

LES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour **purifier, identifier** et **quantifier** des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation.

La chromatographie (du grec chroma: couleur et graphein: écrire) a été inventée par le botaniste Mikhail Tswett dans les années 1900. La première chromatographie a été réalisée par ce botaniste en 1905. Il a réalisé la séparation de pigments végétaux de la chlorophylle sur une colonne remplie de carbonate de calcium avec de l'éther de pétrole. Des bandes colorées qui se déplacent le long de la colonne à des vitesses propres sont obtenues.

Le prix Nobel de chimie est attribué en 1952 aux biochimistes Martin et Synge pour leur contribution au développement de la chromatographie moderne.

La chromatographie analytique est une technique d'analyse qualitative et quantitative de la chimie analytique utilisée pour identifier (donc déterminer la composition d'une substance) et /ou doser les composés chimiques d'un mélange et apprécier leur concentration

La chromatographie préparative est utilisée pour purifier un produit destiné à d'autres utilisations. Son but est d'obtenir la substance ; c'est pourquoi, à toute échelle, elle implique de collecter des fractions.

• Principe

La chromatographie est une méthode physique de **séparation** basée sur les différentes affinités d'un (des) composé(s) à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). Le principe de cette technique est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans un échantillon analysé. L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène. Une fois la phase stationnaire traversée, les composés sont élués. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et l'autre des deux phases. Il en résulte une différence de **vitesse** de progression(**migration**) des produits et donc d'élution. Ceci permet de les séparer les uns des autres voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement indépendante de la nature des phases mobile et stationnaire.

Souvent, l'échantillon est analysé par comparaison avec des substances déjà connues donc par comparaison avec les résultats de l'analyse d'une **solution-étalon** (solution commerciale contenant des substances connues, à des concentrations bien connues). Ces substances servent de **références** et permettent **d'identifier** et/ou de **doser** chaque espèce par comparaison des vitesses de séparation : Il s'agit de **chromatographie analytique**.

Dans d'autres cas, on se contente de séparer les fractions, de les récolter (isoler) pour les identifier par d'autres techniques: c'est la **chromatographie préparative**.

I. Types de chromatographie

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon le support de la phase stationnaire en:

- Chromatographie **sur colonne** (HPLC, CPG, et les colonnes de silice).
- Chromatographie **sur surface** (chromatographie sur couches minces ou CCM, chromatographie sur papier).

Elles peuvent être classées aussi selon la nature de la phase mobile en:

- Chromatographie en **phase gazeuse** (CPG).
- Chromatographie en **phase liquide** (CPL):
 - Chromatographie sur couche mince (CCM).
 - Chromatographie de partage centrifuge (CPC).
 - Chromatographie liquide haute pression (ou performance) (HPLC).

Suivant le type de chromatographie, elle peut servir à **identifier** (CCM, HPLC, CPG), à **séparer** ou à **purifier** les composés d'une réaction (chromatographie sur colonne, HPLC). Cette technique peut également, grâce à un témoin, permettre de **quantifier** un produit (CPG, HPLC).

Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques dépend de la nature des composés à séparer et en fonction de celle-ci, le choix de l'adsorbant utilisé.

II. Classification selon le phénomène chromatographique

Ce dernier dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée. On distinguera donc :

La chromatographie d'adsorption (LSC, GSC) (lorsque la phase stationnaire est un solide); par extension on pourrait y rattacher la chromatographie d'affinité, 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.

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).

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).

II.1. La chromatographie d'adsorption

- **Principe**

Cette chromatographie liquide-solide est basée sur la (ré)partition des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

- L'adsorption : **L'adsorption** (c'est un phénomène de surface) est la fixation des molécules dissoutes par la phase solide. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée (exemple : liaison de Van der Waals).

Certains adsorbants présentent une forte polarité électrique comme le gel de silice (**Fig.1**) ou l'alumine ; d'autres ont une faible polarité comme le charbon actif.

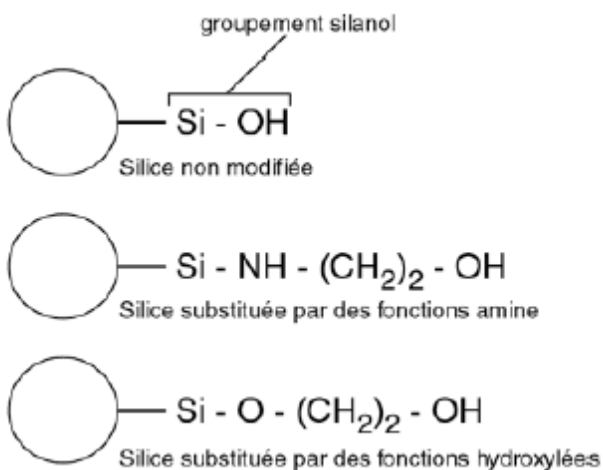


Figure 1. Silices polaires greffées.

Les solvants : Pour un système chromatographique donné, le pouvoir éluant dépend de la polarité du solvant: Prenons comme exemple une phase stationnaire constituée d'un **adsorbant polaire** (le gel de silice), d'un **soluté polaire** adsorbé et d'un **solvant polaire** (le méthanol). Le solvant polaire possède un pouvoir éluant élevé, fortement adsorbé, il déplace le soluté. En revanche, un solvant apolaire comme l'éther de pétrole possèdera un mauvais pouvoir éluant, mais entraînera un soluté apolaire.

II.2. La chromatographie d'échanges d'ions

- **Principe**

Elle permet la séparation de molécules chargées (La séparation est en fonction de la charge électrique). La phase stationnaire est un solide ayant des propriétés particulières que l'on appelle un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions électrostatiques (ioniques) avec des composés (protéines) ionisés. Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables ayant la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution (**Fig. 2**).

C'est une séparation des composés basée sur des interactions ioniques réversibles entre une phase stationnaire appelée **échangeur d'ion**, des **contres ions échangeables** ou **mobiles** et **un soluté ou protéine chargé**.

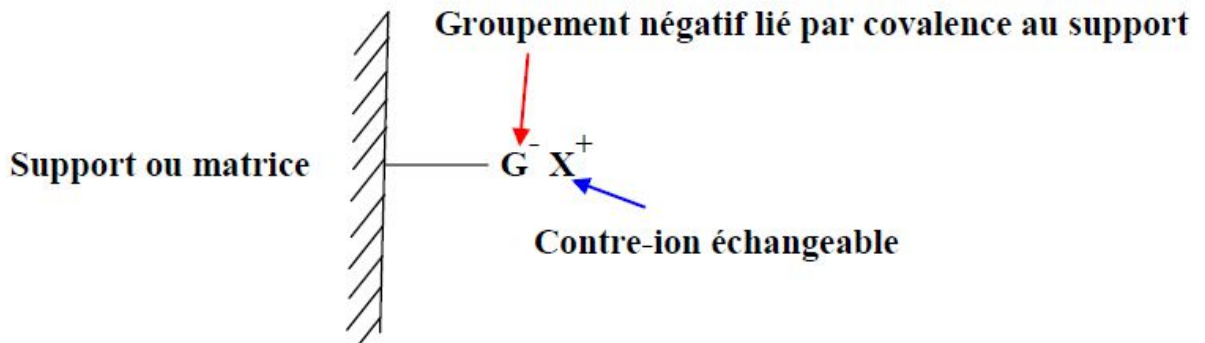


Figure 2. Schéma d'une résine échangeuse de cations (résine cationique).

- **Les échangeurs d'ions**

Ce sont des solides plus ou moins poreux, gélifiables le plus souvent, se présentant sous forme granulée. Ils constituent un réseau de macromolécules insolubles. Il existe deux grands groupes de résines utilisées dans ce type de chromatographie:

1. Les résines échangeuses de cations dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature anionique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

- Résines cationiques fortes: Résines sulfoniques (très fortement ionisées quelque soit le pH).
- Résines cationiques intermédiaires: Résines phosphoriques.
- Résines cationiques faibles: Résines carboxyliques (non ionisées en milieu acide fort).
- Résines cationiques très faibles: Résines phénoliques (ionisées en milieu basique uniquement).

2. Les résines échangeuses d'anions dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature cationique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

- Résines anioniques fortes (résines à amine quaternaire).
- Résines anioniques faibles (résine à amine secondaire).

- **Applications**

La chromatographie échangeuse d'ions est utilisée au laboratoire, depuis la préparation de l'eau déminéralisée jusqu'à l'analyse de traces ioniques dans un échantillon. Elle s'applique à l'analyse et à la séparation de sels minéraux, d'acides aminés, de peptides, de protéines, de nucléotides, d'acides nucléiques, de lipides et de glucides ionisés.

II.3. La chromatographie d'exclusion (filtration sur gel ou tamisage moléculaire)

- **Principe**

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de **leur taille** et de **leur forme**. On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0).

Les petites molécules et les molécules de taille moyenne sont éluées plus tardivement, elles pénètrent dans les pores du gel, leur migration est donc retardée (**Fig. 3**).

La chromatographie d'exclusion stérique est généralement utilisée pour déterminer le poids moléculaire des composés d'un échantillon par l'utilisation de substances standards.

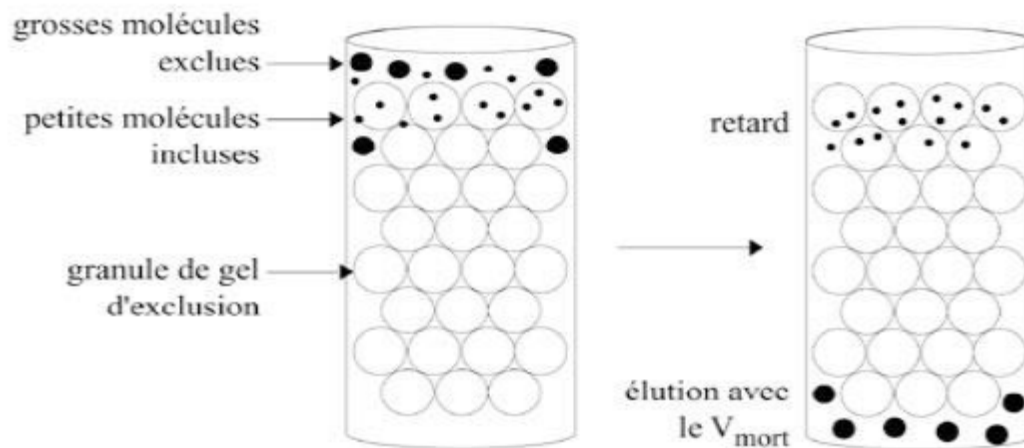


Figure 3. Tamisage moléculaire.

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

- **Le diamètre des pores (la porosité):** Il est fixé par le degré de réticulation du gel qui correspond à la proportion de substrat dans l'ensemble de la phase stationnaire. Il détermine le pouvoir de séparation (séparation microporeuse ou macroporeuse).
- **L'inertie chimique:** Le gel ne doit pas réagir avec la phase dispersante. Il se dégrade si le pH est inférieur à 2 et supérieur à 8. Donc il doit être inerte chimiquement vis-à-vis des composés de l'échantillon et de la phase mobile.

- **La stabilité physico-chimique:** Le gel doit être résistant à la température et à la pression de l'expérience.

- **La taille et la forme des particules (la granulométrie):** Les particules du gel sont petites de granulométrie de 40 à 300 μm en chromatographie classique et de 20 à 80 μm en haute performance.

- **La forme:** La forme sphérique assure un écoulement uniforme de la phase mobile.

- **La nature:** Les gels peuvent être en dextran, en polyacrylamide ou en agarose.

- **Applications de la chromatographie d'exclusion stérique**

Le domaine d'application de ce type de chromatographie est celui de la séparation des macromolécules de masses molaires élevées.

- Séparation de petites molécules et de macromolécules: Comme l'élimination des ions d'une solution de macromolécules (exemple le facteur VIII antihémophilique) et la purification d'une protéine après marquage à l'iode 131.

- Analyse d'un mélange de macromolécules: C'est la purification de fractions plasmatiques (immunoglobulines M) pour la préparation de médicaments ou de réactifs de diagnostic.

- Fractionnement de petites molécules: Il regroupe l'analyse de peptides (en analyse alimentaire dans les fromages), l'analyse d'enzymes et l'analyse de colorants dans les produits alimentaires.

- Séparation de cellules: La chromatographie sur gel de dextran permet d'isoler les lymphocytes des monocytes.

- Détermination des poids moléculaires: La meilleure méthode est l'étalonnage direct des colonnes de chromatographie d'exclusion stérique avec des étalons de poids moléculaires connus tels que le cytochrome C (12600), la myoglobine (17500), l'albumine (68000), l'ovalbumine (45000) et la γ -globuline (160000).

II.4. 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.

La chromatographie de partage convient très bien à la séparation de molécules très polaires de masses moléculaires inférieures à 3000(composés non-ioniques).

II.5. La chromatographie d'affinité

- **Principe**

Dans ce type de chromatographie, 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 .

Trois types d'affinités sont utilisées :

- affinité enzyme-substrat
- affinité ligand-récepteur
- affinité antigène-anticorps

Très souvent, la molécule fixée sera le substrat, le ligand, ou bien l'anticorps. Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène(**Fig.4**), respectivement.

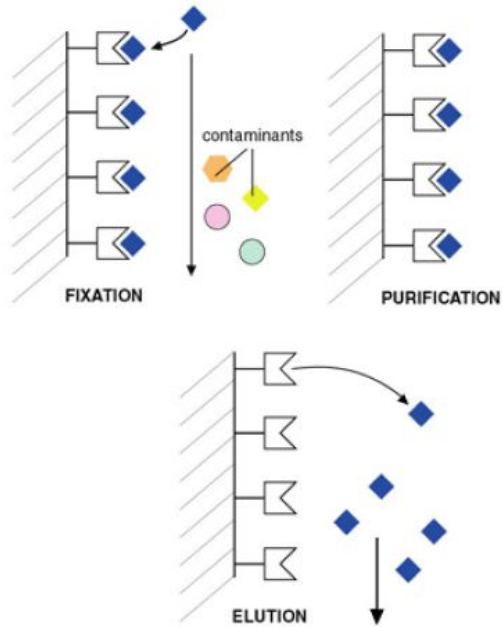


Figure 4. Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité

- **Etape de FIXATION :** Le mélange de molécules contenant le composé à purifié est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.
- **Etape de PURIFICATION :** En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.
- **Etape d'ELUTION :** La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluant.

• Applications

La chromatographie d'affinité est adaptée, soit à l'analyse, soit à la préparation de substances biologiques. Elle a été utilisée en:

- 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.)

III. Chromatographie sur colonne

C'est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases:

- La phase stationnaire: support solide.
- La phase mobile: le solvant.

La vitesse de déplacement des composés dans la colonne dépend de:

- L'affinité à la phase stationnaire: plus que l'affinité à la phase stationnaire est grande, plus que le déplacement des composés dans la colonne est très lent.
- La solubilité dans la phase mobile (plus que le composé est très soluble dans la phase mobile, plus que son déplacement dans la colonne est très vite).

Le choix du type de chromatographie et du support dépend de la nature des composés à séparer (Tab. 1).

Tableau 1: Choix du type de chromatographie et du support.

Type de chromatographie	Nature de l'adsorbant	Nature des composés à séparer
Adsorption	Gel de silice	Molécules organiques simples, molécules contenant plusieurs groupements polaires, substances électrophiles, substances à haut poids moléculaire.
	Oxyde d'aluminium	Vitamines, alcaloïdes, colorants, substances à caractère nucléophile.
Partage	Gel de silice	Substances très polaires.
	Oxyde d'aluminium Kieselguhr	Substances très polaires. Sucres et composés amphotères, acides aminés.
Partage en phase inverse	Film E.C.S. 511 V	Composés hydrophiles de séries homologues.
	Film E.C.S. 541 V Polyamide Cellulose	Phénols et dérivés nitrés aromatiques. Acides gras et leurs esters méthyliques.
Electrophorèse	Gel de silice	Amines, acides aminés et peptides, colorants
	Oxyde d'aluminium Kieselguhr	Hétérocycles azotés polynucléaires Acides nucléiques
Echange d'ion	DEAE Ecteola Sephadex Dowex	Composés dont la charge électrique dépend du pH. (Nucléotides et acides carboxyliques)