

La chromatographie

1. Introduction

La chromatographie est une technique séparative analytique et/ou préparative permettant de séparer les constituants d'un mélange complexe en phase liquide ou gazeuse.

Le mot chromatographie vient du grec ancien, **chroma**, qui signifie "couleur" et **graphö**, qui signifie "j'écris".

2. Principe

Les molécules séparées sont entraînées par un fluide (liquide ou gaz, de nature différente) appelé **phase mobile** sur un support appelé **phase stationnaire**. Ces molécules passent continuellement d'une phase à l'autre, créant un état d'équilibre entre la phase stationnaire et la phase mobile pour chaque constituant du mélange à séparer.

À partir de ce principe, il existe de très nombreux types de chromatographie en fonction de la nature de la phase stationnaire, de la nature de la phase mobile, et de la nature des interactions entre ces phases et les molécules à purifier. En effet, selon les cas, les facteurs physico-chimiques qui interviennent comme critère de séparation entre la phase stationnaire et la phase mobile sont:

La masse moléculaire, la solubilité dans un solvant liquide, la charge électrique, la polarité, l'hydrophile/hydrophobicité...etc.

Évidemment, le choix est effectué au cas par cas en fonction des besoins.

3. Les différents types de techniques chromatographiques

Les différents types de chromatographie sont:

3.1. Chromatographie en phase liquide que l'on appelle C.P.L.:

La phase mobile est un liquide et selon la phase stationnaire on distingue :

a) Chromatographie de partage:

La chromatographie de partage fonctionne par partage de solutés entre deux phases non miscibles; l'une mobile et l'autre stationnaire. La phase stationnaire est un liquide qui imprègne un support en principe inerte ou est greffée par liaison chimique covalente sur ce support. Cette technique s'apparente à l'extraction liquide/liquide basée sur les différences de solubilités dans deux phases non miscibles. Le soluté se distribue selon le coefficient de partage $K = \frac{C_S}{C_m}$ d'où; C_S : la concentration du soluté dans la phase stationnaire et C_m : la concentration du soluté dans la phase mobile et pour séparer deux constituants, il faut qu'ils aient des coefficients de partage différents.

b) Chromatographie d'exclusion:

Ce type de chromatographie, également appelé tamisage moléculaire ou gel-filtration, vise à séparer les molécules en fonction de leur masse moléculaire, bien que la forme intervienne également. La séparation des constituants va se faire selon leur rayon de Stokes ou rayon hydrodynamique. Le principe consiste à faire migrer l'échantillon à analyser au milieu de billes poreuses. Les molécules suffisamment petites pour passer par les pores des billes seront ralenties dans leur progression, alors que les molécules trop grosses pour entrer dans les billes progresseront plus rapidement en passant entre les billes (Figure 1).

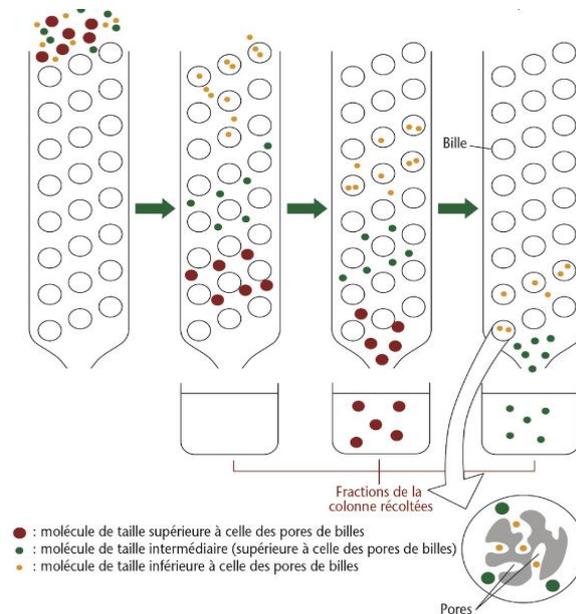


Figure 1: Chromatographie d'exclusion sur gel

c) Chromatographie d'adsorption:

L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide sur une surface solide. Ce phénomène fait intervenir des forces complexes entre le soluté et l'adsorbant: forces électrostatiques, forces de liaison d'hydrogène et autre. Pour que cette adsorption soit utilisable à des fins préparatoires, il faut que cette fixation soit réversible. La désorption consiste à remettre, à l'aide d'un éluant approprié la substance en solution par rupture des liaisons précédentes.

La chromatographie liquide solide appelée aussi chromatographie d'adsorption (Figure 2) met en œuvre

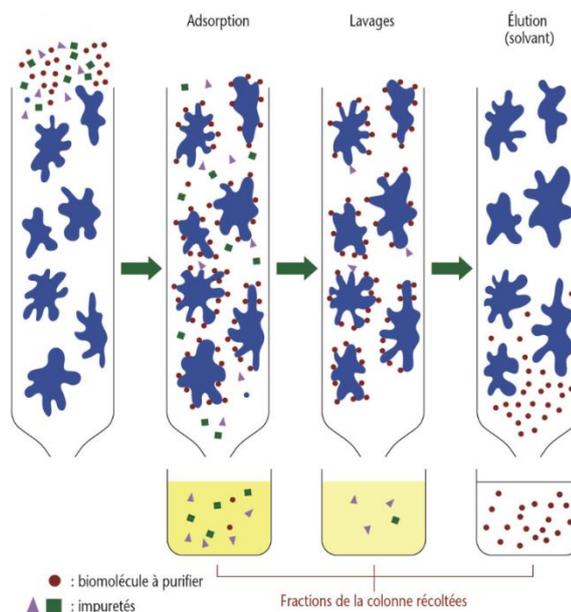


Figure 2: Chromatographie par adsorption

des phases stationnaires ayant des propriétés adsorbantes, principalement les gels de silice poreuse et les gels d'alumine.

Cette technique est complémentaire à la chromatographie de partage. La séparation est fondée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange sur cette phase, et donc basée sur l'existence de dipôles dans une structure moléculaire.

Les différents types de cette chromatographie sont:

La chromatographie d'adsorption en phase inverse: C'est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire (Figure 3).

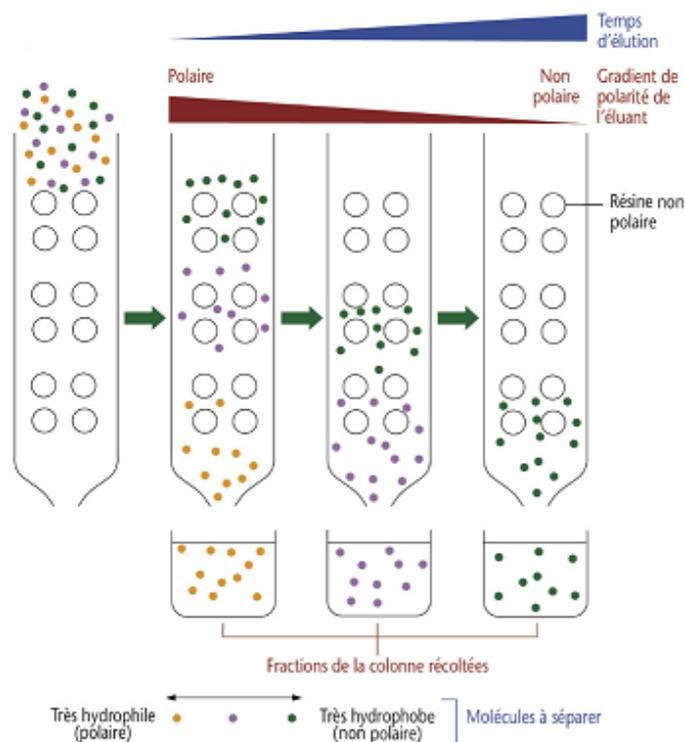


Figure 3: Chromatographie en phase inverse

La chromatographie d'affinité: la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser (Figure 4). Quand une solution contenant un mélange de protéines traverse la colonne, la protéine d'intérêt se liera au ligand immobilisé, alors que les autres protéines ne s'y lieront pas et sortiront de la colonne. On peut récupérer la protéine désirée sous une forme très pure en modifiant les conditions d'éluion pour faire en sorte que la protéine se détache du ligand.

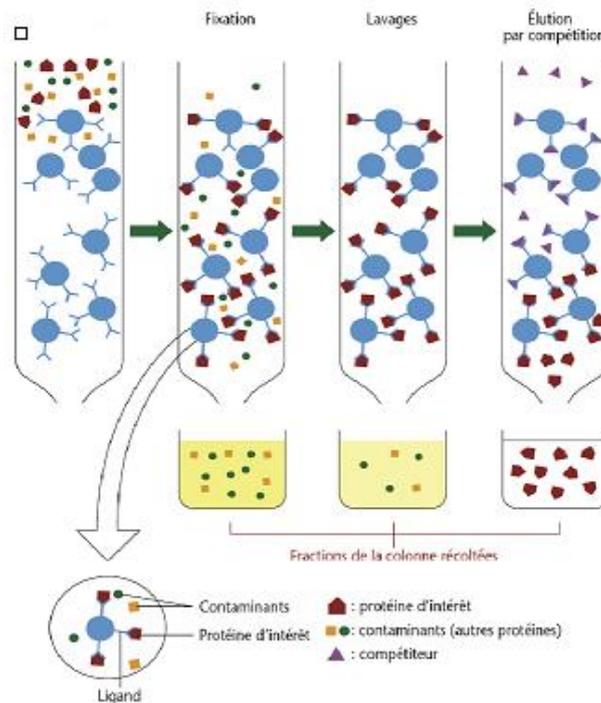


Figure 4: Chromatographie d'affinité

La chromatographie sur échangeurs d'ions: la phase stationnaire est un échangeur d'ion constitué par une résine porteuse de groupements ionisés (+ ou -).

Les différents types d'échangeurs d'ions sont:

Positive: résines échangeuses d'anions qui fixent des molécules chargées négativement: $\dots R^+ \dots M^-$		Négative: résines échangeuses de cations qui fixent des molécules chargées positivement: $\dots R^- \dots M^+$	
Nature de la fonction ionisable: $\dots R^+$		Nature de la fonction ionisable: $\dots R^-$	
Base forte	Base faible	Acide fort	Acide faible
Ammonium quaternaire : $\dots NR_3^+$ exemple: triméthylammonium $\dots N(CH_3)_3^+$	Forme protonée d'une amine I, II ou III: $\dots NHR_2^+$ exemple: diéthylaminoéthylammonium $\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{--- C}_2\text{H}_4 \text{--- NH}^+ \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	exemple: sulfonate $\dots SO_3^-$	exemple: Carboxyméthyl $\dots O-CH_2-CO_2^-$

La chromatographie d'échange d'ions (Figure 5) 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.

- La phase stationnaire dans la chromatographie ionique est une résine sous forme de billes échangeuses d'ions contenant des groupements chargés positivement ou négativement permettant la rétention des espèces dont on désire obtenir la séparation. Le soluté ionique ou ionisable interagit avec les groupes de charges opposées de la phase stationnaire.
- La phase mobile est une solution aqueuse de force ionique donnée (généralement un tampon de pH). 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.

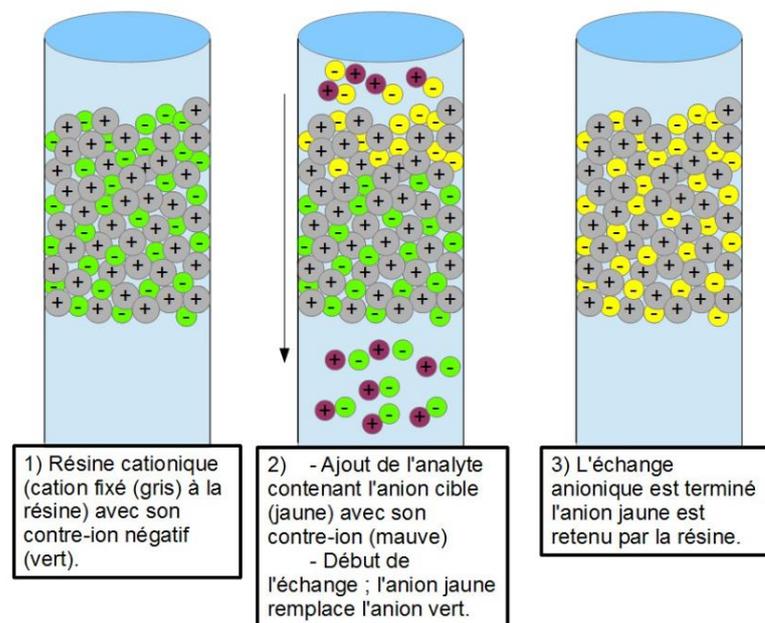


Figure 5: Chromatographie échangeuse d'ions

3.2. Chromatographie en phase gazeuse (C.P.G):

La chromatographie en phase gazeuse est une technique de séparation applicable aux composés gazeux ou susceptible d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition; les constituants peuvent différer par leur nature et leur volatilité. La séparation exige des quantités de l'ordre du mg seulement; parfois même du μg .

On distingue selon la phase stationnaire:

a) **Chromatographie gaz-liquide:**

C'est une chromatographie de partage ou la phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte.

b) Chromatographie gaz-solide:

C'est une chromatographie d'adsorption où la phase stationnaire est un solide adsorbant poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.

4. Le choix d'un système chromatographique

La chromatographie sous toutes ses formes, est une méthode de séparation des constituants d'un mélange gazeux, liquide ou solide. Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes. Le choix de l'une ou l'autre dépend :

1. **de la nature du soluté:** gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...

2. **du but de l'analyse:** identification, contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages, quantification...

5. Domaine d'application de la chromatographie

Domaine d'application très vaste :

- Industrie chimique ;
- Agro-alimentaire ;
- Environnement ;
- Pharmacie ;
- Biochimie....

6. Les fondements théoriques de la chromatographie

a) Notions de temps:

Soit la séparation d'un constituant, un des paramètres les plus importants en chromatographie sur colonne est le temps de rétention ou (volume de rétention).

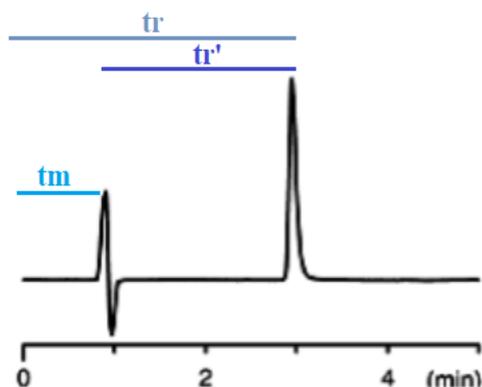


Figure 5: Tracé représentatif des constituants en fonction du temps

t_m (temps mort): C'est le temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne.

t_r (temps de rétention): C'est le temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir et traverser le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne.

t'_r (temps de rétention réduit): C'est le temps passer par le soluté dans la phase stationnaire
 $t'_r = t_r - t_m$.

b) Facteur de rétention ou de capacité K' :

Il s'exprime par le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

c) Le nombre de plateau théorique N :

C'est un paramètre qui sert à mesurer la performance ou l'efficacité.

$$N = \frac{L}{H}$$

d'où ; L : longueur de la colonne en cm.

H : la hauteur équivalente à un plateau théorique.

L'efficacité augmente avec l'augmentation du nombre de plateau théorique N et la diminution de la hauteur équivalente H .

Il est souhaitable que le passage d'une substance de la phase mobile ait la phase stationnaire et inversement se fasse sur la distance la plus courte possible, le nombre de fois que ce phénomène se produit correspond à un plateau théorique.

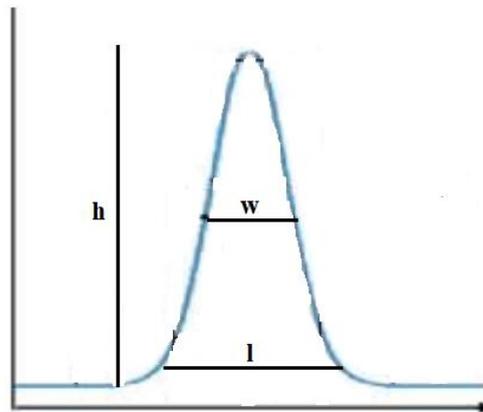
On a:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{l}\right)^2$$

l : largeur du pic à la base.

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{w}\right)^2$$

w : largeur du pic à mi-hauteur.



7. Conclusion

La chromatographie est une technique qui se décline selon de multiples variantes pour séparer des constituants dans un but soit analytique, soit préparatif. Cet ensemble de techniques, parfois très différentes dans leur mise en œuvre, est très utilisé en laboratoire comme dans les établissements scolaires. S'agissant de séparer des molécules pouvant être très variées dans leur composition, poids moléculaire ou forme, la chromatographie nécessite le plus souvent une étape de mise au point pour trouver le protocole adapté. Il est également rare de pouvoir purifier convenablement une molécule en une seule étape, et il est généralement nécessaire de réaliser successivement plusieurs types de chromatographies, ou de coupler cette technique avec d'autres techniques de purification (centrifugation, électrophorèse...etc). Vous trouverez, dans le tableau ci-dessous, un résumé des différents types de chromatographie:

Phase stationnaire	Principe de séparation	Caractéristiques de la phase stationnaire	Principe de la fixation et de l'éluion
Liquide	Partage	Liquide fixé sur un support inerte (papier, silice,.....)	Distribution des composants du mélange à séparer dans les deux phases liquides selon leur coefficient de partage
Solide	adsorption	Adsorbant solide polaire	Phénomène de surface: formation de liaisons spécifiques entre les composants et la surface adsorbant
	Adsorption (phase inverse)	Molécules hydrophobes greffées sur la silice	Interactions hydrophobes et éluion par diminution de la polarité de la phase mobile
	Echange d'ions	Résine (polymère d'oses) porteuse de groupements chargés – ou +	Interactions électrostatiques avec les composants de charge opposée
	Exclusion (filtration sur gel)	Solide poreux	Les composants de diamètre supérieur à celui des billes du support sont « exclus » et ceux de diamètre inférieur y diffusent et sont freinés
	affinité	Support sur lequel est greffée une molécule (le ligand) spécifiquement reconnue par un des composants de l'échantillon à analyser	Déplacement de l'équilibre de liaison (molécule-ligand greffé) en faveur de l'équilibre (molécule tierce molécule)