

Chapitre 6 : Chromatographie

1. Définition

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire et une force de mobilité due à la phase mobile.

Phase stationnaire : phase fixe soit sur la surface intérieure d'une colonne soit sur une surface plane.

Phase mobile : phase qui se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant les analytes. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire, mais uniquement avec les analytes.

2. Principe

Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire (emprisonnée dans la colonne) et la phase mobile qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne.

Plus une espèce chimique est soluble dans l'éluant et moins elle est adsorbée par la phase fixe, Plus elle est rapidement entraînée par l'éluant et plus elle migre haut.

3. Classification des techniques chromatographiques

3.1. Classification selon la technique mise en jeu

- la chromatographie sur colonne
- la chromatographie de surface (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

3.2. Classification selon la nature 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.

La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- chromatographie liquide—solide (LSC)
- chromatographie liquide—liquide (LLC)
- chromatographie gaz—solide (GSC ou GC)
- chromatographie gaz—liquide (GLC ou GC)

- chromatographie supercritique (SFC)

3.3. Classification selon le phénomène chromatographique

Ce dernier dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée. On joue sur les propriétés des molécules qui vont passer. On distinguera donc :

- la chromatographie d'adsorption (LSC, GSC) (lorsque la phase stationnaire est un solide) et par extension.

- la chromatographie d'affinité : (on capte l'antigène retenu par les anticorps fixés sur la colonne) qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).

- la chromatographie de partage (LLC, GLC), lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).

- la chromatographie d'échange d'ions (IEC), où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés. On récupère ce qui reste accroché sur la phase stationnaire

- la chromatographie d'exclusion (SEC) où la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille ; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel (GPC).

4. Chromatographie d'adsorption

➤ 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. 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.

➤ Élément de la chromatographie d'adsorption

• 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.

- **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'élution 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'élution 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 éluotrope le plus élevé, et vis vers ça pour les adsorbants polaires.

5. Chromatographie d'affinité

Elle est basée sur des interactions spécifiques et réversibles entre des composés spécifiques (ligands), lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase fixe et son partenaire d'affinité en solution (substance à analyser ou affinant). Le ligand est fixé sur une matrice (résine) directement ou indirectement à l'aide d'un bras fixateur (espaceur).

Dans le complexe de nature biologique, dont la formation est à la base de la chromatographie d'affinité, l'un des partenaires au moins est une protéine ; cette protéine peut constituer le ligand fixe ou le partenaire d'affinité en solution.

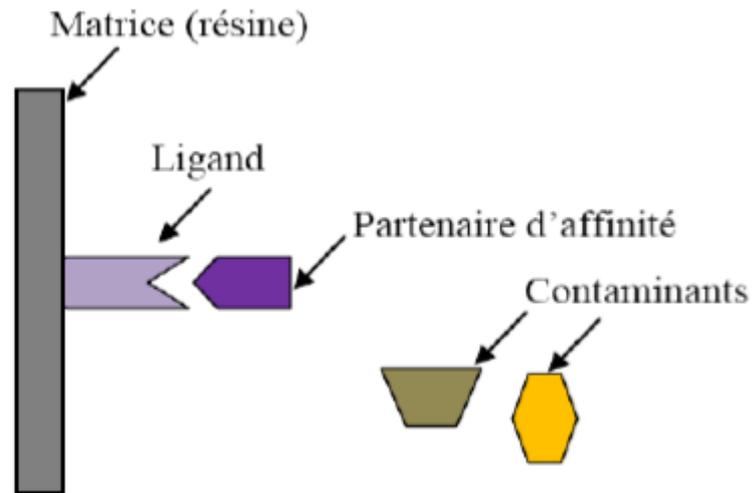


Figure 1 : Chromatographie d'affinité.

- **La phase stationnaire (le gel) :** Est constituée d'un effecteur (ligand), fixé par covalence à un support poreux (matrice ou résine) par l'intermédiaire d'une chaîne latérale: le bras fixateur. Le support peut-être en dexran, en agarose ou en polyachrylamide. Ce sont des particules uniformes. Il doit être insoluble dans l'eau, stable chimiquement et mécaniquement et doit porter des groupements fonctionnels réactifs permettant la fixation des bras fixateurs
- **Le bras fixateur:** C'est une chaîne polycarbonnée (C6-C8) intercalée entre la matrice et le ligand.
- **Le ligand:** Toute substance capable de former des complexes stables avec les molécules à isoler et possédant, par surcroît un groupement réactif assez éloigné du site actif pour que celui-ci reste librement accessible après la fixation. C'est la molécule fonctionnelle, fixée directement ou indirectement sur la matrice.

➤ **Applications**

- Enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extrait enzymatiques.
- Immunologie, pour la purification d'anticorps.
- Protéino-chimie, pour l'étude des protéines membranaires.
- Chimie des acides nucléiques, pour le fractionnement de divers acides nucléiques (ARNm, ARNr, etc.)

6. La chromatographie de partage

➤ **Principe**

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, mais dans ce cas ; une des deux phases est immobilisée sur un solide dont les particules ont des diamètres très petits. Il s'établit un équilibre qui dépend de la solubilité relative du soluté dans les deux solvants donc du coefficient de partage.

7. Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

➤ Principe

La chromatographie ionique est une chromatographie liquide, réalisée dans une colonne (souvent) contenant une phase stationnaire poreuse, sur laquelle est greffé un échangeur d'ions qui peut interagir avec les substances ioniques. La séparation en CEI repose sur des interactions électrostatiques (ioniques) réversibles entre l'échangeur d'ions, les contre ions échangeables (mobiles) et les molécules chargées.

Un mélange contenant plusieurs substances de charges différentes (A, A⁻, A⁺, A⁺⁺, A⁺⁺⁺) est mis dans une colonne échangeuse d'ions pour séparer les solutés. Ces derniers se fixent sur l'échangeur selon le signe de leur charge, les substances ayant une charge nulle ou la même charge que celle d'échangeur d'ions s'éluent de la colonne en premier, tandis que celles ayant un signe de charge opposé à celui d'échangeur s'adsorbent. L'adsorption des substances est mise en place en fonction de leur affinité (le nombre des charges), A⁺⁺⁺ a une grande affinité par rapport à A⁺ et A⁺⁺ sans oublier l'effet de compétition lorsque le mélange est concentré (A⁺⁺⁺ en grande quantité peut écarter A⁺ et A⁺⁺).

➤ Applications

La chromatographie sur échangeur d'ions s'applique à un grand nombre de substances biologiques chargés, et particulièrement en :

- Analyse de mélange, des sels minéraux, d'acides aminés (hydrolysats de peptides), de peptides (peptides hormonaux en particulier), de protéines et autres molécules par différents échangeurs ;
- Analyse (dosage) des traces ioniques dans un échantillon ;
- Séparation des acides nucléiques sur échangeurs anioniques ;
- Déminéralisation de l'eau ;
- Analyse toxicologique, pharmaceutique et en thérapie.

8. Chromatographie d'exclusion stérique

➤ Principe

La gel-filtration est fondée sur la différence de pénétration des composés d'un mélange dans la phase stationnaire qui est un gel poreux. La séparation est mise en place grâce à la présence des pores dans le gel remplis de la phase mobile. Cette méthode est basée aussi sur la masse et

la forme des molécules, puisque généralement la taille des molécules est proportionnelle à leur masse, et deux molécules qui ont la même masse molaire mais deux formes différentes (fibrillaire et ronde) ne migre pas de la même vitesse.

Dans le mélange de composés, les grosses molécules, qui ne peuvent pas entrer dans les pores, passent entre les grains de gel, migrent rapidement et donc exclues (éluées) en premières ($K_d = 0$). Cependant, les particules moyennes et petites sont distribuées entre les deux phases, car elles sont capables de pénétrer dans les pores du gel ($0 < K_d < 1$) et donc exclues tardivement (Fig. 08). Un K_d plus que 1 indique que les solutés réagissent avec les parois des pores du gel par adsorption, ce phénomène ne fait pas partie de CES.

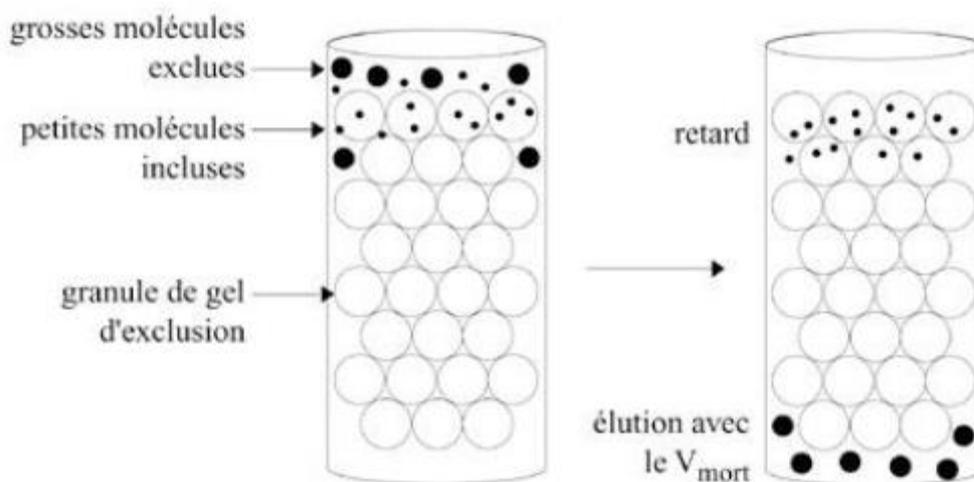


Figure 2 : Principe de la chromatographie d'exclusion stérique

➤ Applications

- Purification de protéines, peptides, polysaccharides, hormones, cofacteurs, acides nucléiques, ... et même les virus ;
- Détermination du poids moléculaire par ce que le volume d'élution (V_e) et en fonction linéaire, approximativement, avec \log (poids moléculaire) dans le domaine d'application ;
- Dessalage : dans une colonne de Sephadex G25, les grosses molécules d'un échantillon (molécules + sels) sont exclues du gel alors que les sels sont retenus dedans