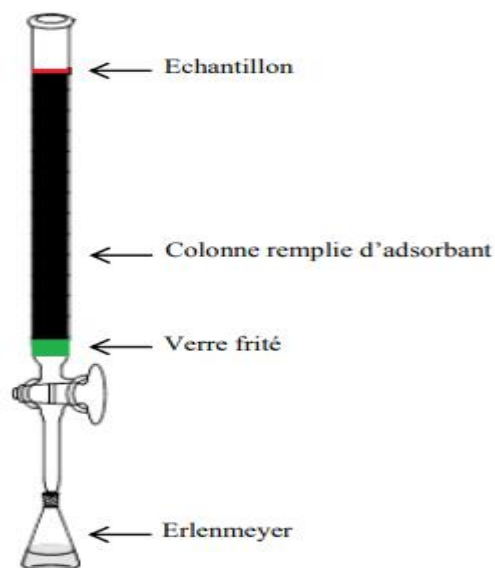


#### **4.3.2.4. Introduction de l'échantillon**

Les échantillons sont mis au sommet de la colonne tel quel, alors que ceux solides doivent dissoudre dans un petit volume du solvant le moins polaire de deux solvants. Il doit être coulé soigneusement au sommet, en une seule fois pour éviter toute turbulence et former une couche cylindrique, fine et uniforme (robinet fermé). Ensuite, le robinet est ouvert un court temps pour que l'échantillon puisse pénétrer dans l'adsorbant.

#### **4.3.2.5. Développement ou élution**

L'alimentation en solvant est faite manuellement ou avec une ampoule de coulée. Au cours de la chromatographie, la surface de l'adsorbant ne doit être jamais en contact avec l'air, et on doit s'assurer que le débit de l'alimentation en solvant est le même que celui de l'élution (Fig. 04). On recueille les fractions séparées dans des flacons et les conservées pour l'analyse.



**Figure 04:** Schéma d'une colonne chromatographique classique