

# Chromatographie

La chromatographie est une méthode d'analyse et de séparation apparue au début du 20<sup>ème</sup> siècle, initialement pour séparer des colorants végétaux comme la chlorophylle.

*chrôma* = couleur      *graphein* = écrire      signifie en grec « écrire en couleur »

L'entière portée de cette méthode sous ses diverses formes (chromatographie sur papier, en couche mince, en phase gazeuse ou liquide) n'a toutefois été réalisée que plus récemment, lorsque les premières séparations de mélanges incolores et spécialement de substances naturelles (acides aminés, hormones, vitamines) furent concrétisées avec succès. Les méthodes modernes ont aujourd'hui atteint un niveau de perfectionnement tel qu'une vaste application dans tous les domaines de la chimie est devenue possible.

Toute méthode de chromatographie est basée sur la distribution des substances à séparer entre deux phases. La phase mobile s'écoule au long d'une phase stationnaire. Selon leur affinité, les substances en solution sont plus ou moins retenues par la phase stationnaire, ce qui rend possible leur séparation. Il existe plusieurs applications pratiques, les phases peuvent en particulier être solide, liquide ou gazeuse.

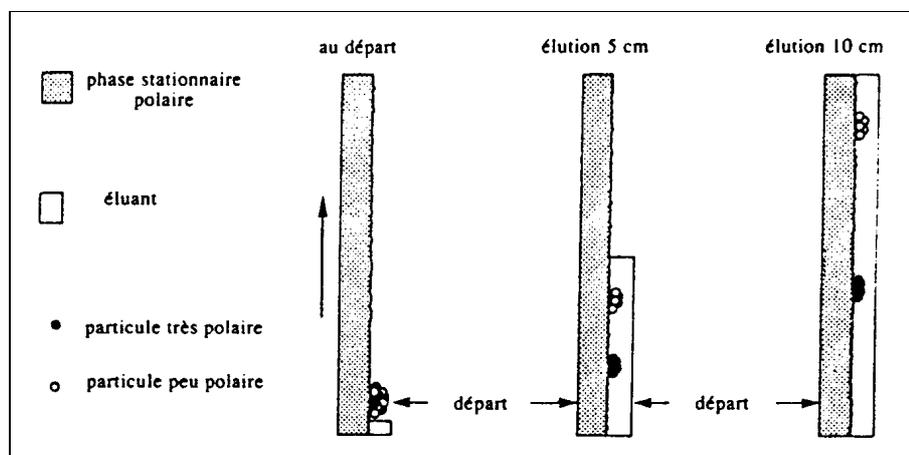
## Chromatographie sur couche mince.

La substance se trouvant dans la phase mobile liquide est adsorbée à la surface d'une phase stationnaire solide. Par le flux de la phase mobile, la substance adsorbée sur la phase stationnaire est partiellement redissoute (éluee), puis à nouveau adsorbée un peu plus loin, et ainsi de suite. Ce processus est donc une succession d'équilibres dépendant de :

la nature de la phase stationnaire (agent adsorbant)

la solubilité des substances à séparer dans la phase mobile

l'affinité de la substance pour la phase stationnaire



Lorsqu'une substance est adsorbée de façon irréversible, elle reste au point de départ. Si elle n'est au contraire pas adsorbée du tout, elle migre avec le front de l'éluant.

### Phase stationnaire

On utilise comme phase stationnaire un agent adsorbant insoluble dans la phase mobile. Sa capacité d'adsorption dépend de sa surface et de son type d'activité.

### Exemples d'agents adsorbants

minéraux : gel de silice – oxyde d'aluminium (alumine) – silicate de magnésium (Florisil)

organiques : cellulose en poudre – polyamide

### Phase mobile

La phase mobile liquide est dénommée éluant ou solvant d'éluion. Elle doit être chimiquement inerte vis-à-vis de l'échantillon à séparer. Le choix de l'éluant se base sur l'échelle de polarité; il est dicté en fonction des trois principaux critères :

- polarité du mélange à séparer
- activité de la phase stationnaire
- polarité de l'éluant

Sur la couche mince d'adsorbant, on applique une faible quantité de mélange sous forme de solution diluée. Pour le développement du chromatogramme, la plaque de chromatographie est ensuite placée dans une cuve au fond de laquelle se trouve l'éluant (phase mobile). Ce dernier se déplace progressivement sur la couche d'adsorbant par effet capillaire et entraîne à différentes distances les constituants du mélange, ce qui provoque la séparation.

Les substances sont visualisées sous lumière ultraviolette ou par réaction avec un révélateur spécifique atomisé sur la couche mince.

### Plaque de chromatographie

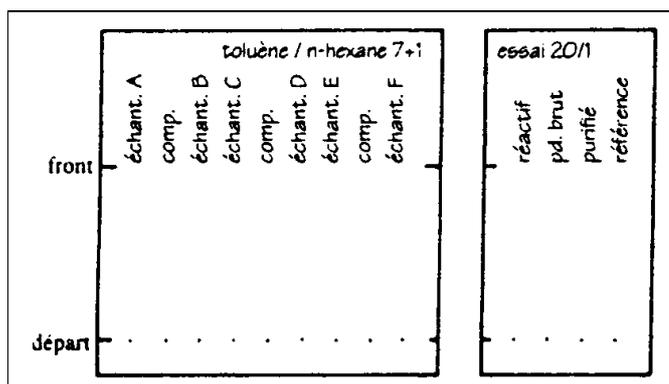
En chromatographie sur couche mince, l'adsorbant est appliqué sous forme d'une couche de pâte épaisse d'environ 0.3 mm sur une plaque de verre ou sur une feuille de plastique. Après l'étendage à la machine, cette couche est séchée et éventuellement activée par chauffage à température élevée.

#### Choix de la plaque

Il existe des plaques avec les agents adsorbants et les activités les plus divers. Pour trouver celle qui permet d'atteindre au mieux le but recherché, il est généralement nécessaire d'effectuer des essais préliminaires. Les travaux de routine sont effectués sur plaques commerciales ; environ 80% des séparations peuvent être effectuées sans problème sur du gel de silice.

### Préparation d'une plaque

On utilise le crayon à papier pour tous les marquages, comme la légende, la ligne de départ (à 2 cm du bord inférieur), le repère de tête et le front réel. Il importe de ne pas endommager la couche d'adsorption pour permettre un flux régulier de l'éluant.



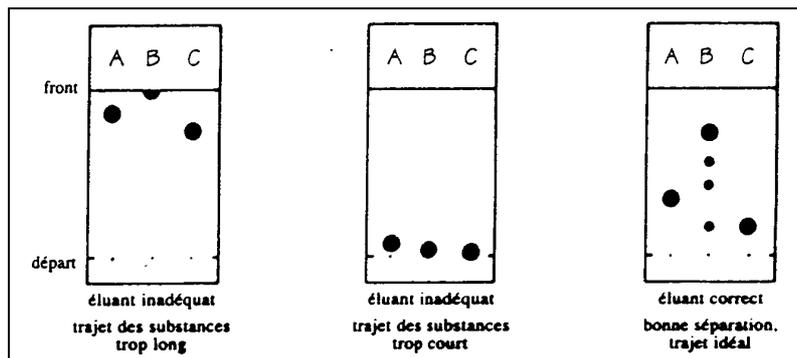
### L'éluant

L'éluant est le solvant qui, lors de la chromatographie, migre lentement le long de la couche adsorbante et entraîne les composants de l'échantillon.

On effectue généralement le premier essai préliminaire avec un solvant apolaire pour lequel la force d'adsorption de la phase stationnaire est maximale. La séparation de substances faiblement adsorbées est ainsi possible. En suivant l'échelle migratoire (série éluotropique) avec des éluants de polarité croissante, les substances fortement adsorbées se mettent aussi à se déplacer. Si l'on n'obtient pas de résultats satisfaisants avec des solvants purs, des mélanges peuvent mener au but. On utilise comme éluants des mélanges de deux solvants ou plus de polarités différentes. Les composants des mélanges ne doivent pas réagir entre eux ; on prépare un nouveau mélange juste avant chaque chromatogramme.

## Chromatogramme d'essai sur couche mince

Il s'agit de trouver un éluant qui sépare bien les substances, sans que celles-ci ne restent au point de départ ni n'avancent au front. La forme des taches devrait être la plus circulaire possible.



## Cuve de développement

La cuve de développement en verre est munie d'un couvercle. L'éluant est versé au fond sur une hauteur ne dépassant pas 1 cm, pour éviter que l'endroit où la substance a été appliquée ne plonge dans l'éluant. On ferme la cuve et on attend environ 30 minutes que le système soit saturé de vapeurs.

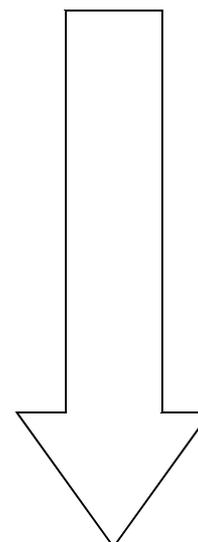
## Échelle de polarité des éluants

Dans une série homologue, la polarité diminue avec le nombre croissant d'atomes de carbone ; le nombre de groupes fonctionnels et leurs interactions éventuelles doivent également être pris en considération. (source : J-Handbook of Chemistry and Physics, Dielectric Constants)

A droite, Série éluotropique selon E. von Arx (Ciba-Geigy, table abrégée)

Ces données générales se rapportent aux phases stationnaires polaires telles le gel de silice et l'alumine; selon le type, des légères déviations de la série éluotropique sont parfois constatées.

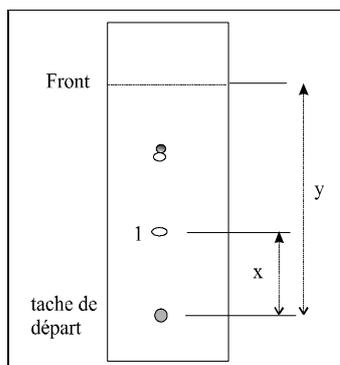
*n*-hexane  
 cyclohexane  
 tétrachlorure de carbone  
 toluène  
 chlorure de méthylène  
 chloroforme  
 éther diisopropylique  
 acétate de butyle  
 1-octanol  
 éther diéthylique  
 acétate d'éthyle  
 1-butanol  
 isobutanol  
 tétrahydrofuranne  
 1,4-dioxane  
 1-propanol  
 éthanol  
 acide acétique  
 acétonitrile  
 méthanol  
 acide formique  
 formamide  
 eau



Polarité croissante,  
pouvoir éluant accru

## Facteur de rétention (Rf)

Pour des conditions données, la migration d'une substance donnée est toujours dans un même rapport. On définit ce rapport comme la distance parcourue par la substance sur la distance parcourue par le front de l'éluant.



$$Rf = \frac{x}{y}$$