

## I. Méthodes chromatographiques

### 1. Introduction :

La **chromatographie** vient du grec ancien *chrôma* et désigne le mot « couleur ».

### Historique :

Le terme de "chromatographie" a été créé par Mikhaïl TSWETT en 1905, pour décrire une technique de séparation de pigments végétaux d'une feuille d'épinard (chlorophylles et caroténoïdes) sur des colonnes remplies d'une substance adsorbante,  $\text{CaCO}_3$  carbonate de calcium (phase stationnaire) + solvant l'éther de pétrole (phase mobile). (Fig.1)

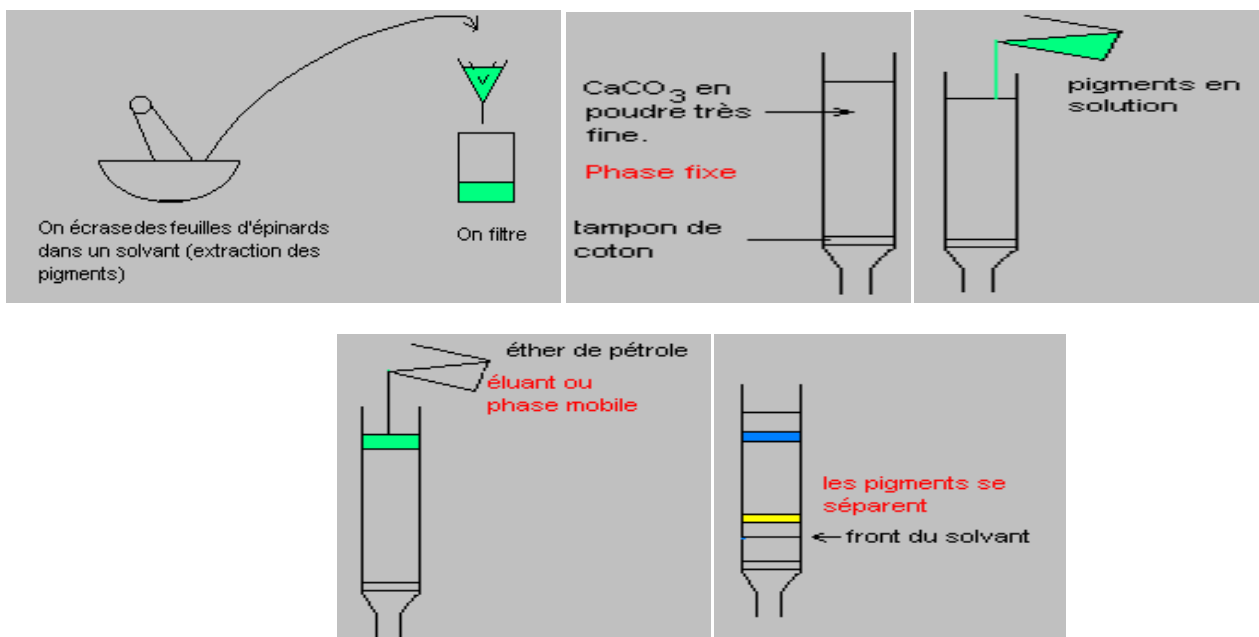


Figure 1 : La chromatographie

**Interprétation :** Les pigments verts sont en fait un mélange de pigments de plusieurs couleurs. En se déplaçant sélectivement sous l'effet du solvant (ou éluant) au travers de la colonne, les différents pigments se séparent.

- la poudre, immobile lors de l'expérience, est appelée **phase fixe ou stationnaire**.
- le solvant qui en se déplaçant entraîne le mélange et participe à sa séparation est appelé **phase mobile ou éluant**.

### 2. Définition :

La chromatographie, méthode qui sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une **phase mobile** le long d'une **phase stationnaire**.

Dans la chromatographie, chaque soluté est donc soumis à **deux** forces : une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

### Quelques définitions :

-**élution** est un procédé permettant de mettre en solution, un composé adsorbé à l'aide d'un solvant (l'éluant).

- **éluant** (phase mobile) solvant permettant d'éluer mélange (soluté).
- éluat** (résultat) solution recueillie au bas de la colonne.

### 2.1. Principe :

La séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules d'un mélange entre deux phases non-miscibles (qui ne se mélange pas): l'une mobile et l'autre stationnaire. Les molécules d'un mélange se partagent entre les deux phases: l'une phase mobile et l'autre stationnaire.

### 2.3.Appareillage :

Il existe 2 grands types d'appareillage.

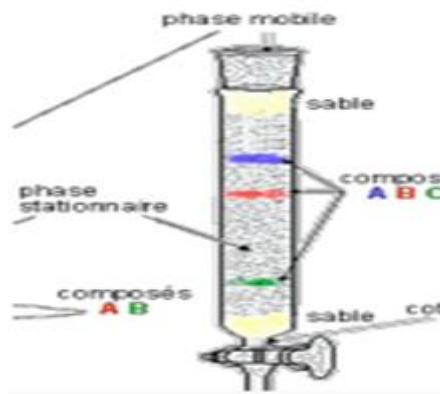
#### A. La chromatographie « Classique » .

C'est un appareillage simple constitué de :

- Tube en verre avec plaque en verre fritté à la base ou de tampon de coton
- Les substances descendent le long de **la colonne** selon affinité
- Recueil de l'éluat par petites fractions (fig.2).

#### Mais :

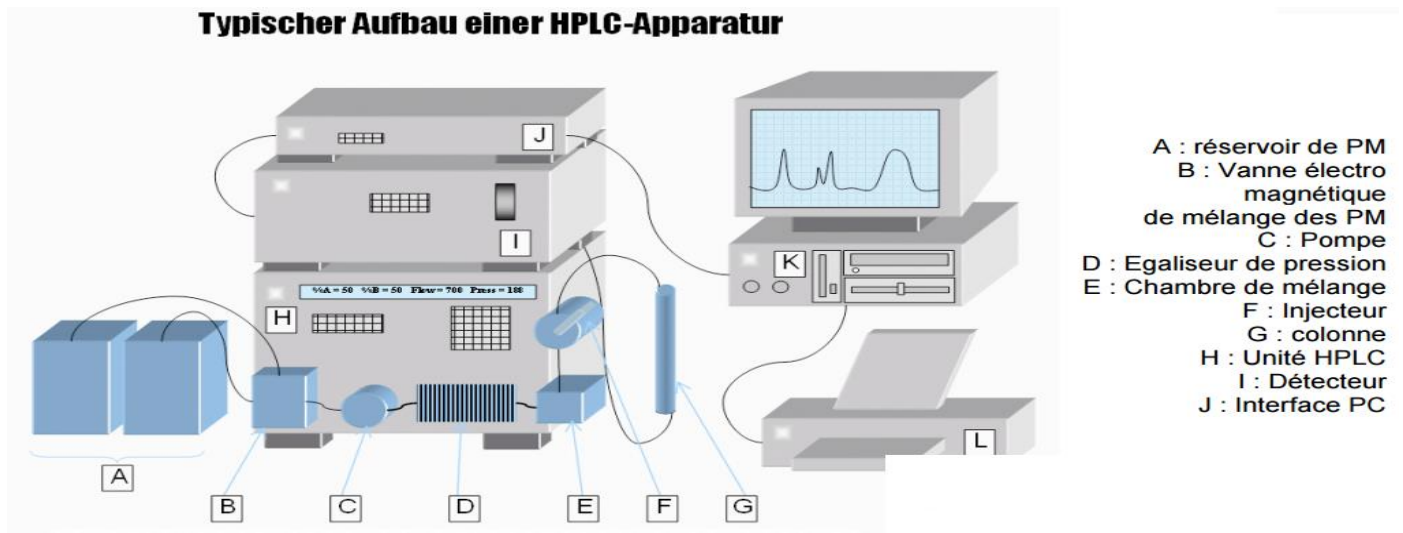
- le procédé est peu sensible et long
- Peu utilisé



**Figure 2 : La chromatographie « Classique »**

#### B. La chromatographie haute performance (HPLC) .

- Donne une meilleure efficacité et résolution
- Très utilisé (fig.3)



**Figure 3 : La chromatographie haute performance (HPLC)**

### 3. Les différentes méthodes chromatographiques :

#### 3.1. Les deux groupes principaux : basés sur la nature de la **phase mobile** sont :

- a) La **Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)** quand la phase mobile est un **gaz**.
- b) La **Chromatographie en Phase Liquide (CPL)** quand la phase mobile est un **liquide**.

#### 3.2. Les sous-groupes : en CPG ou en CPL on pourra distinguer des sous-groupes basés sur la nature de la **phase stationnaire** :

- a) La **Chromatographie d'adsorption** sa **phase stationnaire est solide** doué de propriétés **adsorbantes** (comme dans l'expérience de Tswett).
- b) La **Chromatographie de partage** sa **phase stationnaire est liquide (non miscible à l'éluant)** fixé sur un **solide** qui sert de **support inerte**.
- c) La **Chromatographie par perméation de gel ou d'exclusion** sa **phase stationnaire est un gel** constituant un **tamis**.
- d) La **Chromatographie par échange d'ions** sa **phase stationnaire est une résine échangeuse d'ions**.

### 4. Chromatographie en phase liquide

#### 4.1. La chromatographie d'adsorption.

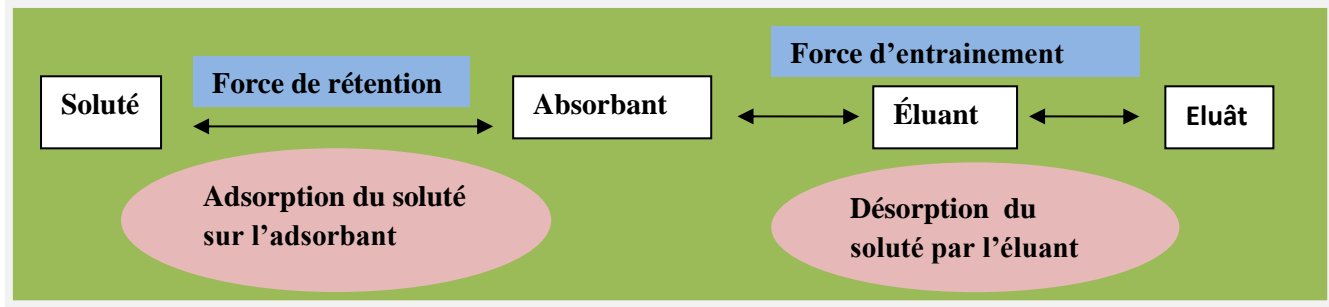
C'est la première chromatographie réalisée : séparation des pigments végétaux par absorption sur la craie (Tswett, 1905).

Elle est basée sur une séparation des solutés au moyen de 2 forces opposées:

- a. **Adsorption**, c'est la fixation du soluté sur une **surface solide (la phase stationnaire)** grâce à la **force de rétention**. On dit que le soluté est adsorbé.
- b. **Désorption (élution)** consiste à extraire le soluté adsorbé à l'aide d'un **solvant éluant (la phase mobile)** grâce à la **force d'entraînement**.

Les différents solutés sont adsorbés sur la phase stationnaire et soluble sur la phase mobile ; Il en résulte une migration différentielle des solutés en fonction de deux forces (de rétention et d'entraînement) et donc une séparation de ces solutés.

Le schéma ci-après résume les interactions entre le soluté, le solide adsorbant et l'éluant :



**Figure 4 : Schéma du principe de la chromatographie d'adsorption**

**Application :** La chromatographie d'adsorption est utilisée en :

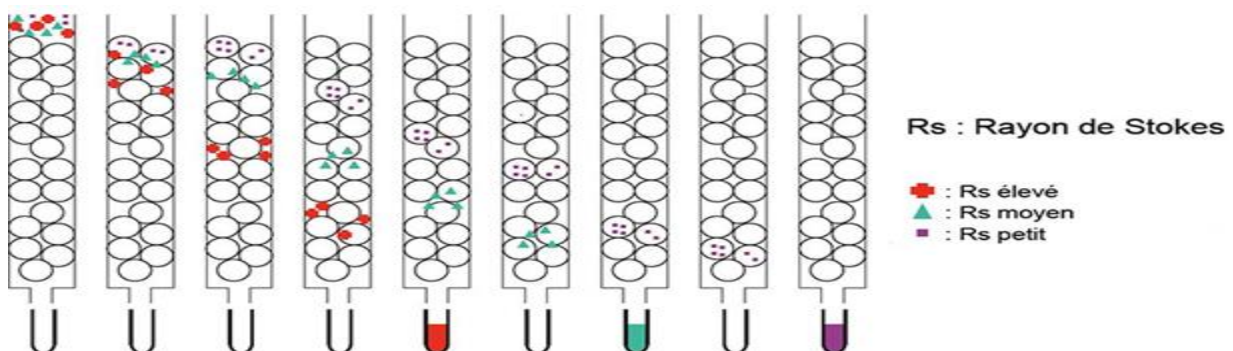
- **Biochimie** pour séparer les molécules organiques exemple : les lipides (stérols, stéroïdes, caroténoïdes), les pigments, les médicaments, les oses et les acides aminés et les protéines...
- **Immunologie** pour la technique de purification des anticorps.

#### 4. 2. La Chromatographie par perméation sur gel (chromatographie d'exclusion).

Ce type de chromatographie, également appelé tamisage moléculaire ou filtration sur gel, vise à séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire, leur taille et leur forme.

**Principes :**

Le principe consiste à faire migrer l'échantillon à analyser au milieu de billes poreuses (billes de polysaccharide). Les molécules suffisamment petites pour passer par les pores des billes seront ralenties dans leur progression, alors que les molécules trop grosses pour passer entre les billes progresseront plus rapidement (fig. 5).



**Figure 5 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie d'exclusion**

- Dans ce type de chromatographie, la **phase stationnaire** est donc un **solide** (les billes de polysaccharide)

- et la **phase mobile** est un **liquide éluant (un gel)** dont le flux entraîne les molécules du mélange.

C'est une technique très simple à mettre en œuvre, peu onéreuse, qui est très peu destructrice pour les constituants à séparer.

#### **Application :**

- **Dessalage**

-On se sert de cette technique pour éliminer des contaminants (sels, détergents, etc.) d'une préparation.  
-Du côté industriel, on peut produire du lait sans lactose, pour les personnes intolérantes à ce produit, en dessalant du lait. Évidemment, dans ce cas on utilise des colonnes de taille industrielle.

- **Détermination du poids moléculaire**

Les gels de filtration sur gel sont abondamment utilisés en biochimie pour déterminer le poids moléculaire des protéines.

### **4. 3. La chromatographie par échange d'ions**

Dans la chromatographie par échange d'ions, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la **charge ionique**. Pour cela, on utilise des résines chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations).

Dans ce cas la, la **phase stationnaire (La résine)** est de charge : positive ou négative

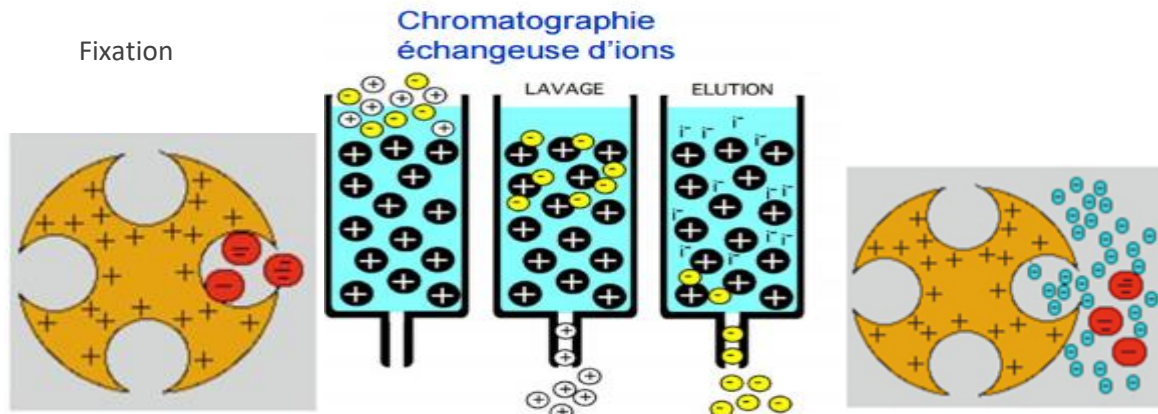
Et la **phase mobile** de charges opposées est liée par des **forces d'attractions électriques** : On parle de chromatographie échangeuse de cations ou d'anions.

Elle passe par 3 étapes :

- a. **Fixation** : Si on prend l'exemple de « la chromatographie par échange d'anions », la résine étant chargée positivement seules les molécules chargées négativement vont se fixer sur celle-ci.
- b. **Lavage** : Les molécules neutres ou chargées positivement ne vont pas s'accrocher et vont donc être éluées (non-fixé) immédiatement
- c. **L'éluion (désorption ou libération)** des molécules fixées peut être réalisée de différentes manières. On peut utiliser un tampon d'éluion contenant des ions négatifs qui vont entrer en compétition avec les molécules fixées pour les charges positives portées par la résine (fig.6).

Un autre moyen consiste à modifier la charge des molécules fixées. L'un des moyens classiques pour obtenir un tel effet est de modifier le pH. En effet, de nombreux groupes ionisables sont sensibles au pH. En baissant le pH, on favorise l'ionisation des groupements basiques (chargés positivement) et on défavorise l'ionisation des groupements acides (chargés négativement).

Bien entendu le principe est exactement le même pour « la chromatographie par échange de cations », à ceci près que les espèces moléculaires retenues étant celles qui sont positives, il faut augmenter le pH pour les décrocher.



**Figure 6 : schémas du principe de séparation de la chromatographie échangeuse d'ions**

**Principe :**

La résine (phase fixe ou stationnaire) étant chargée positivement ou négativement, les molécules de charges opposées vont se **fixer**, par des **forces d'attractions électriques** (phase mobile), les autres seront éliminées par **lavage**. Ensuite les molécules fixées vont être libérées ou **éluées** (phase mobile).

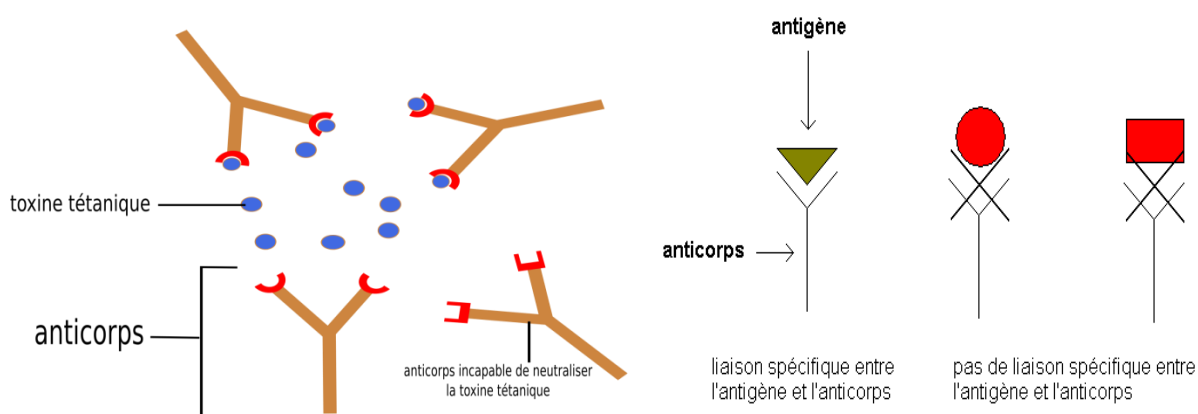
**Application :**

Cette technique est utilisée pour séparer des **molécules ionisables**, quels que soit leur domaine et leur taille : ions minéraux, acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés.

**4.4. La chromatographie d'affinité**

Dans la chromatographie d'affinité, la séparation des molécules va se faire selon leur capacité à se lier à un ligand spécifique (récepteur spécifique) fixé sur une résine. La phase stationnaire est le ligand présentant une grande affinité pour certaines molécules bioactives à purifier qui représentent la phase mobile.

Un exemple classique est l'utilisation d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement la molécule à purifier grâce à son ligand (fig.7).



**Figure 7 : Deux exemples de liaison spécifique grâce à un ligand**

-Lors du dépôt du mélange contenant la molécule à purifier, seules les molécules possédant de l'affinité pour le ligand attaché à la résine va se lier.

-Après avoir éliminé le non-fixé en lavant la résine avec le tampon de fixation, la molécule d'intérêt peut être éluée (détachée), par exemple en utilisant un tampon d'éluion de haute force ionique (chlorure de potassium ou phosphate salin) ou de pH différent (fig.8).

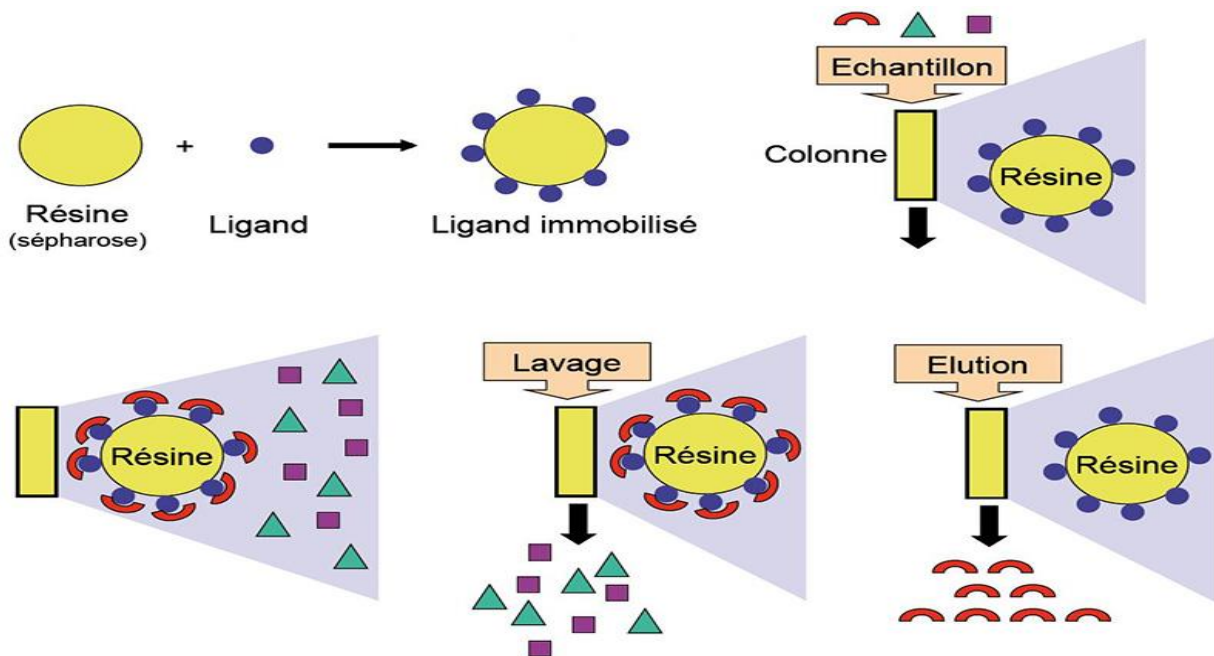


Figure 8: schéma du principe de séparation de la chromatographie d'affinité

**L'avantage** de cette technique est sa très grande sélectivité potentielle, à tel point que son utilisation peut parfois permettre une purification suffisante en une seule étape, ce qui est rarement le cas avec les autres types de chromatographie.

**L'inconvénient** de cette technique provient de la nécessité de posséder un ligand adapté, lui-même suffisamment purifié

La chromatographie d'affinité est donc très puissante par sa sélectivité importante, mais souvent plus lourde et plus onéreuse à mettre en œuvre que d'autres types de chromatographie.

#### Application :

La chromatographie d'affinité a été utilisée :

- en enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extraits enzymatiques ;
- en immunologie, pour la purification d'anticorps ;
- en biochimie, pour l'isolement des protéines et des acides nucléiques.

#### 5. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

C'est une méthode **séparative** dont les principes généraux sont les mêmes que ceux de la chromatographie en général, c'est-à-dire fondés sur la **séparation** et la **migration** différentielle des constituants du mélange à analyser.

La particularité du procédé est que la **phase mobile** est **gazeuse**, c'est-à-dire agir sur des produits **volatilisés (gaz)**, ce qui implique de maintenir une température minimale convenable et de travailler en circuit étanche aux gaz.

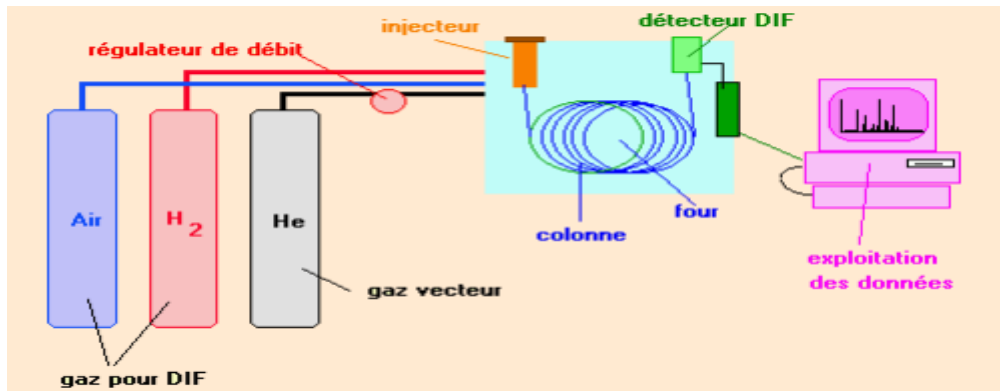
**A. Historique :** La CPG s'est développée à partir de 1952, sous l'impulsion de James et Martin. Elle a pris un essor considérable, entre 1960 et 1970, pour devenir l'une des méthodes de séparation les plus utilisées est concurrencer la chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC car :

- Elle associe rapidité et efficacité de séparation.
- Présente un grand choix de phases stationnaires, de températures, et de débit de phase mobile ainsi que sa composition (azote, argon, hélium, hydrogène, ...)

**B.Intérêt :** Elle permet d'analyser qualitativement et quantitativement des mélanges complexes de gaz ou de composés qui peuvent être volatilisés sans être décomposé.

**C.Matériel.**

Le schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID ou DIF) est rendu sur la figure suivante.



**Figure 9 :** Schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à ionisation de flamme

**D.Principe :**

Les **éléments gazeux** ou **volatils** d'un échantillon sont placés dans un injecteur. Ils vont ensuite être emportés par un **gaz porteur** (phase mobile) qui va les amener dans un **liquide** (la phase stationnaire) pour qu'ils y soient séparés. Ce liquide est présent dans une colonne, elle-même placée dans un four.

**E.Application :**

La chromatographie en phase gazeuse, Intervient dans les analyses des additifs alimentaires, notamment dans les domaines: Huile d'olive, Beurre, sucre Saindoux, Cacao, Chocolat.

Elle permet l'identification des acides gras, les constituants, recherches de falsifications, analyse des substances étrangères, discussion des résultats d'analyse.

**Tableau 1 :** Classification des techniques chromatographiques selon les phases mobiles et selon les mécanismes de séparation



| Chromatographie en phase liquide |                                                        |                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                  | type                                                   | phase stationnaire                                                                                                                                                                         |
| liquide/solide                   | adsorption                                             | solide poreux                                                                                                                                                                              |
|                                  | échange d'ions                                         | <b>solide</b> à la surface duquel se trouvent des <b>sites ioniques</b> qui permettent à <b>l'aide d'un solvant</b> approprié <b>l'échange d'ions</b> présents dans <b>la phase mobile</b> |
|                                  | d'exclusion<br>(filtration sur gel, perméation de gel) | <b>solide</b> dont la <b>dimension des pores</b> permet la <b>séparation</b> des espèces selon leur taille                                                                                 |
| liquide/liquide                  | partage phase normale                                  | <b>solide poreux</b> inerte <b>enrobé de liquide</b> (de moins en moins utilisée)                                                                                                          |
|                                  | partage phase inversée                                 | <b>solide poreux</b> sur lequel sont <b>greffées des chaînes hydrocarbonées non-polaires</b>                                                                                               |

| Chromatographie en phase gazeuse |                     |                                                                                        |
|----------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
|                                  | type                | phase stationnaire                                                                     |
| gaz/solide                       | adsorption          | <b>solide poreux</b>                                                                   |
| gaz/liquide                      | partage (partition) | dans <b>les colonnes remplies, solide poreux inerte enrobé de liquide</b>              |
|                                  |                     | dans <b>les colonnes capillaires</b> , paroi interne de la colonne qui sert de support |