

Méthodes chromatographiques

1 . Généralités sur la chromatographie

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation, au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée, des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Les applications de ce procédé sont donc potentiellement très nombreuses, d'autant plus que beaucoup de mélanges hétérogènes ou sous forme solide peuvent être mis en solution par emploi d'un solvant (celui-ci apparaissant comme un composé supplémentaire).

L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit (fig. 1) :

1. On immobilise dans une *colonne* un solide finement divisé appelé *phase stationnaire* (papier, gélatine, silice, polymère, ..etc)
2. On place au sommet de cette colonne un petit volume de l'*échantillon* à séparer.
3. On force cet échantillon à traverser la colonne de haut en bas au moyen de la *phase mobile* afin d'entraîner ses divers constituants. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile.

En dehors de cette exploitation de la chromatographie qui perdure depuis son origine, ce procédé est devenu en soi une méthode d'analyse lorsqu'on eut l'idée de mesurer les temps de migration des composés dans la colonne pour les identifier. Pour cela il devenait indispensable de maîtriser certains paramètres (débits, température...) et il fallait placer en sortie de colonne un détecteur pour repérer les changements de composition de la phase mobile.

Cette application de la chromatographie, dont le but n'est plus de récupérer les composés séparés mais de mesurer leurs temps de passage dans la colonne s'est développée lentement.

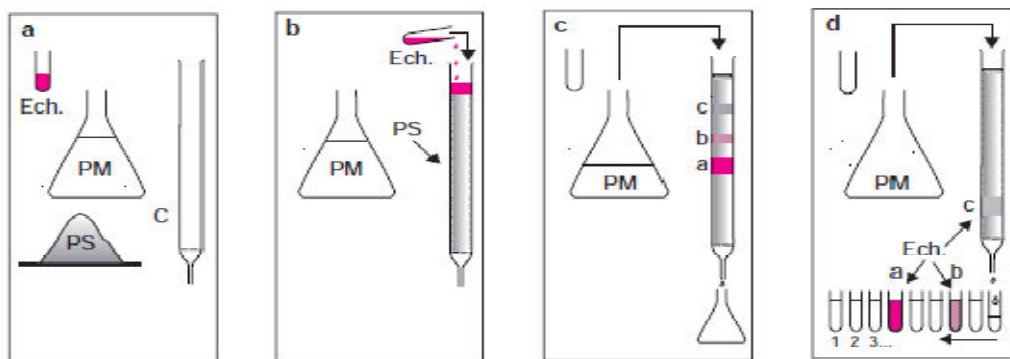


Figure 1 L'expérience de base en chromatographie.

- a) Les ingrédients nécessaires C, colonne, PS, phase stationnaire, PM, phase mobile et E, échantillon ; b), le dépôt de l'échantillon ; c) le début de l'élution ; d) la récupération des produits après séparation.

L'identification d'un composé par chromatographie correspond à une méthode comparative.

Pour identifier un composé, dont on ne sait s'il s'agit de A ou de B, par la méthode chromatographique, on compare son *temps de migration* à ceux des deux composés de référence A et B, ceci, sans changer d'appareillage et en se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales.

Dans une telle expérience de chromatographie analytique, on n'a pas effectué des séparations (il s'agit de produits purs) mais simplement repéré des temps de migration. Cependant il apparaît deux points faibles à cette méthode : le procédé est assez long de mise en oeuvre, l'identification n'est pas absolue.

Ce procédé particulier de fractionnement est né, sous sa forme moderne, au début du siècle dernier des travaux du botaniste Michaël Tswett à qui on attribue également l'invention des termes de *chromatographie* et de *chromatogramme*.

La technique s'est considérablement améliorée depuis ses débuts. On dispose actuellement de chromatographes pilotés par des logiciels qui rassemblent autour d'une colonne performante et miniaturisée (fig. 2). – pour pouvoir séparer des micro-quantités d'échantillon – tout un ensemble d'accessoires destinés à assurer la répétabilité des expériences successives par la maîtrise parfaite des différents paramètres de séparation.

Chaque séparation effectuée donne lieu à un enregistrement particulier appelé *chromatogramme*, qui correspond au tracé des variations de composition de la phase éluée au cours du temps. Pour obtenir ce document particulier, il faut placer à l'extrémité aval de la colonne un *capteur* dont il existe un grand nombre de variantes.

L'identification d'un composé moléculaire, à partir du chromatogramme, est quelquefois aléatoire. Une manière plus sûre consiste à associer deux techniques complémentaires. On réunit, par exemple, un chromatographe et un second appareil « en ligne », tel un spectromètre de masse ou un spectromètre infrarouge. Ces méthodes couplées, du second ordre (ou bidimensionnelles) permettent de récupérer deux types d'informations indépendantes (temps de migration et « spectre »). On peut alors déterminer avec certitude la composition de mélanges complexes ou la concentration de certains composés à partir de quantités de l'ordre du nanogramme (analyses de confirmation).

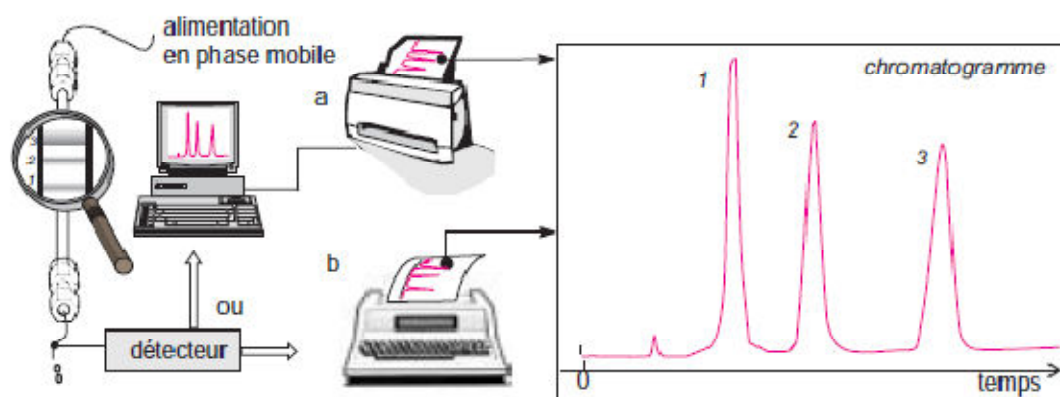


Figure 2 Principe de l'analyse par chromatographie.

Le chromatogramme, passage obligé de toute analyse chromatographique, est obtenu à partir des variations en fonction du temps d'un signal électrique envoyé par le détecteur.

Il est soit présenté en temps réel soit en différé à partir des valeurs instantanées mises en mémoire dans un micro-ordinateur. Les logiciels de chromatographie recalculent ces valeurs pour être mises au format désiré (a, imprimante). Pendant longtemps il a été obtenu avec un simple enregistreur graphique ou un enregistreur-intégrateur (b). Chromatogramme illustrant la séparation d'un mélange de 3 constituants principaux.

Noter l'ordre d'apparition des pics en correspondance avec la position de chaque constituant dans la colonne.

2 . Le Chromatogramme

Le *chromatogramme* est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne (fig. 3). Le temps (ou très rarement le *volume d'élution*) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. La *ligne de base* correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. La séparation est complète quand le chromatogramme présente autant de *pics chromatographiques* revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser.

Un constituant est caractérisé par son *temps de rétention* t_R , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal t_R est indépendant de la quantité injectée. Un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_M , appelé temps mort (désigné également par t_0).

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé t'_R .

En analyse quantitative on se contente le plus souvent de bien séparer du mélange le ou les constituants à doser. Si le signal envoyé par le capteur varie linéairement avec la

concentration d'un composé, il en sera de même de l'aire du pic correspondant sur le

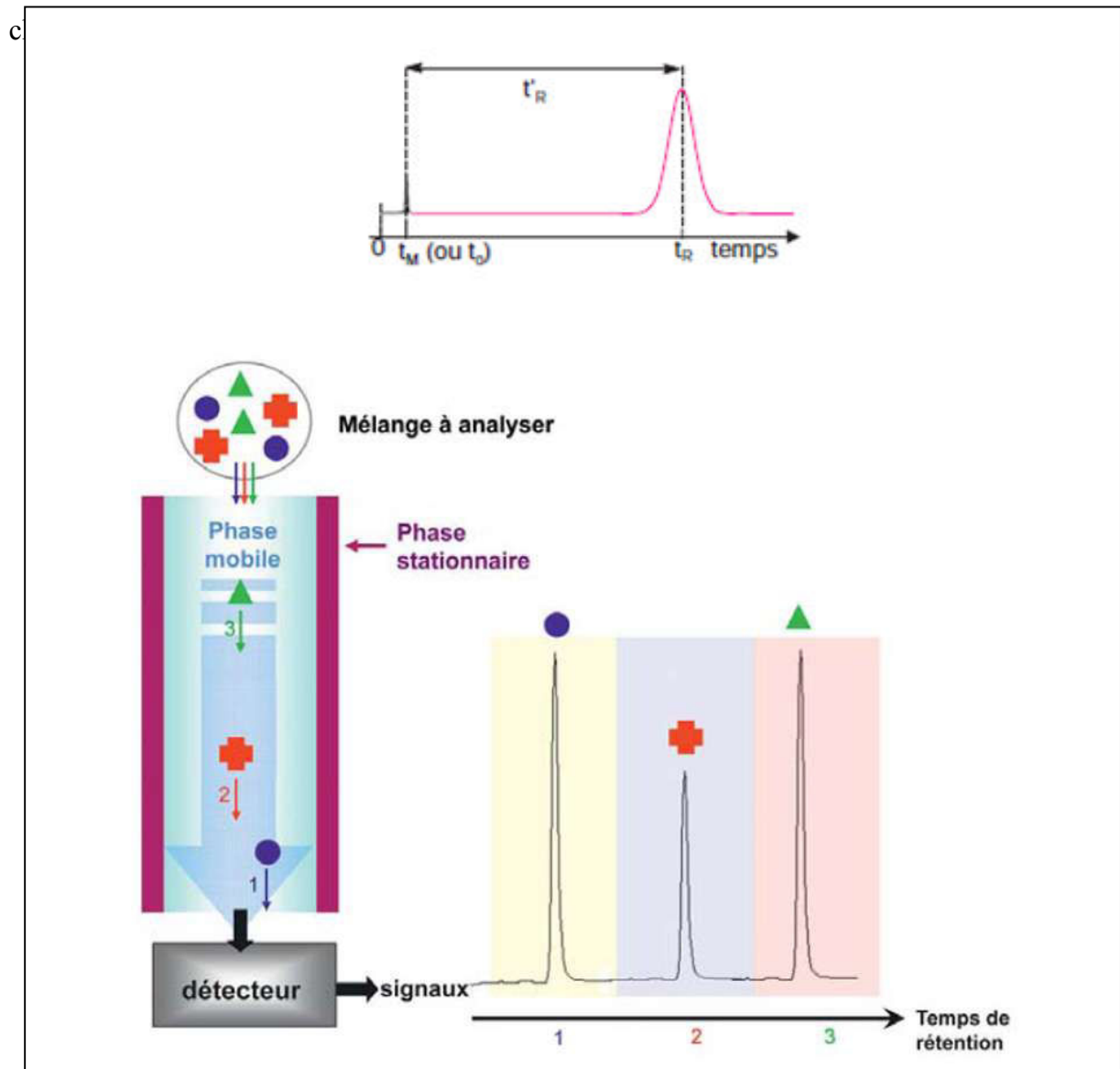


Figure 3 Pics chromatographiques

3 . Les diverses techniques chromatographiques

Les techniques chromatographiques peuvent être réparties suivant plusieurs critères et en particulier en fonction de la *nature* des deux phases en présence.

Le classement suivi ci-après est établi à partir de la nature physique des phases (fig. 4).

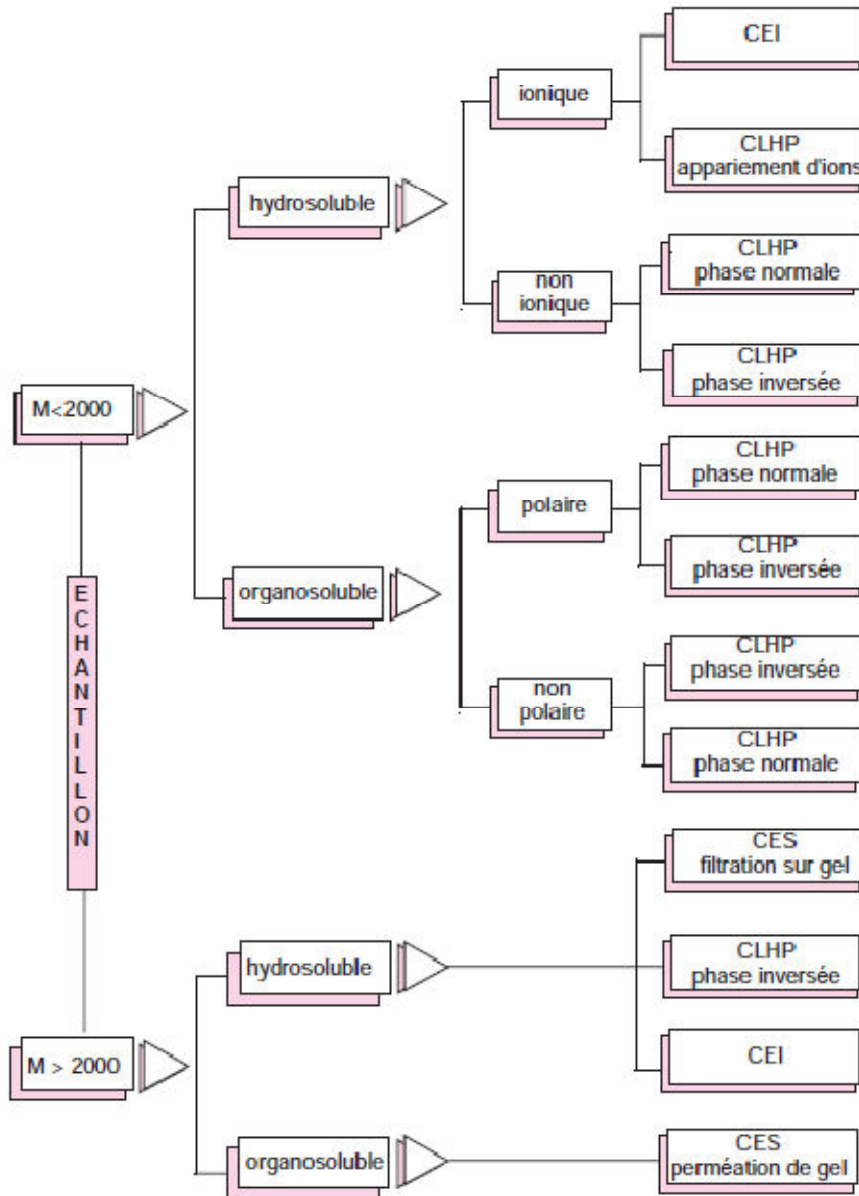


Figure 4 Guide de sélection se rapportant aux différentes techniques chromatographiques utilisant une phase mobile liquide. On choisira en fonction de la séparation à effectuer, la technique la mieux adaptée.

3.1. Chromatographie en phase liquide (CPL)

Ici la phase mobile est un liquide. C'est ce type de chromatographie auquel appartient la forme la plus anciennement connue en tant que méthode préparative de séparation. Cette catégorie très répandue peut être subdivisée d'après le phénomène mis en jeu :

Chromatographie liquide/solide (ou d'adsorption). La phase stationnaire est un milieu solide perméable sur lequel les molécules adhèrent. Les phases stationnaires ont fait beaucoup de progrès depuis Tswett, qui utilisait le carbonate de calcium ou l'inuline (un polymère en poudre très fine du sucre ordinaire).

Chromatographie ionique. La phase stationnaire solide comporte en surface des sites ioniques et la phase mobile est une solution-tampon aqueuse. La séparation met en jeu des échanges entre les ions de l'échantillon avec ceux de la phase stationnaire.

Chromatographie d'exclusion. La phase stationnaire est un matériau comportant des pores dont les dimensions sont choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise ainsi une sorte de perméation sélective à l'échelle moléculaire. Cette technique est désignée par *filtration sur gel* ou *perméation de gel*.

Chromatographie liquide/liquide ou de partage (CLL). La phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un matériau inerte et poreux qui n'a qu'un rôle de support. L'imprégnation, le procédé le plus ancien pour immobiliser un liquide, est une voie maintenant abandonnée, par suite d'un risque important de lessivage de la colonne.

3.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La phase mobile est un gaz inerte et, comme précédemment, ce type de chromatographie peut être subdivisé selon le phénomène mis en oeuvre :

Chromatographie gaz/liquide (CGL). La phase mobile est un gaz et la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support inerte lequel peut être tout simplement la paroi de la colonne. À défaut d'être un gaz, l'échantillon doit donc être porté à l'état de vapeur. Ce sont Martin et Synge qui ont suggéré le remplacement de la phase mobile liquide par un gaz afin d'améliorer les séparations. C'est à partir de cette époque qu'on assista au véritable démarrage de la chromatographie analytique.

Chromatographie gaz/solide (CGS). La phase stationnaire est un solide poreux (carbone graphite ou gel de silice ou alumine) et la phase mobile est un gaz. Ce type de CPG est très performant pour les analyses de mélanges de gaz ou de composés à bas point d'ébullition .

4. Chromatographie d'échange d'ions:

La chromatographie ionique (CI) est une des plus anciennes techniques chromatographiques. Paradoxalement, les appareils automatiques de CI n'ont été développés que depuis un peu plus d'une quarantaine d'années (1975).

4.1 Principe

Le principe de la CI est simple : une colonne est composée d'une résine chargée soit positivement (pour séparer des anions) soit négativement (pour séparer des cations). L'éluant emporte les anions ou les cations à séparer. Selon que l'interaction électrostatique entre la résine de la colonne et les ions à séparer est plus ou moins forte, la séparation se fera plus ou moins facilement.

Le partage s'effectue en fonction de la charge. Un échangeur d'ions est une substance, généralement poreuse, sur laquelle est greffé un groupement chimique ionisable. Cette partie chargée peut interagir fortement avec des ions présents dans la solution chromatographiée. Ainsi des molécules chargées peuvent se fixer réversiblement sur l'échangeur d'ions et être ensuite relarguées de la résine, en modifiant la composition ionique du solvant.

4.2. Les différents types d'échangeurs d'ions

Les échangeurs d'ions sont des billes qui portent des groupements ionisables dont la charge est positive ou négative.

Type	Polymère	Groupe	Produits commerciaux
Faiblement acide (échangeur cationique)	Acide polyacrylique	$-\text{COO}^-$	Amberlite IRC50 Bio-Rex 70
	Cellulose ou Dextran	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	CM-Sephadex Cellex-CM
	Agarose	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	CM-Sephadex
Fortement acide (échangeur cationique)	polystyrène	$-\text{SO}_3^-$	Amberlite IR120 Bio-Rad AG50 Dowex 50
	Cellulose ou Dextran	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$	SP-Sephadex
Faiblement basique (échangeur anionique)	polystyrène	$-\text{CH}_2\text{N}^+\text{HR}_2$	Amberlite IR45 Bio-Rad AG3 Dowex WGR
	Cellulose ou Dextran	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	DEAE-Cellulose Cellex D
	Agarose	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	DEAE-Sepharose
Fortement basique (échangeur anionique)	polystyrène	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Amberlite IRA 401 Bio-Rad AG1 Dowex 1
	polystyrène	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	Amberlite IRA 410 Bio-Rad AG2 Dowex 2

4.3. Les étapes de séparation: (figure 05)

- Dépôts des substances sur la colonne choisie en fonction des charges des molécules.
- La fixation des molécules sur la phase stationnaire.
- Elution des molécules.

Il y a deux manières d'éluer les molécules fixées sur la résine :

- En modifiant le pH de la phase mobile de telle sorte que les molécules qui sont chargées ne le soient plus (ou qu'elles portent une charge de même signe que l'échangeur d'ions) ; il n'y a plus alors d'interaction électrostatique entre les molécules et le groupement chargé porté par la résine et les molécules sont éluées.
- En ajoutant un sel qui apporte forcément un ion de même charge que les molécules fixées à la résine : cet ion s'appelle un contre – ion exemple : Na^+Cl^- .

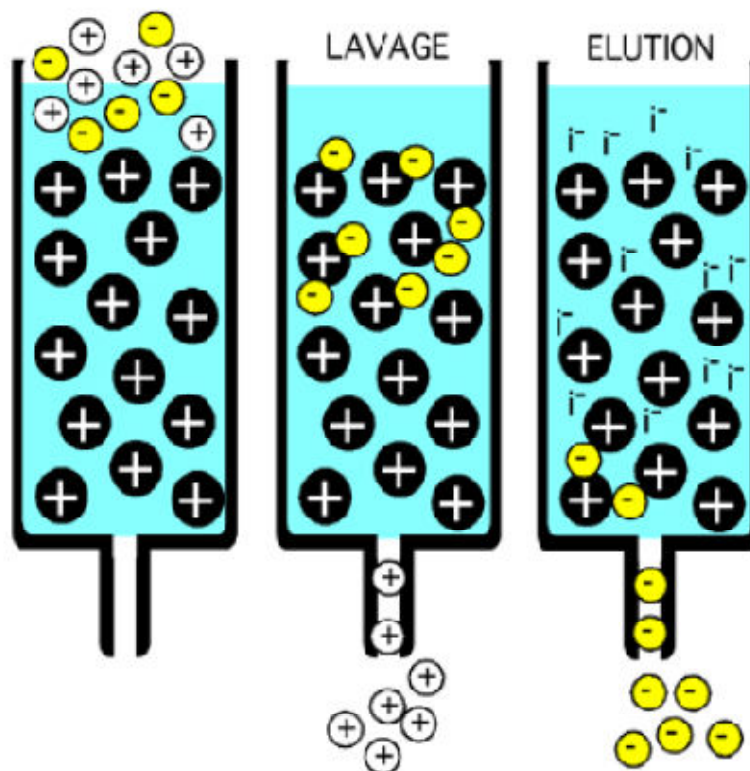


Figure 05: Les étapes de séparation d'une chromatographie ionique

4.4. Applications

La chromatographie par échange d'ions s'applique à un grand nombre de molécules biologiques chargées: les protéines, les acides aminés, les peptides, les acides nucléiques et les polysaccharides.

5. La chromatographie d'affinité

5.1. 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, respectivement.

La phase stationnaire (le gel d'affinité) : elle est constituée d'un effecteur fixé à un support (carboxyméthylcellulose, Séphadex, gel de polyacrylamide) par l'intermédiaire d'un bras de fixation ("spacer" en anglais).

5.2. Les étapes de séparation: (figure 06)

- **Etape de fixation** : Le mélange de molécules contenant le composé à purifier 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'éluion** : La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluant. On récupère la molécule soit en diminuant son affinité (par changement de pH ou de force ionique), soit en la remplaçant par une molécule, mise en gros excès, qui se fixe à sa place (compétition).

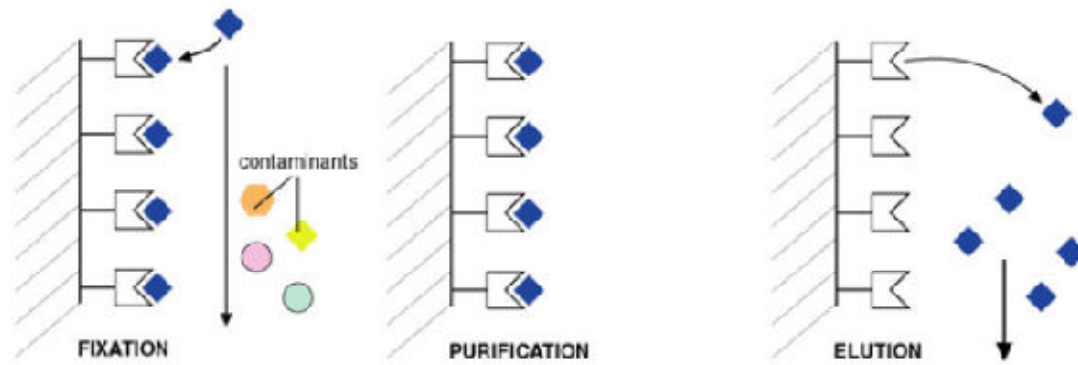


Figure 06 : Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

5.3. Applications

La chromatographie d'affinité est surtout appliquée dans l'isolement de protéines ou d'acides nucléiques.

