**Chapitre 1 : Méthodes chromatographiques**

# Généralités

## Définitions

C’est une méthode de séparation non destructive. Il y a deux phases :

-une phase stationnaire (immobile)

-une phase mobile

On cherche à séparer les solutés (=substance à séparer) qui sont de nature différente avec une affinité différente pour les deux phases. Ils mettent plus ou moins de temps pour parcourir le trajet de la phase mobile.

## Applications

Il y a deux grands objectifs :

* *Analytique* : quantifier et/ou analyser
* *Préparatif* (technique d’extraction), substances rares (faible quantité ~1Kg/jour)

Ces techniques chromatiques vont souvent être couplées à d’autres techniques analytiques.

*Remarque : les quantités a analysées sont extrêmement faibles (mg/Kg), il faut donc que les techniques avec lesquelles elles sont couplées soient très sensibles.*

*Exemple* : ces techniques vont permettre de séparer les PCB dans l’eau ; les acides gras dans les huiles ; les vitamines dans les fourrages ; les pesticides dans les légumes ; les composés odorants dans les poissons ; les mycotoxines dans les céréales ; les sucres dans les fruits.

## Classification

### Nature de la phase stationnaire

Cette phase stationnaire peut être :

* adsorbant solide (coller dessus)

On parle de chromatographie d’adsorption

* liquide imbibé sur un support inerte (billes sur les bords avec liquide visqueux)

On parle de chromatographie de partage

* solide poreux (complètement rempli de billes avec des canaux à l’intérieur)

On parle de chromatographie d’exclusion (ou de tamisage moléculaire)

* effecteur à bio-affinité sur un support inerte (anticorps, enzymes-substrat)

On parle de chromatographie d’affinité

* ions sur une résine

On parle de chromatographie d’échange d’ions

### Support de la phase stationnaire

Il y a différents supports pour la phase stationnaire :

* colonne en verre ou en métal

On parle de chromatographie sur colonne

* plaque inerte en verre ou cela

On parle de chromatographie sur couche mince

* phase stationnaire (sur papier particulier)

On parle de chromatographie sur papier

*Remarque : les produits qui garnissent la colonne sont appelés « remplissage » et la phase mobile « éluant ou « développant ».*

### Nature de la phase mobile

Selon la nature de la phase mobile :

* gazeuse : chromatographie en phase gazeuse
* liquide : chromatographie en phase liquide

*Remarque : dans le cas d’une chromatographie sur colonne :*

* *si la phase mobile est un gaz : On parle de chromatographie en phase gazeuse (CPG)*
* *si la phase mobile est liquide et soumise à une pression pouvant atteindre plusieurs centaines de bars : On parle de chromatographie liquide de haute pression (HPLC)*

# Chromatographie sur couche mince (CCM)

## Méthodologie

### Dépôt de l’échantillon

On dépose de l’ordre du µL en un point précisément repéré (à la micropipette ou au tube capillaire) sur la phase stationnaire (~1cm de la partie inférieure).

L’échantillon est une solution à 2-5% de solutés dans le solvant volatil (souvent di ou trichlorométhane ou propanone).

La phase stationnaire est une couche de 0,25µm souvent du gel de silice (ou alu, cellulose…).

*Remarque : pour avoir une séparation optimale, le diamètre du dépôt doit être < 3mm.*

Pour augmenter la quantité déposée, il faut faire plusieurs dépôts au même endroit en séchant entre chaque dépôt.

### Développement

La phase stationnaire (=plaque chromatographique) est placée verticalement dans une cuve chromatographique contenant la phase mobile (ou de développement) (=solvant ou mélange de solvant). La cuve est récipient rectangulaire en verre.

La phase mobile parcourt la phase stationnaire par capillarité en entrainant les solutés.

### Repérage des solutés

Après le repérage du niveau atteint par le solvant (tracé un trait), on sèche (à l’air libre ou au séchoir). On calcule le rapport frontal ou retarding factor (noté Rf) caractéristique d’un soluté.

d1 correspond à la distance parcourue par le soluté (centre de la tâche)

ds correspond à la distance parcourue par le solvant

*Remarque : si les solutés sont incolores, il y a nécessité de révéler (radiation UV, iode, fluorescence…).*

## Principe de la séparation

Un soluté va avoir une vitesse propre, en fonction de :

* Adsorption sur la phase stationnaire
* Solubilité dans la phase mobile

La vitesse est fonction de la nature du soluté et de la nature du solvant et de la nature de la phase stationnaire. Il est nécessaire de bien choisir le solvant et la phase stationnaire en fonction des solutés. Pour avoir le lieu où il monte on additionne les deux flèches, ici c’est B qui monte le plus haut, donc sa vitesse est plus rapide.

*Exemples*  de développant : solutés polaires (méthanol, éther, …) ; solutés intermédiaires (acétonitrile, acétone, …) ; solutés apolaires (hexane, toluène…).

*Remarque : la phase mobile peut avoir souvent un mélange très complexe. Ne pas partir à l’aveuglette, il faut chercher dans les travaux déjà effectués (consulter des docs).*

## Applications

Les grandes familles d’application :

* Vérification de l’identité de composants présumés : dépôt des composants présumés et de l’échantillon : comparaison des Rf (sucrés dans un jus de fruit)
* Contrôle aisé et rapide de la pureté : analyse avec différents solvants et différents absorbants : obtention d’une seule tâche (additifs alimentaires)
* Suivi de la progression d’une réaction : indication du nombre de composants (hydrolyse de triglycérides)

# Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

## Appareillage

Il y a 5 éléments. (cf figure 1)

Selon l’affinité, les solutés vont plus ou moins vites dans la colonne. Lorsqu’ils sortent on a sur l’ordi : un pic chromatographique.

### Injecteur

#### Injection seringue

L’échantillon (liquide ou gaz) est injecté par une seringue (quelques µL) piquée à travers une pastille d’élastomère assurant l’étanchéité = le septum (rondelle en caoutchouc).

La chambre de vaporisation va être chauffée à haute température (250°C) pour que l’échantillon devienne du gaz.

La chambre de vaporisation va être balayée en continue par la phase mobile = gaz vecteur pour entraîner l’échantillon vers la colonne.

*Remarque : le gaz vecteur doit être pur (à 99,99999%) et inerte pour ne pas polluer ou modifier l’échantillon, c’est souvent de l’azote, hélium ou hydrogènes (fonction du détecteur).*

#### Vanne d’injection

La plus utilisée c’est la vanne d’injection 6 voies. Elle est composée de deux cylindres (pleins) superposés en acier :

- un cylindre mobile à 3 rainures

- un cylindre fixe percé à 6 trous

Il y a une rotation de 60°, on va avoir deux circulations différentes des gaz (par rainure y a deux trous).

Un échantillon remplit la boucle d’échantillonnage : position balayage. Puis le gaz vecteur injecte l’échantillon dans la colonne : position injection lors de la rotation. Quand on fait rentrer le gaz vecteur ça pousse l’échantillon dans la colonne.  
(cf figure 3)

### Colonne capillaire

C’est une colonne (extrêmement fine) en métal, verre, silice fondue ou quartz avec un canal central très ouverts (représente la majorité de la section de la colonne), ce qui permet de diminuer les pertes de charge. Le diamètre externe est de 0,2 à 0,5 mm, elle a une bonne flexibilité, donc on peut l’entourer sur un support : elle peut donc avoir une longueur de 30 à 100m.

Il y a différentes phases stationnaires possibles :

- fine couche d’adsorbant solide : minéral (charbon actif, tamis moléculaires) ; organiques à haut poids moléculaires (copolymères)

- mince film liquide : apolaire (hydrocarbures aliphatiques saturés) ; polaire (polymères à fonctions polaires).

*Remarque : Les absorbants sont indispensables pour la séparation des solutés gazeux car ils sont peu solubles dans un liquide.*

### Four

C’est un système avec des résistances chauffantes et de ventilation et brassage d’air :

- température homogène (de partout)

- régulation très précise (+- 0,2°C)

- température ambiante à plus de 350°C

Il y a deux modes d’utilisation possibles :

- température constante (350°C)

- programmation de température (mode gradient) 60°C, 220°C, 260°C (faire chauffer progressivement pour augmenter la volatilité des solutés et ainsi les séparer).

### Détecteur

Ils sont basés sur les propriétés physiques et quelquefois chimiques des solutés. On va en étudier 3 :

- le catharomètre

- le détecteur à ionisation de flamme (FID)

- le détecteur à capture d’électrons (ECD)

#### Catharomètre

C’est le premier qui a été inventé et utilisé, il est également le plus universel. Il est simple et robuste. Mais il est peu sensible (ng/g).

(cf figure 4)

Il y a deux filaments métalliques fins parcourus pas le courant électrique :

- un baigne dans l’effluent de la colonne

- un baigne dans le gaz vecteur pur (He ou H2)

Au début les effluents ne sont que du gaz vecteur, on ne voit rien, pas de mesure de signal possible.

Quand le soluté sort de la colonne il y a la conductibilité thermique du filament change ; lé résistance électrique change aussi ; il est ainsi possible de mesurer un signal.

#### FID

(cf figure 5)

Il est beaucoup plus sensible que le catharomètre (10pg/g) mais il est moins universel (seulement pour les composés organiques).

On a une combustion du gaz vecteur et les solutés dans une flamme d’hydrogène. (il ne faut pas que le gaz vecteur soit le gaz vecteur ; l’hydrogène est explosif donc ça va nécessité un certains nombres de protections).

S’il y a seulement le gaz vecteur qui brule signal 0 (une droite horizontale).

On a la formation d’ions C+ grâce à un champ électrostatique dirigés vers les électrodes. Il y a la création d’un courant d’ionisation. On va amplifier le signal proportionnellement à la quantité du soluté.

*Remarque : il y a destruction des solutés.*

#### ECD

(cf figure 6) Il est encore plus sensible que le FID (0,1pg/g) mais il est encore plus spécifique (seulement pour les solutés à affinité pour les électrons libres = composés halogénés). Il y a ionisation des solutés par une source radioactive (tritium 3H ou nickel 63 63Ni) générant des électrons libres en continu.

Quand un soluté arrive il va rentrer en collision avec un électron, et donc être ionisé et dirigés vers une électrode par un champ électrostatique créant ainsi un courant d’ionisation. Il y a ensuite une amplification du signal proportionnel à la quantité du soluté.

*Remarque : ce sont des sources radioactives anodines (pas de risque, sauf après ingestion).*

### Enregistreur

C’est un ordinateur. Il y a transformation du signal en chromatogramme (=succession de pics gaussins correspondant aux solutés). La concentration des solutés sortant de la colonne sont fonction du temps : graphique

[c]

Temps

(cf figure 7)

Les caractéristiques d’un pic sont :

-temps de rétention (tr) : abscisse du sommet du pic : la colonne retient plus ou moins les solutés

-largeur à mi-hauteur (l1/2 )

-hauteur du pic (h)

-air (A) = air du triangle = h x l1/2 (directement proportionnelle à la quantité de soluté)

## Principe de la séparation

Le soluté est entraîné par le gaz vecteur à une vitesse propre :

- adsorption ou solubilité du soluté avec la phase stationnaire

- volatilité dans la phase mobile gazeuse

La séparation dépend de la nature des solutés et de la nature de la phase stationnaire.

*Remarque : Les composés polaires sont plus retenus par les colonnes polaires (phase stationnaire polaire) et moins retenus par des colonnes apolaires.*

Il y a une variation possible de la longueur de la colonne et de la pression d’entrée du gaz vecteur pour améliorer la séparation des solutés. C’est moins sélectif si la colonne est plus courte.

## Applications

Elles sont très vastes :

- solutés volatils (arômes)

- solutés non volatils (acides aminés, stéroïdes, acides gras) rendus volatils par « dérivatisation »

On va pouvoir améliorer les qualités organoleptiques d’un aliment (gustative, l’odorat, texture, couleur) (séparation des composés aromatiques)

On va vérifier la contamination des aliments par des pesticides ou herbicides, la pollution des sols, ainsi que la qualité nutritionnelle (séparation des AG).

(cf figure 8)

# Chromatographie liquide haute pression (HPLC)

## Appareillage

(cf figure 9) On va retrouver 5 éléments.

### Pompe

Elle met la phase mobile en mouvement (qui est liquide). Cette phase mobile (ou éluant) est un mélange de plusieurs solvants de différentes polarités contenus dans des réservoirs différents. Il y a deux modes possibles :

- isocratique (mode constant) : même mélange de solvants tout au long de l’analyse (mélange dans le même récipient, ou c’est à la pompe de faire le mélange car ils viennent de deux récipients différents).

- gradient : variation de la proportion des solvants au cours de l’analyse (on peut changer les proportions des éléments du mélange en changeant les vitesses des pompes située sur chaque récipient, au long de l’analyse).

*Remarque : le débit des pompes actuelles est de quelques µL à plusieurs mL/min.*

### Injecteur

C’est une vanne d’injection à boucle d’échantillonnage (cf CPG).

*Remarque : il existe des boucles de différents volumes (souvent 20µL), le choix est fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée en solutés.*

### Colonne

C’est une colonne en verre ou en inox (4 mm<Diamètre<20 mm ; 15 cm < longueur < 30 cm)

Il y a deux types de phases stationnaires :

- phase normale : souvent en gel de silice, parfois de la silice greffée : phase stationnaire est polaire, l’éluant est apolaire. Les solutés polaires sont plus retenus que les solutés apolaires

- phase inverse : souvent en silice greffée par des chaînes linéaires carbonées (0 ou 18C) : la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile polaire : les solutés apolaires seront plus retenus que les solutés polaires.

*Remarque : les phases normales se détériorent beaucoup plus vite que les phases inverses, car elles manquent de réponse.*

(cf figure 10)

La phase inverse est mieux pour séparer les composés apolaires (pas superposé contrairement aux solutés polaires -> un gros pic chromatographique.

### Détecteur

#### UV visible

Il mesure la quantité de la lumière absorbée par les solutés.

(cf figure 11)

Cela nécessite :

* Que les solutés absorbent suffisamment dans l’UV-visible
* Que la phase mobile n’absorbe pas aux longueurs d’onde choisies

*Remarque : il y a soit plusieurs longueurs d’onde en simultanées (=barrette de diode) soit une seule.*

#### Réfractomètre

Il compare l’indice de réfraction de la phase mobile et des solutés avec celui de la phase mobile pure.

(cf figure 12)

Il faut que la phase mobile soit constante, possible uniquement en mode isocratique.

*Remarque : il mesure extrêmement des mesures précises dépendantes de la température et de la phase mobile.*

### Enregistreur

Cela correspond au CPG (=ordinateur).

## Principe de la séapration

Le soluté est entraîné par la phase mobile à une vitesse propre, en fonction de :

* Adsorption sur la phase stationnaire
* Solubilité dans la phase mobile

La séparation dépend de la nature des solutés et de la nature stationnaire et de la nature de la phase mobile.

## Applications

Elles sont très vastes :

* Solutés liquides
* Solutés solides non volatils

On peut doser les vitamines dans les aliments ; les herbicides dans l’eau ; les protéines dans les aliments ; des composés actifs des pesticides…

(cf figure 13)

# Analyses qualitatives et quantitatives

## Analyses qualitatives

Elle sert à identifier les solutés (temps de rétention caractéristique pour les conditions expérimentales données).

Pour avoir une identification plus facile et plus précise, on a l’utilisation de l’échelle universelle des indices de rétention.

Il y a injection sur une même colonne avec les mêmes conditions d’une série aliphatique (= c’est ce qui correspond à des composés organiques où on va ajouter à chaque fois un élément constant) de solutés connus auquel sont attribués des indices de rétention arbitraire.

*Ex* : alcanes

Indice de rétention arbitraire = 100 x nb de carbone du composé organique rajouté

Les indices de rétention des solutés inconnus sont calculés à partir de ceux des solutés connus. Il y a recalage des temps de rétention des solutés inconnus.

Calcul : soit en isotherme (Kovats)

tr = temps de rétention

to = temps mort (temps de remplissage de la colonne)

n = nombre de carbone

t'rx = temps de rétention du soluté

t’rn = temps que met le composé de la chaîne aliphatique sortant avant le soluté

t’rn+1 = temps que met le composé de la chaîne aliphatique sortant après le soluté

On met ‘ car on a enlevé le temps mort

Gradient (Van Den Dool et Kratz)

On a l’identification par comparaison des indices de rétention des solutés inconnus dans les tables (universel).

## Analyses quantitatives

On va essayer de déterminer la masse des solutés :

m = masse du soluté

K = coefficient de proportionnalité propre au soluté

A = aire du pic

### Aire des pics

Il y a deux méthodes :

* Triangulation manuelle (pic = triangle)

\*en traçant les tangentes aux points d’inflexion : **A = 1/2H’ω**

(cf figure 14)

\*en mesurant la largeur à mi-hauteur

**A = H x δ**

* Intégration électrique

### Coefficient de proportionnalité

#### Etalonnage externe

C’est une réalisation d’une droite d’étalonnage : A = f(masse) (le volume injecté doit être constant)

L’injection du même volume d’échantillon permet par mesure de l’aire du pic de connaître la masse de soluté dans l’échantillon.

*Remarque : le soluté doit être disponible en qualité suffisante.*

#### Ajouts dosés (dérivé de l’échantillonnage externe)

On analyse l’échantillon et on reporte l’aire obtenue sur un graphique.

On analyse l’échantillon après lui avoir ajouté une quantité connue de soluté et on reporte l’aire obtenue sur un graphique (à répéter pour avoir une mesure plus précise).

Attention on ne passe pas par l’origine.

*Remarque : le soluté doit être disposé en quantité suffisante mais on ne s’affranchie pas des effets matrices.*

#### Etalonnage interne

C’est la comparaison des pics de solutés avec le pic d’une substance étalon introduite en proportion connue dans l’échantillon à analyser.

mei = masse étalon interne  
As = aire soluté

*Remarque : le pic de l’étalon interne doit être différent des pics des solutés*.

peut varier de 0,9 à 1,1 : on peut faire des erreurs de 10% sur la quantité du soluté. K est proportionnel à chaque soluté.

# Performances des colonnes chromatographiques

## Sélectivité

Elle caractérise la distance séparant les sommets des deux pics consécutifs.

K1 et K2 sont les coefficients de partage des solutés 1 et 2 entre les phases stationnaire et mobile.

## Efficacité

Elle caractérise la finesse des pics (=nombre de plateaux théoriques de distillation fractionnée)

La comparaison de colonnes de longueurs différentes se fait grâce à la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT).

HEPT = L/N (où L est la hauteur de la colonne)

*Remarque : colonne « efficace » -> HEPT = quelques microns (correspond à un plateau de distillation factionnée).*

Cette efficacité dépend de la colonne, de la phase mobile et de la température d’analyse.

## Résolution

Elle caractérise le recouvrement entre deux pics consécutifs

SI R augmente, ça augmente la séparation :

* R > 1 : séparation pratiquement complète
* R < 0,8 : séparation insuffisante
* R entre 0,8 et 1 : séparation incomplète mais suffisante