

Les méthodes chromatographiques

1. Définition de la chromatographie

La chromatographie est une **méthode d'analyse physico-chimique** qui permet de **séparer 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.

Donc chaque soluté **migre à une vitesse caractéristique** dépendant de sa **solubilité dans la phase mobile** et de son « **affinité** » pour la phase fixe.

2. Classifications des méthodes chromatographiques

2.1. Classification selon la finalité

On distingue :

- La chromatographie analytique :

On cherche à **identifier le ou les solutés** présents dans une solution.

- La chromatographie préparative :

On cherche à **séparer les solutés** présents dans un mélange (utilisation en purification).

2.1. Classification selon la technique utilisée

Il existe de nombreuses techniques de chromatographie qui peuvent être classées en fonction de la nature de la phase mobile et du mode d'immobilisation de la phase stationnaire.

2.1.1. Classification selon la nature de la phase mobile

La phase mobile peut être :

- un liquide \Leftrightarrow chromatographies en phase liquide (CPL),
- un gaz \Leftrightarrow chromatographies en phase gazeuse (CPG),
- un fluide supercritique = fluide soumis à une haute pression par exemple : cas de la chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography, ou HPLC)

2.1.2. Classification selon le mode d'immobilisation de la phase stationnaire

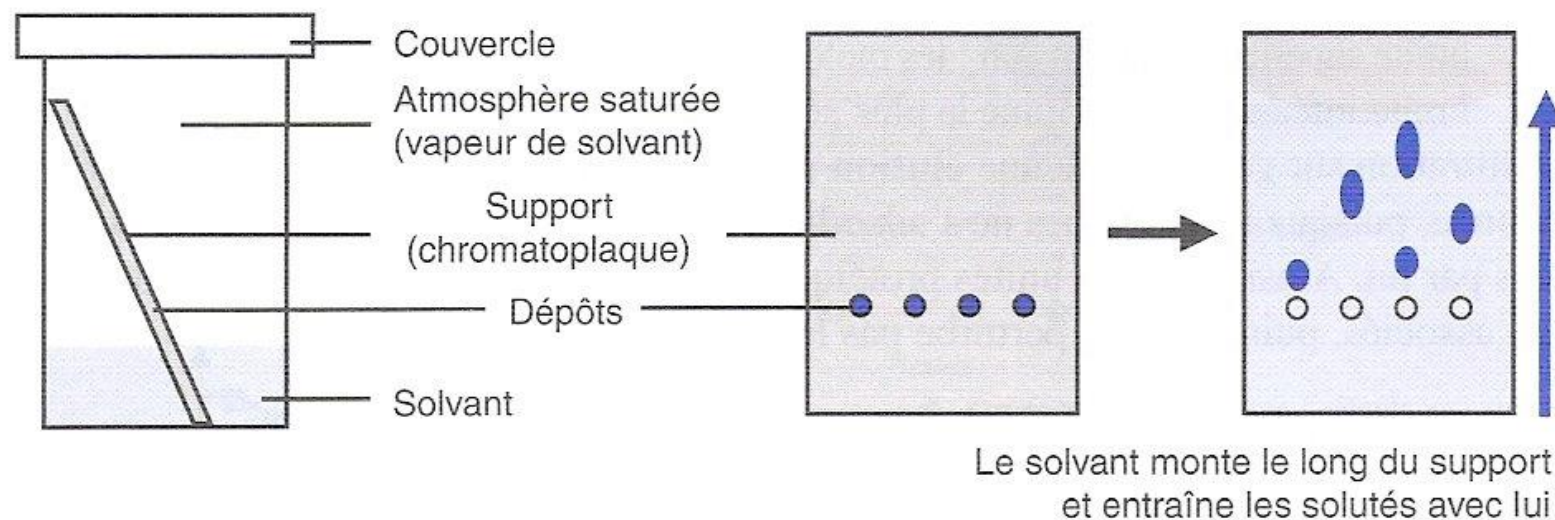
La phase stationnaire peut être immobilisée selon deux modes :

2.1.2.1 Chromatographies planaires

Si la phase stationnaire est étendue sur une surface plane \Leftrightarrow chromatographie planaire

Exemples : chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie sur papier.

Dans ces cas, les solutés migrent dans la phase stationnaire et n'en sortent pas.



2.1.2.1 Chromatographies sur colonne

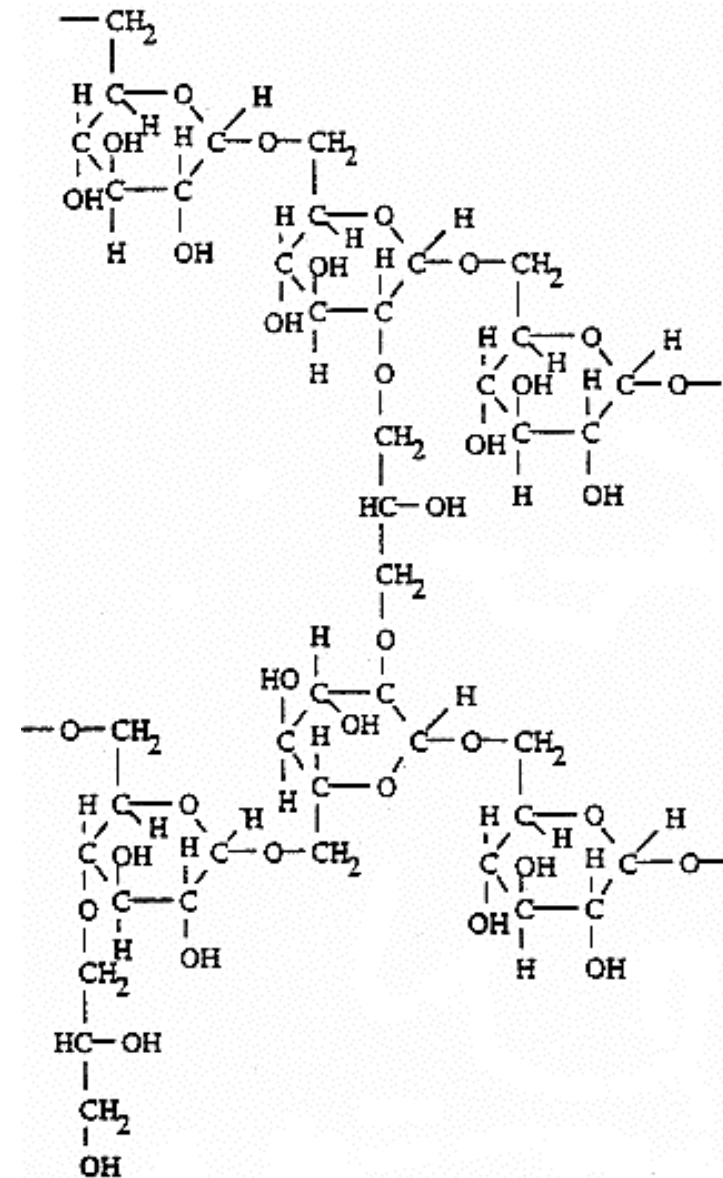
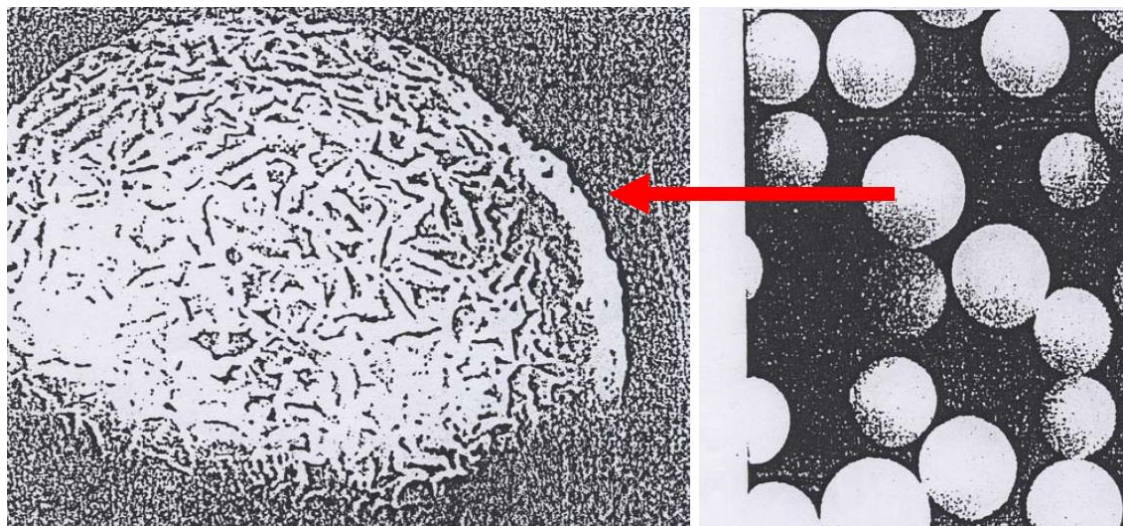
Si la phase stationnaire est immobilisée dans une colonne \Leftrightarrow **chromatographie sur colonne**

Le support, ou matrice, utilisé en chromatographie sur colonne pour constituer la phase stationnaire s'appelle un gel de résine.

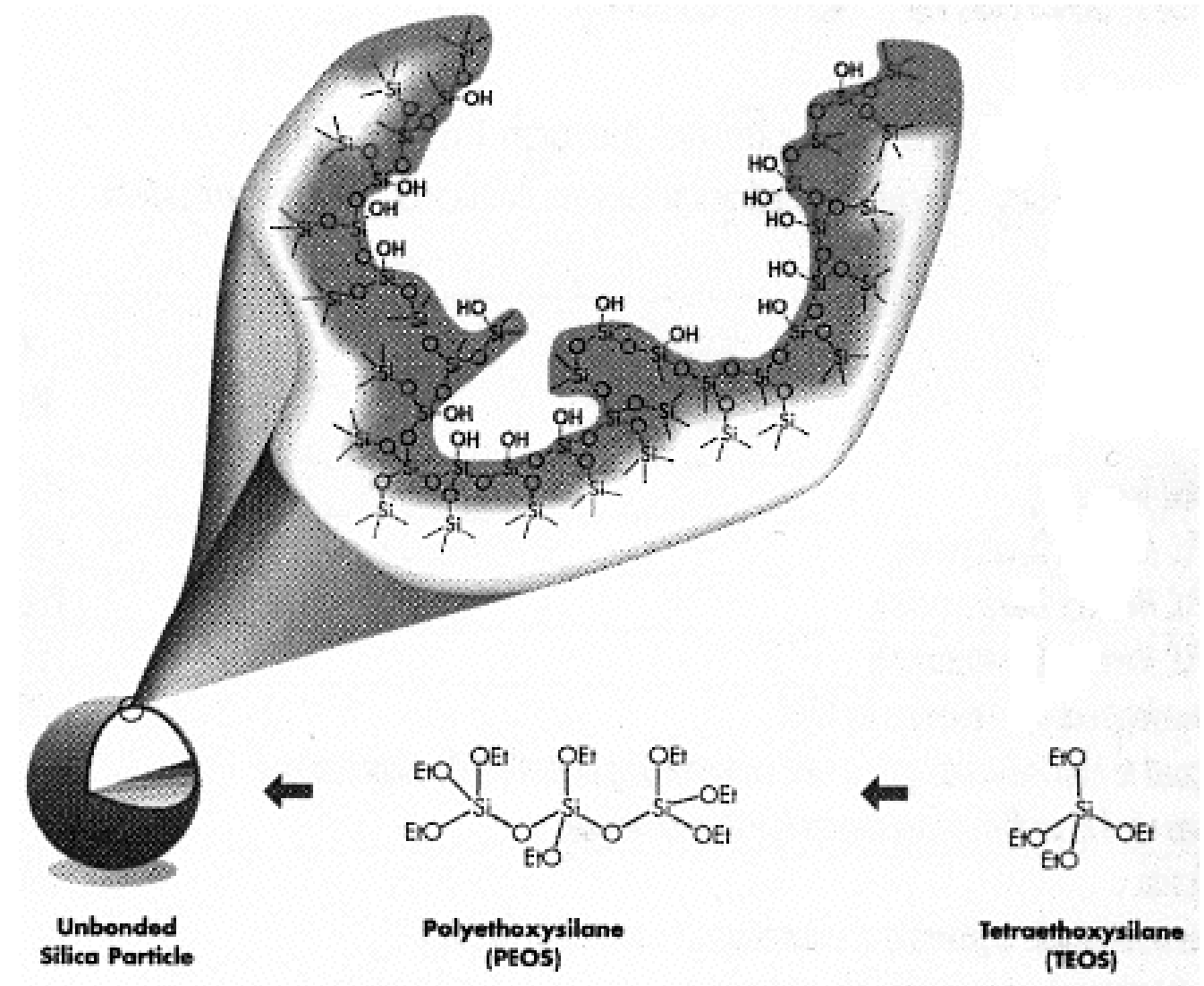
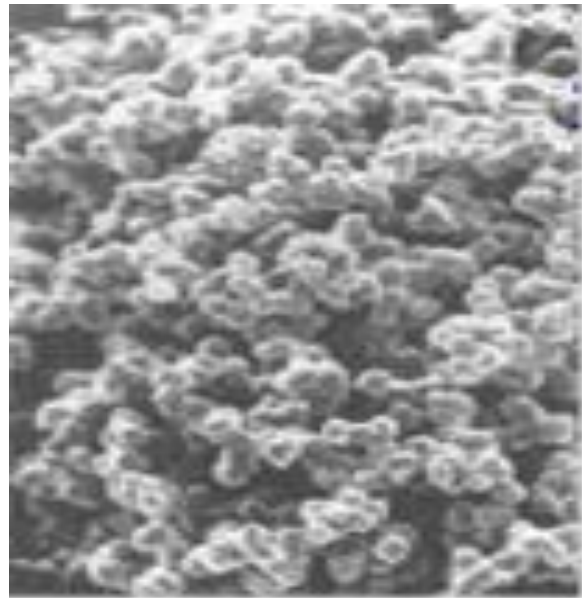
Le gel de résine se présente souvent sous la forme de billes (sphériques ou, plus rarement, de forme irrégulière) qui sont des polymères de différents types de molécules, par exemples :

- de **styrène-divinylbenzène** pour certaines résines échangeuses d'ions

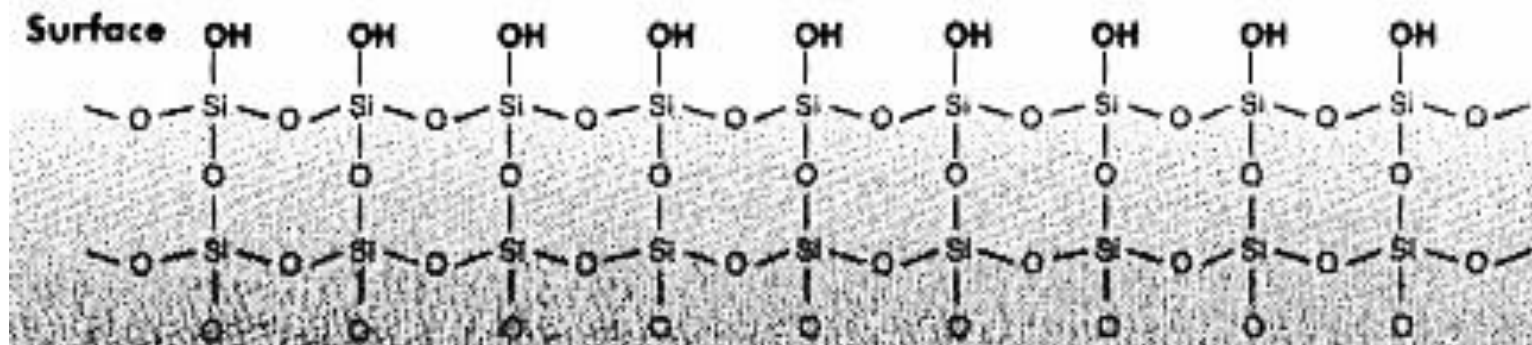
- de **polyholoside**, pour les gels de résine d'exclusion-diffusion
- Exemple du Séphadex :



- de **silice**, greffée ou non:

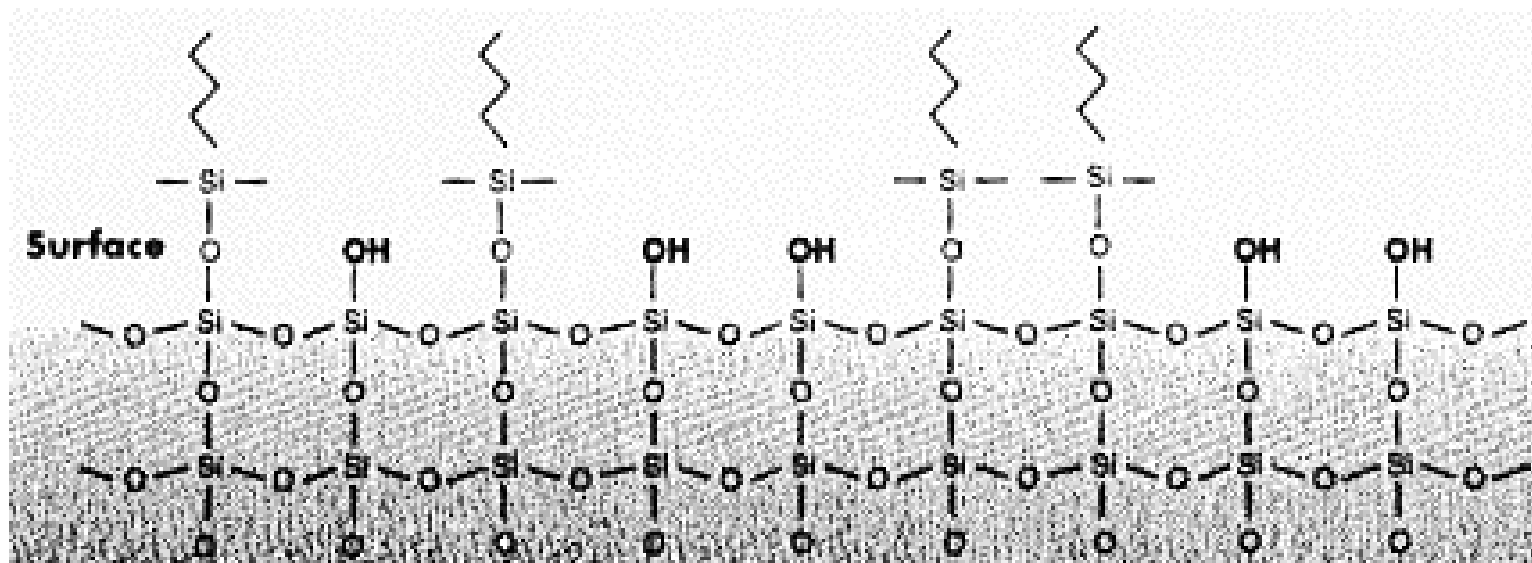


- Si la silice est « vierge » ou si on greffe des groupements polaires \Leftrightarrow chromatographie en phase normale



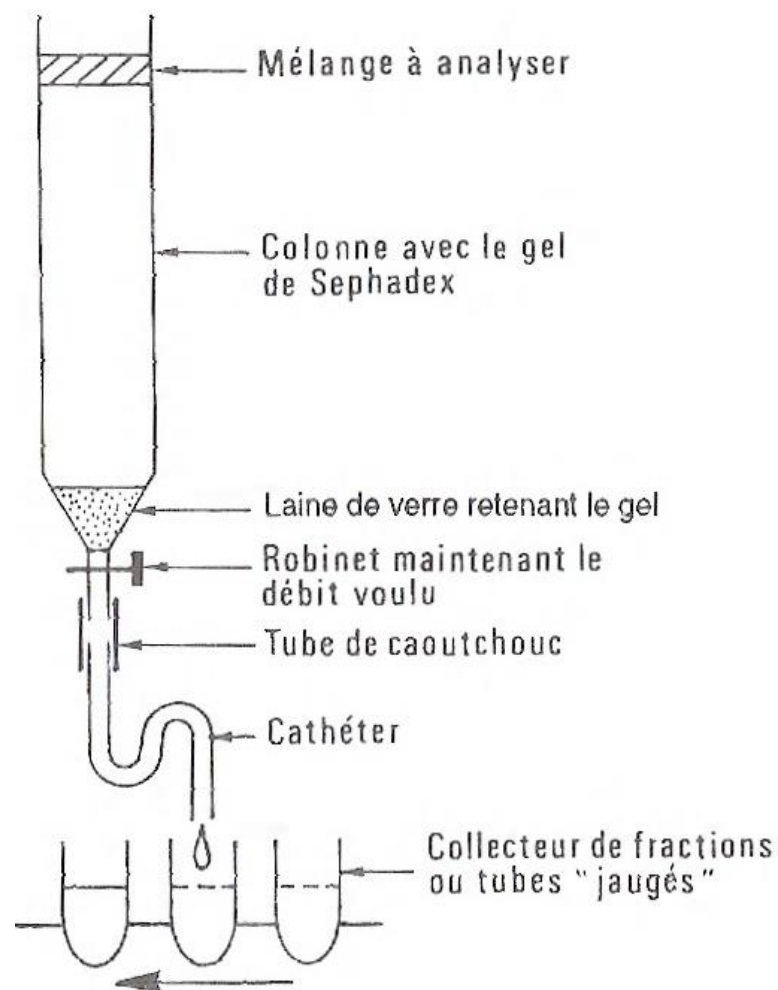
→ caractère polaire
⇒ chromatographie en phase normale

- Si des groupements hydrophobes/apolaires sont greffés à la silice \Leftrightarrow chromatographie en phase inverse (reverse phase, RP)



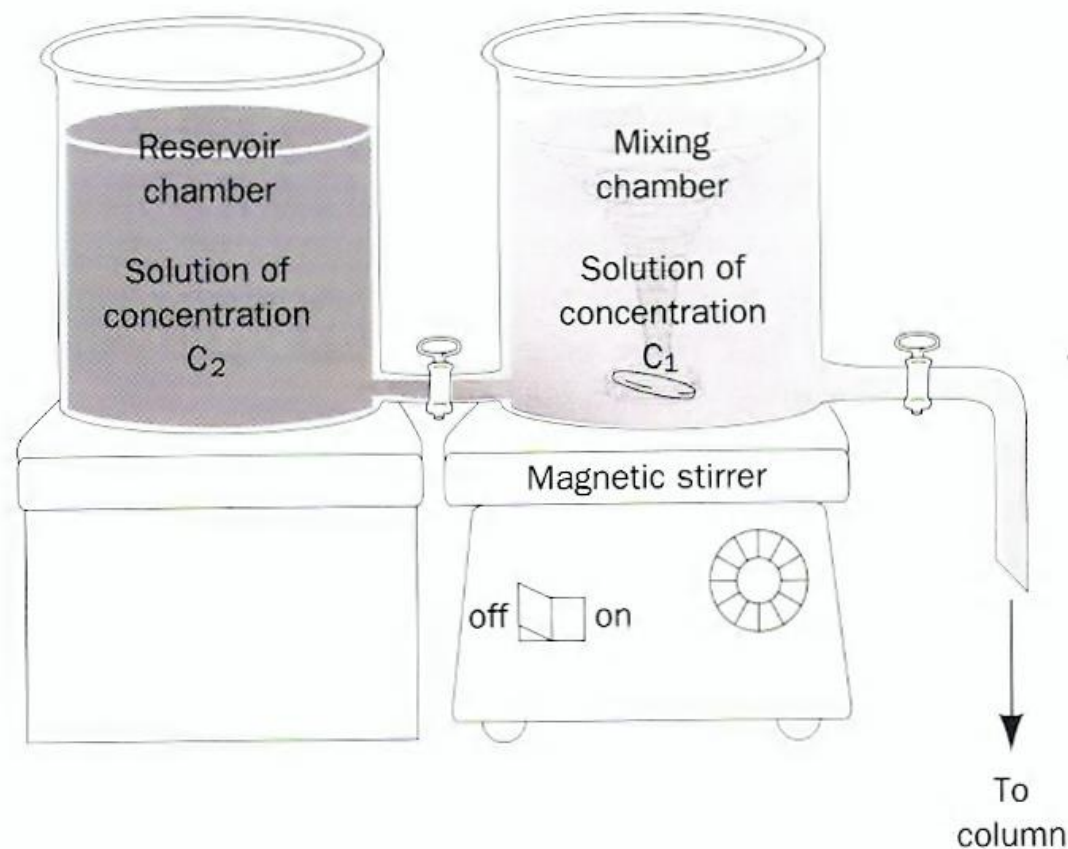
→ caractère apolaire/hydrophobe
⇒ chromatographie en phase inverse

La chromatographie sur colonne peut se réaliser à **basse pression** (à pression atmosphérique).



Dans le cas des chromatographies sur colonne, **les solutés sortent de la phase stationnaire** ⇒ **élution**.
On peut alors recueillir l'effluent dans des **fractions**.

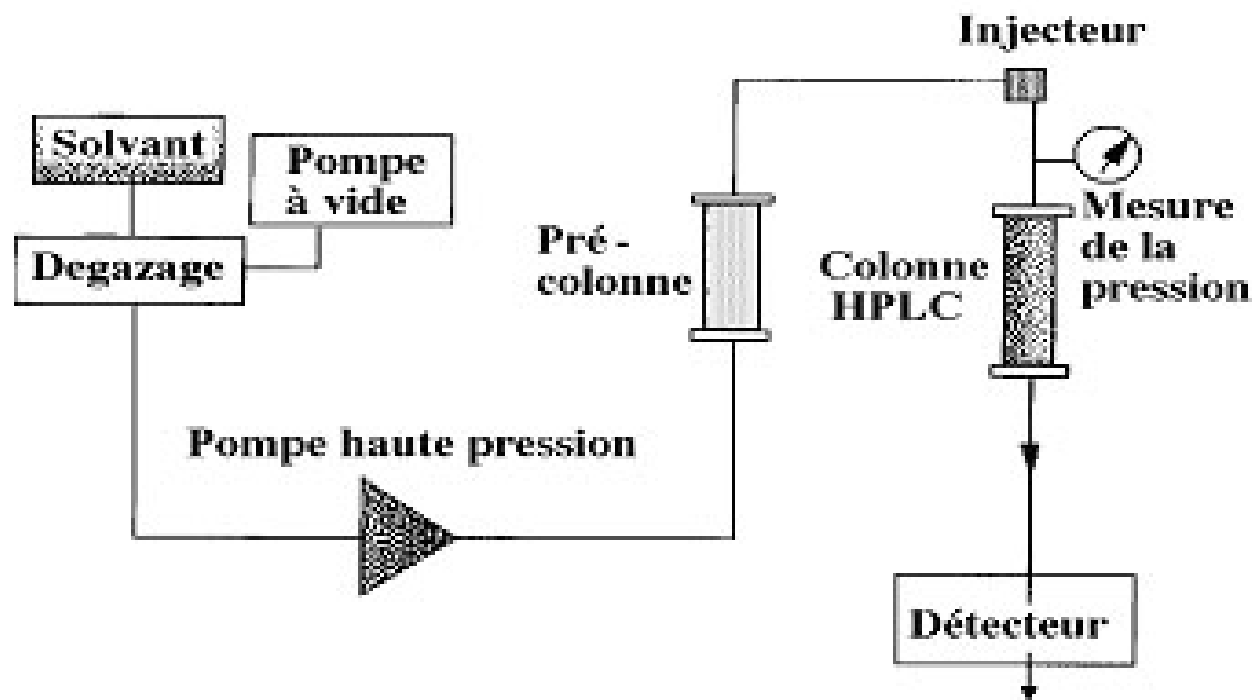
L'éluion des solutés retenus sur la colonne est obtenue en changeant la composition chimique de la phase mobile, soit brusquement, soit en établissant un gradient continu.



Si l'éluion est réalisée sans modification de la composition de la phase mobile \Rightarrow éluion isocratique.

Certaines méthodes de chromatographie sur colonne peuvent se réaliser à moyenne ou haute pression.

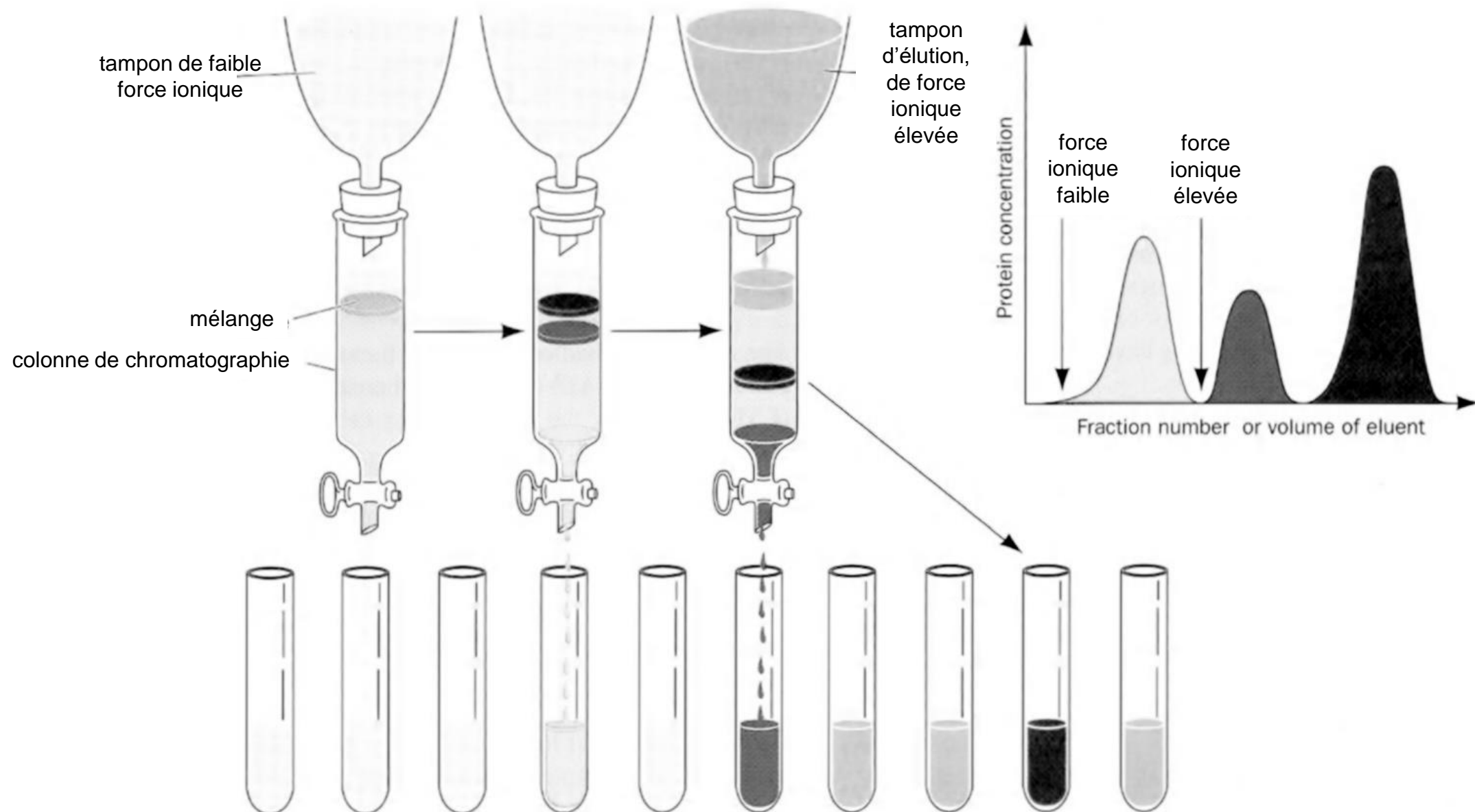
Exemple : chromatographie liquide haute performance (*high performance liquid chromatography*, HPLC)



Le suiti de l'élution des molécules d'intérêt peut être réalisé par différentes techniques : spectrophotométrie d'absorption moléculaire, fluorimétrie, réfractométrie, etc.

Exemple : suivi de l'élution des protéines par spectrophotométrie à $\lambda = 280 \text{ nm}$ (absorption liée aux résidus d'acides aminés aromatiques tyrosine et tryptophane)

Suite à l'élution, les résultats se présentent sous la forme d'un chromatogramme.

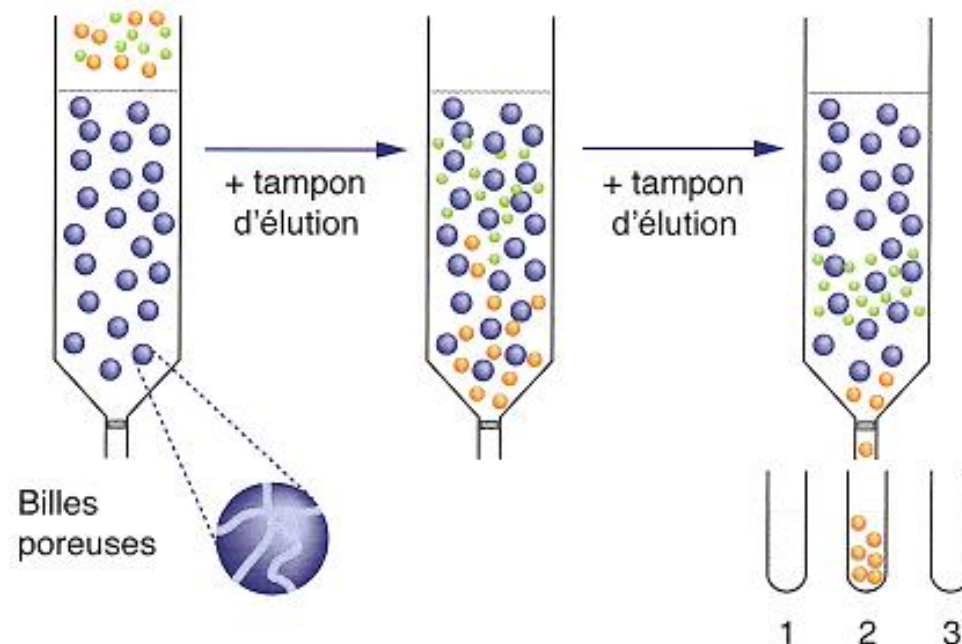


2.3. Classification selon les interaction entre solutés et phase stationnaire

2.3.1. Chromatographie exclusion-diffusion, ou gel filtration

- ✓ **Phase stationnaire** :
Résine de microbille poreuses inertes
- ✓ **Type d'interaction** :
Aucune. Les solutés sont séparés selon leur taille (masse molaire)
- ✓ **Élution** :
Pas de changement de composition de la phase mobile ⇒ élution isocratique

- ✓ **Exemple** :

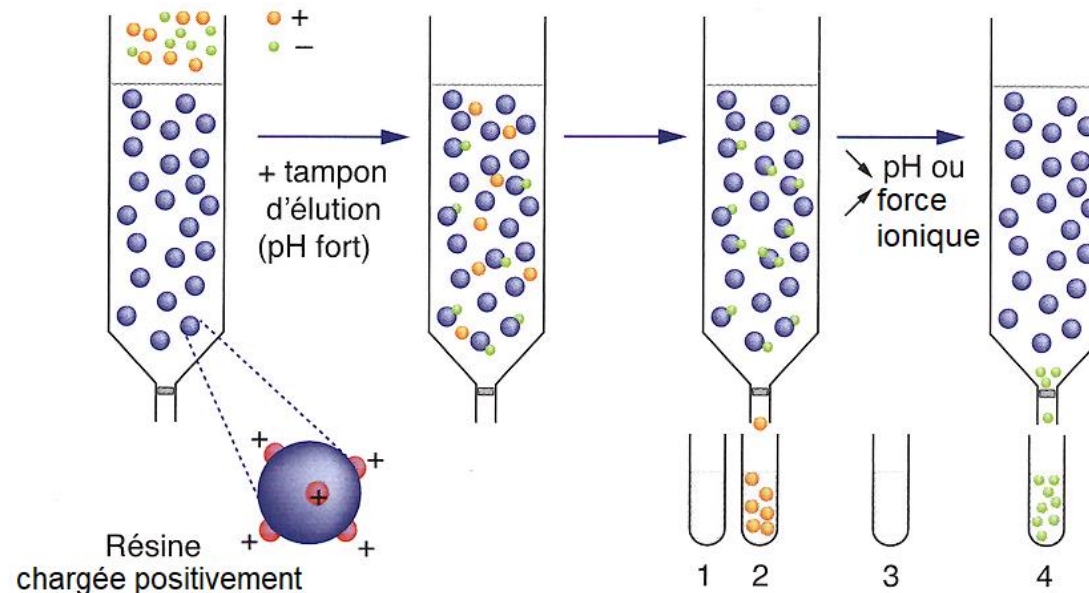


2.3. Classification selon les interaction entre solutés et phase stationnaire

2.3.2. Chromatographie échangeuse d'ions

- ✓ **Phase stationnaire** :
 Résine chargée : - négativement ⇒ chromatographie échangeuse de cations (exemple : carboxyméthylcellulose)
 - positivement ⇒ chromatographie échangeuse d'anions (exemple : DEAE-cellulose)
- ✓ **Type d'interaction** : liaisons ioniques entre les solutés et la résine chargée
 ⇒ séparation selon la charge du soluté
- ✓ **Élution** : - modification du pH de l'éluant dans le cas des solutés amphotères
 - augmentation de la force ionique de l'éluant, en utilisant un contre-ion

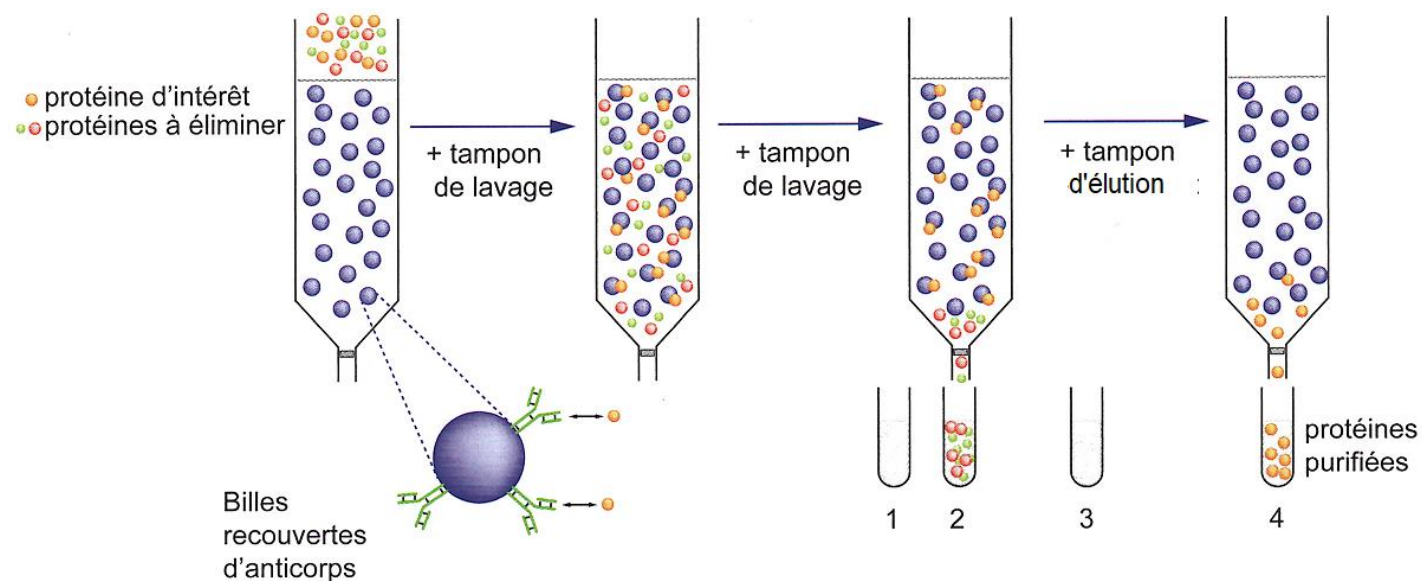
- ✓ **Exemple** :



2.3. Classification selon les interaction entre solutés et phase stationnaire

2.3.3. Chromatographie d'affinité

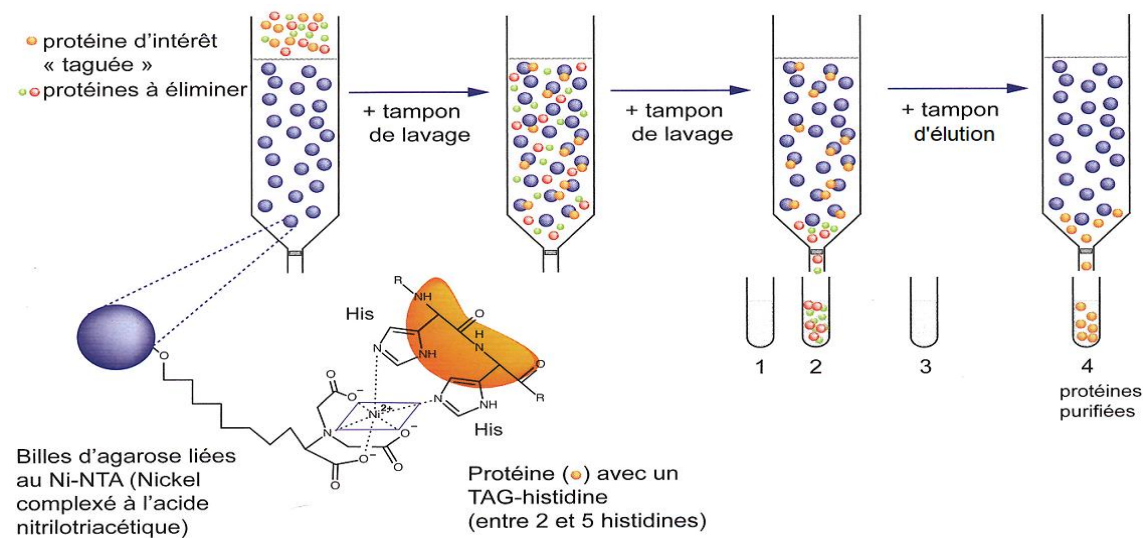
- ✓ **Phase stationnaire** : Billes sur lesquelles sont fixés des **ligands biospécifiques** (antigène, anticorps, substrat, enzyme, récepteur, *etc.*) par liaisons covalentes.
- ✓ **Type d'interactions** : **Interactions biospécifiques** (antigène/anticorps, enzyme/substrat, récepteur/ligand)
- ✓ **Élution** :
 - **Modification des conditions de pH** , de **force ionique**.
 - **Compétition avec un ligand libre** (soit identique au ligand fixé mais ajouté à fortes concentration, soit un ligand différent de plus grande affinité).
- ✓ **Exemple** :



2.3. Classification selon les interaction entre solutés et phase stationnaire

2.3.4. Chromatographie par chélation, ou IMAC (*Immobilised Metal Affinity Chromatography*)

- ✓ **Phase stationnaire :**
Cation métallique divalent, généralement **l'ion Ni²⁺** fixé sur un support.
- ✓ **Type d'interactions :**
Liaisons datives (chélation) entre le cation métallique divalent et les solutés porteurs de doublets libres (classiquement des résidus histidine greffés à des protéines recombinantes à purifier).
- ✓ **Élution :**
 - **diminution du pH (< 6) et de la force ionique.**
 - **ajout d'agent chélatant** (EDTA, EGTA, acide iminodiacétique, Tris), ou d'agent réducteur dans la phase mobile.
 - **gradient d'imidazole** : compétiteur des résidus d'histidine pour l'ion nickel Ni²⁺.
- ✓ **Exemple :**



2.3. Classification selon les interaction entre solutés et phase stationnaire

2.3.5. Chromatographie d'interactions hysrophobes

✓ **Phase stationnaire** :

Résines porteuses de groupements hydrophobes (aliphatiques, cycliques)

✓ **Type d'interactions** :

Interactions hydrophobes entre les groupements de la résine et les régions hydrophobes des solutés à séparer

Les solutés sont séparés selon leur hydrophobicité.

On travaille initialement en présence d'une forte concentration en sel (force ionique élevée) : les molécules d'eau de l'enveloppe d'hydratation des protéines sont « mobilisées » pour hydrater les ions issus de la dissociation du sel.

Les groupements hydrophobes des protéines sont plus exposés en surface.

Donc les conditions sont favorables pour l'établissement d'interactions hydrophobes entre des groupements hydrophobes de la protéine et le support.

✓ **Élution** :

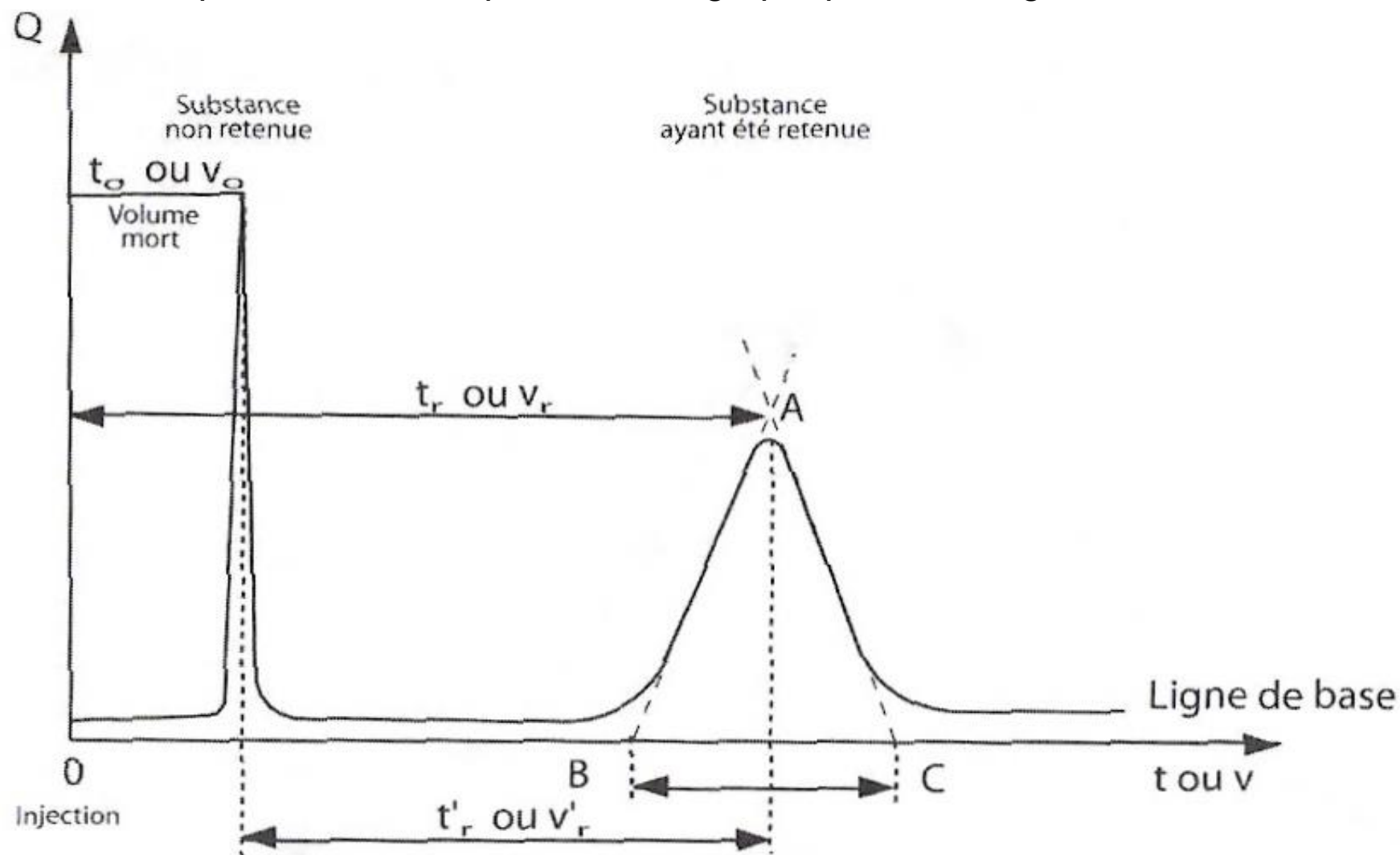
Diminution de la force ionique de la phase mobile.

✓ **Exemple** : [ici](#)

3. Caractéristiques d'un système chromatographique

3.1. Caractéristiques d'un pic chromatographique

L'éluion d'un soluté se traduit par le tracé d'un pic chromatographique d'allure gaussienne.



On relève différents paramètres :

- **le temps mort t_0** :
temps entre l'injection et la sortie d'un composé non retenu.
- **le temps de rétention t_r** :
temps entre l'injection et le sommet du pic chromatographique d'un soluté.
- **le temps de rétention réduit $t'_r = t_r - t_0$**
- **la largeur à la base ω** :
plus les pics sont fins, plus la séparation est fine.
- **la largeur à mi-hauteur d** .
- **la surface** :
proportionnelle à la quantité de composé.

Remarque :

Si le débit de la colonne est constant, on peut utiliser des volumes écoulés plutôt que des temps :

- **le volume mort V_0** :
volume écoulé entre l'injection et la sortie d'un composé non retenu
- **le volume d'éluion V_r ou V_e** :
volume écoulé entre l'injection et le sommet du pic chromatographique d'un soluté.

3.2. Caractéristiques d'un pic chromatographique

3.2.1. Efficacité d'une colonne chromatographique

Une colonne efficace est une colonne où les phénomènes de diffusion sont limités, donc où les pics sont fins.

L'efficacité est exprimée en nombre de plateaux théoriques N : $N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{\omega}\right)^2$

Remarque :

t_r et ω doivent être exprimés dans la même unité (temps, distance ou volume écoulé si le débit est constant).

Plus $\frac{t_r}{\omega^2}$ est élevé, plus N est élevé, plus une colonne chromatographique est efficace.

Remarque :

Si on utilise t_r' , on obtient le nombre de plateaux théoriques efficaces N_{eff} .

L'efficacité d'une colonne dépend :

- de sa **géométrie**,
- de son **garnissage** : meilleure efficacité si les particules de la phase stationnaire sont fines,
- du **débit de l'élution** : meilleure efficacité si débit faible.

3.2. Caractéristiques d'un pic chromatographique

3.2.2. Résolution d'une chromatographie

Résolution = aptitude du système chromatographique à séparer distinctement deux solutés d'un mélange.

Le facteur de résolution R_s entre le pic chromatographique d'un soluté A et celui d'un soluté B est calculé selon :

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{r(B)} - t_{r(A)})}{\omega_{(B)} + \omega_{(A)}}$$

Si $R_s > 1,5$: séparation complète de A et B \Rightarrow les pics chromatographiques de A et B sont distinctement séparés.

Si $1,5 \geq R_s \geq 0,75$ ($R_s \approx 1$) : séparation incomplète de A et B \Rightarrow les pics chromatographiques de A et B se chevauchent.

Si $R_s < 0,75$: les solutés A et B sont mal séparés \Rightarrow les pics chromatographiques de A et B sont confondus.