

LES CHROMATOGRAPHIES

La chromatographie est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange ; les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile ; ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur. L'origine du mot chromatographie vient peut-être de la séparation de composés colorés puisque chroma (Χρωμα) en grec, signifie couleur et graphie signifie écrire.

1. Classification des techniques chromatographiques

Les méthodes chromatographiques se classent en trois façons:

a- Classification selon la technique mise en jeu

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

b- 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)

La SFC représente un cas intermédiaire entre LC et GC, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

c- 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).

2. La chromatographie en phase liquide

2.1 La 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, 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.

a. La chromatographie sur papier

Elle utilise des feuilles de papier filtre maintenues verticales dans une cuve qui est une enceinte fermée.

Il existe une phase stationnaire constituée par l'humidité du papier et une phase mobile qui est un solvant organique ou un mélange. Cette phase mobile va être disposée au fond de la cuve à la base du papier de telle sorte qu'elle monte par capillarité = chromatographie ascendante. Si

elle est disposée près du bord supérieur du papier dans un petit récipient qui permet au solvant de couler lentement de haut en bas de la feuille = chromatographie descendante. Avant le passage du solvant, on va déposer sur le papier une goutte de l'échantillon à analyser et le solvant va séparer les substances contenues dans l'échantillon. Une fois le passage du solvant terminé, on va recueillir la feuille de papier ou chromatogramme, on va la sécher et on va la révéler. On va donc faire apparaître les différentes molécules qui ont été séparées sous forme de tache à l'aide d'un procédé approprié.

b. La chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

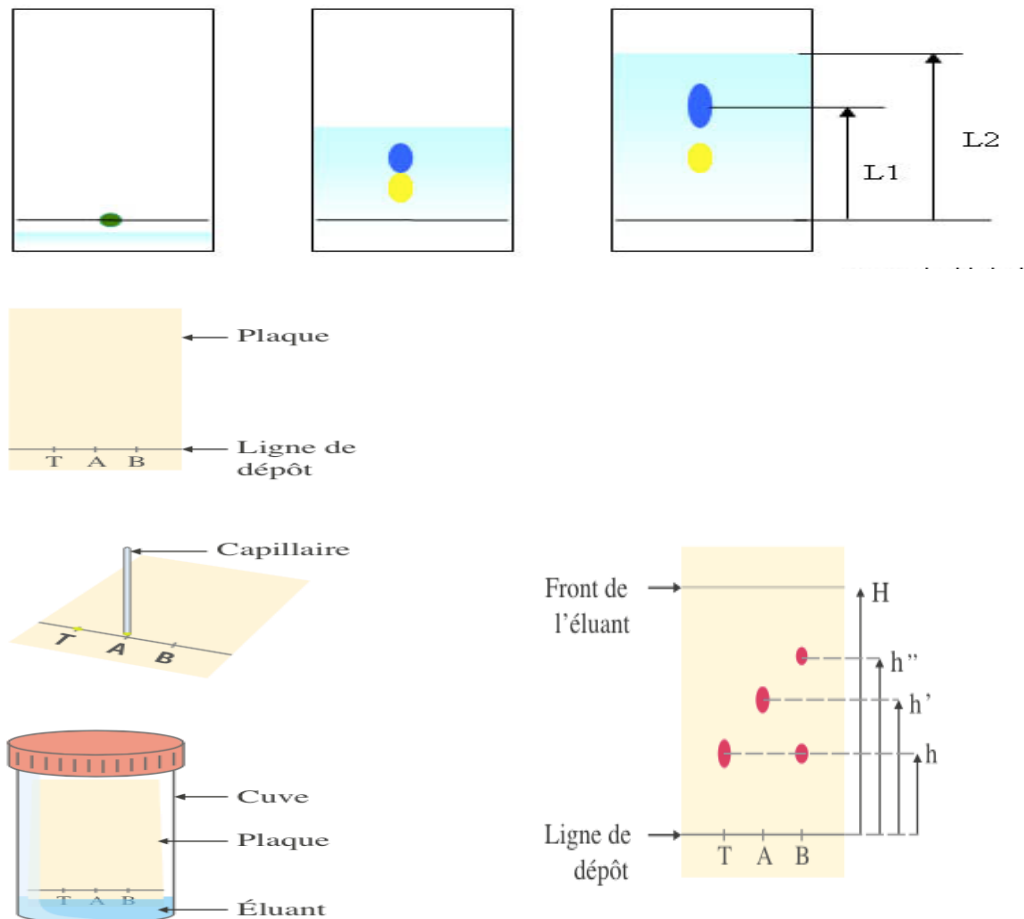
La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre de forme variable ; fermé par un couvercle étanche. La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixé sur une plaque de verre ou une feuille de matière plastique ou d'aluminium à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté, l'amidon ou polymère organique. L'échantillon : environ 1 μ l de solution diluée (2 à 5% de mélange à analyser) déposé en un point repère au-dessus de la surface de l'éluant. L'éluant : un solvant pur ou un mélange, il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

Les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine et la cellulose. Ils sont utilisés dans une granulométrie plus grande en chromatographie sur colonne. L'éluant peut être composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants ; il ne doit pas être ni trop polaire (entraînant les composants) ni trop apolaire (empêchant leur migration). Les solvants sont caractérisés par leur différence de polarité et leur non miscibilité. A l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée de l'autre d'environ 1 cm. L'éluant qui aura entraîné le soluté à une distance proche de la moitié de la plaque sera considéré comme bon éluant.

Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'éluant et le soluté :

- La solubilité : on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.
- La polarité de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre

L'analyse est **qualitative** ou **quantitative**. Dans le cas de solutés incolores, il est nécessaire de visualiser les spots par une réaction colorée (qui peut être générale ou spécifique) ou par fluorescence; c'est la **révélation**. L'identification des constituants du mélange se fait par comparaison avec des témoins, en calculant le R_f (rapport au front) de chaque soluté, ou encore le R_t (rapport à un témoin) lorsque le solvant a dépassé le niveau supérieur de la plaque.



2.2 La chromatographie d'adsorption

L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide (ou gaz) 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 met en œuvre des phases stationnaires ayant des propriétés adsorbants, 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.

a. La chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est une méthode préparative qui permet de séparer et d'isoler les constituants d'un mélange. Cette technique est fondée principalement sur des phénomènes d'adsorption et permet de séparer pratiquement tous les mélanges possibles. Il suffit de trouver les bonnes conditions.

La phase stationnaire remplit une colonne de longueur et de section variables. Le mélange, en solution très concentrée, est déposé au sommet de la colonne. La séparation des constituants du mélange résulte de l'écoulement continu d'un éluant à travers la colonne par gravité. Dans la technique classique, l'éluant est un solvant unique mais on peut accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des constituants du mélange.

La phase stationnaire : Une grande surface spécifique de l'adsorbant est souhaitable pour obtenir de meilleures séparations. Les adsorbants les plus utilisés sont : l'alumine et le gel de silice.

L'éluant : L'éluant généralement employé est un mélange de deux solvants. Le plus souvent, au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les constituants les moins polaires (les moins retenus par l'adsorbant) ; on augmente ensuite la polarité de l'éluant par addition graduelle du solvant le plus polaire ; on élue ainsi les constituants les plus polaires. Il faut faire des essais sur CCM avec différents éluants pour avoir une bonne séparation entre les produits.

La vitesse d'élution : La vitesse d'élution doit être la plus constante possible; elle doit être suffisamment lente pour que le soluté soit plus près de l'équilibre entre les phases mobile et

stationnaire. Si la vitesse d'élution est trop faible, les constituants diffusent dans l'éluant. Le chromatogramme présente alors des bandes larges et la séparation est médiocre ; une vitesse d'élution élevée n'est autorisée que dans le cas où les substances à séparer ont des polarités très voisines.

La chromatographie sur colonne présente plusieurs inconvénients :

- Elle nécessite une grande quantité d'éluant
- La durée de l'élution est en général très grande (au minimum, plusieurs heures)
- La détection des composés exige une attention constante
- Il est indispensable de coupler cette chromatographie avec d'autres méthodes de façon à pouvoir détecter les constituants du mélange.



Colonne classique

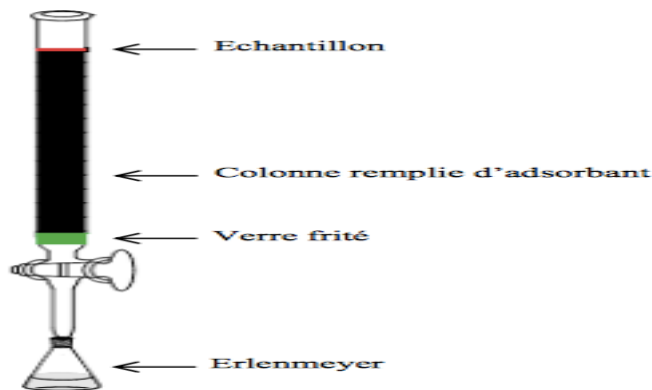


Schéma d'une colonne chromatographique

2.3 La chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie ionique (CI) est une technique analytique qui permet l'analyse qualitative (par séparation des espèces présentes) et quantitative des espèces ioniques présentes dans un échantillon liquide dépourvu de matières en suspension. La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour séparer des molécules ionisables, quelle que soit leur taille: ions minéraux

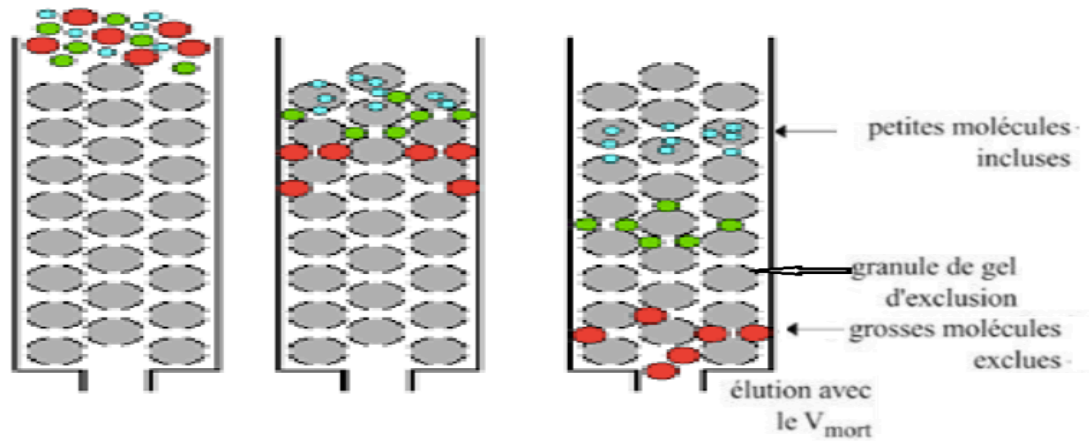
(tous les cations alcalins, alcalino-terreux ou métalliques), acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés. C'est une méthode analytique de référence en analyse des eaux, et est adaptée aux milieux biologiques.

- 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.

2.4 La chromatographie d'exclusion

Dans cette technique de chromatographie on utilise des granules de gels poreux, dont les pores ont une taille voisine de celle des molécules des composés. La séparation résulte de la différence de taille, et est fondée sur la possibilité du soluté à pénétrer ou à ne pas pénétrer à l'intérieur des pores de la phase stationnaire (limite d'exclusion). Les molécules de l'échantillon ; certains sont assez petites pour pénétrer dans la matrice poreuse, tandis que les plus grandes restent dans le volume interstitiel de la phase stationnaire. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

- Les phases stationnaires sont constituées par des polymères réticulés organiques ou minéraux, sous forme de grains sphériques de 3 à 10 mm de diamètre avec des pores compris entre 4 nm et 200 nm, sous forme de billes ou de perles parfaitement calibrées.
- La phase mobile doit surtout être capable de mouiller la phase stationnaire et d'éviter l'adsorption. Lorsque le gel est mou, le solvant doit pouvoir le gonfler puisque la taille des pores de ce gel dépend de la quantité de solvant imbibée. Les solvants les plus couramment utilisés sont : Eau, chloroforme, trifluoroéthanol.

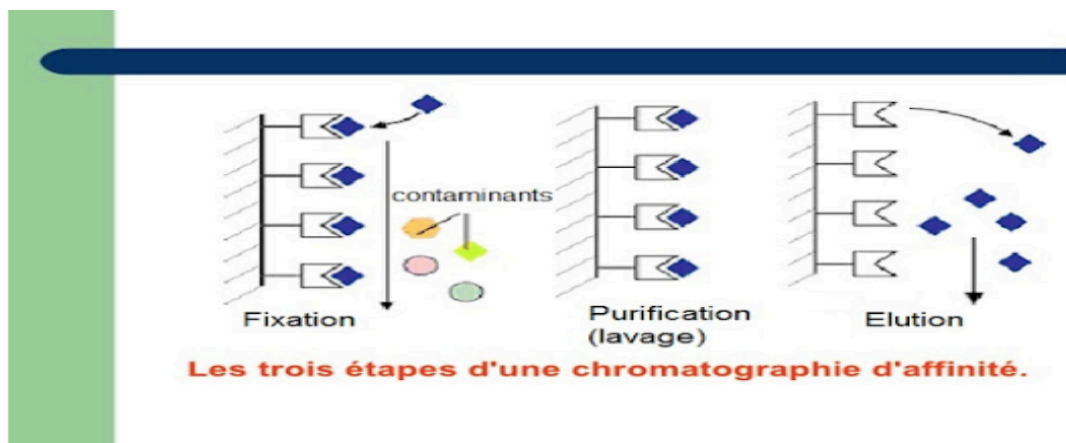


V = volume mort de la colonne, c'est le volume d'élution d'une substance qui n'interagit pas avec la phase stationnaire

Variation du **volume d'élution** en fonction de la **masse moléculaire** du soluté au cours d'un **tamissage moléculaire**

2.5 La chromatographie d'affinité

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. 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'élution pour faire en sorte que la protéine se détache du ligand.



étapes de chromatographie d'affinité

2.6 La chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance appelé HPLC est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier. Elle met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. Son développement très rapide, à partir de 1970, réside dans le fait qu'elle n'a pas les inconvénients de la chromatographie liquide classique ; cette dernière a toujours été peu utilisée, en raison de la lenteur de la séparation ; de l'absence de détecteur qui aurait permis de suivre facilement le développement de chromatogramme et la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

Un appareil CLHP comporte différents modules: un réservoir contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur à travers lequel un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer et un système d'acquisition de données. Il nécessite également un dispositif de dégazage. Les différents modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm).

Durant le pompage, dans la chambre de mélange ou dans la colonne elle-même, si les solvants ne sont pas dégazés, l'air dissout dans le liquide soumis à de forte pression, forme des bulles à l'intérieur du système, c'est là un inconvénient majeur pour le fonctionnement de la plupart des détecteurs en particulier ceux qui utilisent des propriétés optiques.

Le détecteur UV-Visible mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand. La phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

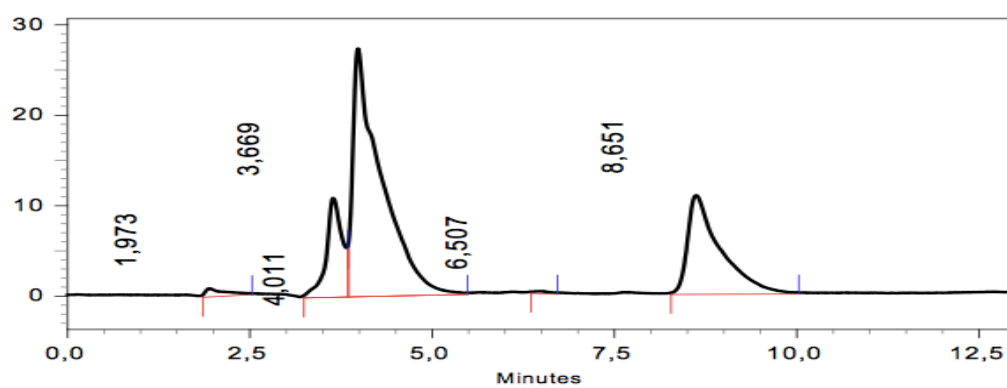
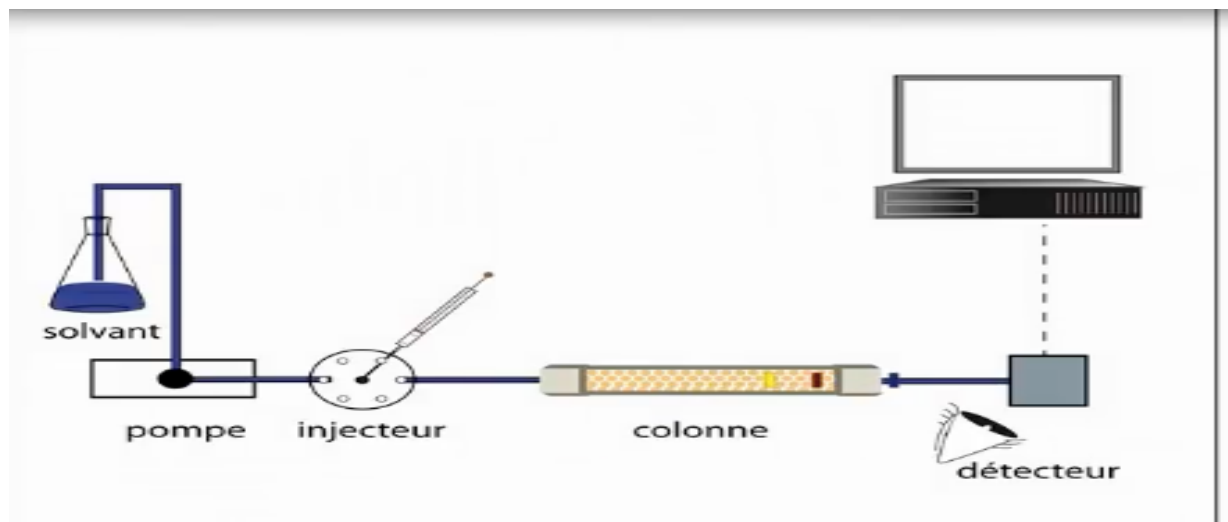
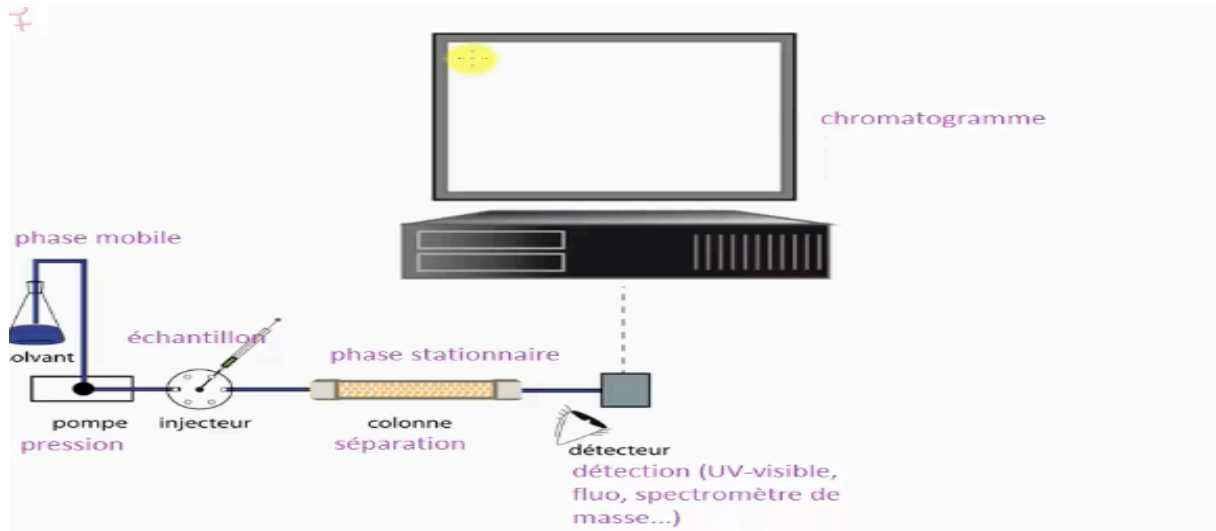


Schéma montrant la séparation de trois constituants par chromatographie

3. La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation applicable aux composés gazeux ou susceptible d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition (dont la masse moléculaire $MM < 300$) ; 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:

- La chromatographie de partage : La chromatographie gaz-liquide : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.
- La chromatographie d'adsorption : La chromatographie gaz-solide : la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.

- La chromatographie en phase gazeuse est une transposition de la chromatographie sur colonne dans laquelle la phase mobile liquide a été remplacée par un gaz.
- La CPG gaz-solide est une chromatographie d'adsorption, la phase stationnaire étant un solide adsorbant, la migration différentielle est assurée par les différences d'adsorbance.
- La CPG gaz-liquide est une chromatographie de partage, la phase stationnaire étant un liquide non volatile réparti sur un support inerte. Le gaz vecteur est le gaz qui véhicule les solutés. La migration différentielle est obtenue par les différences de solubilité dans le liquide fixe. Le soluté se partage entre le gaz vecteur et le liquide stationnaire.
- Le gaz vecteur peut être de l'hélium, de l'azote, de l'hydrogène ou de l'argon, son choix dépend de facteurs tels que la disponibilité, la pureté, la consommation et le type de détecteur utilisé (avec des détecteurs à conductivité thermique, on choisit l'hélium en raison de sa conductivité thermique élevée par rapport à la plupart des vapeurs de composés organiques).
- L'alimentation en gaz vecteur à haute pression implique des débitmètres et des régulateurs de pression, l'efficacité de l'appareil dépend beaucoup du maintien d'un débit constant du gaz vecteur.