

TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

MECANISME	PHASE STATIONNAIRE	PHASE MOBILE	PRINCIPE	GRADIENT (diminution du temps de rétention)
ADSORPTION	Silice vierge ou alumine (polaire)	Mélange de solvants organiques ; très faible teneur en eau.	Établissement de liaisons hydrogène par interaction de fonctions polaires du soluté avec les silanols de la phase stationnaire. Plus la molécule comporte de groupements polaires accepteurs et/ou donneurs de liaisons H, plus son temps de rétention est important.	Augmentation de la fraction volumique de solvant polaire
PARTAGE A POLARITÉ DE PHASE NORMALE	Silice vierge ; silice greffée nitrile, amine, alcool (fonction hydrophile)	Mélange de solvants organiques avec ou sans eau	Chromatographie de partage d'après le coefficient de partage entre phase mobile (liquide / plus ou moins hydrophobe) et stationnaire (solide / hydrophile). Plus la molécule est hydrophile, plus son temps de rétention est important.	Augmentation de la fraction volumique du solvant hydrophile
PARTAGE A POLARITÉ DE PHASE INVERSÉE SIMPLE	Silice greffée alkyle (C8 et C18) ou phase polymérique (fonction hydrophobe)	Mélanges hydro-organiques (eau, méthanol, acétonitrile)	Chromatographie de partage d'après le coefficient de partage entre phase mobile (liquide / plus ou moins hydrophile) et stationnaire (solide / hydrophobe). Plus la molécule est hydrophobe, plus son temps de rétention est important.	Augmentation de la fraction volumique du solvant hydrophobe
PARTAGE A POLARITÉ DE PHASE INVERSÉE + PAIRES D'IONS	Silice greffée alkyle C8 ou C18 (fonction hydrophobe)	Mélanges hydro-organiques + contre-ion avec tête polaire chargée et queue hydrophobe (ou hydrophile)	Chromatographie de partage ; prend en compte les charges opposées à celles du contre-ion portées par le soluté (échange d'ions dynamique). Le porteur de charge s'associant au contre-ion voit son temps de rétention altéré en fonction du nombre de contre-ions associés ; avec un contre-ion hydrophobe son temps de rétention est augmenté / avec un contre-ion hydrophile (plus rare) son temps de rétention est réduit. Les temps de rétention entre molécules non chargées ou qui portent le même nombre de contre-ions dépend des propriétés intrinsèques des molécules, à savoir que les plus hydrophobes sont celles dont le temps de rétention est le plus important.	A éviter car ce qui nous intéresse, c'est de séparer les molécules en fonction de leur charge ionique, pas de leurs propriétés intrinsèques.
ÉCHANGE D'IONS	Silice / Résine échangeuse d'ions cationique (acide fort ou faible) ou anionique (base forte ou faible)	Eau tamponnée à pH fixé + ion éluant (charge opposée à la résine)	Interaction électro-statique / Interaction ionique. Deux équilibres sont à considérer : 1. Équilibre d'ionisation du soluté : au pH fixé, une fraction définie de soluté est à l'état ionisé (constante d'acidité, constante de dissociation d'un sel...). On doit donc travailler à un pH optimal ou la forme majoritaire du soluté est à l'état ionisé. 2. Équilibre d'échange d'ion : la résine a une affinité particulière pour chaque espèce ionique ; il existe un équilibre entre chaque association. Ainsi l'ion éluant est remplacé à la surface de la résine par les ions à éluer, qui sont en compétition entre eux. Plus l'affinité de la résine pour l'ion est importante, plus l'équilibre d'échange est en sa faveur et donc plus son temps de rétention est important. L'affinité de la résine dépend de la nature de l'ion : en général interaction optimale avec les ions grands et polarisables.	Augmentation de la concentration en ions éluant (diminue l'affinité de la résine pour les autres ions => diminue les temps de rétention). On peut aussi faire varier le pH pour jouer sur le premier équilibre d'ionisation du soluté.
ÉCHANGE DE LIGANDS	Résine greffée avec un groupement complexant un ion métallique	Eau ou mélange hydro-organique + complexant	Formation de complexes impliquant une molécule éluée, un ion métallique et le groupement greffé sur la phase stationnaire. Plus le complexe formé avec la molécule éluée est stable par rapport à celui formé avec le complexant de la phase mobile, plus le temps de rétention est important. L'échange de ligand permet par exemple de réaliser la chromatographie d'extraits protéiques, sachant le pouvoir chélatant de l'histidine.	A éviter pour ne pas perturber l'équilibre de formation des complexes.
EXCLUSION STÉRIQUE	Matrice poreuse (gel de type dextrane, polyacrylamide ou agarose / particules sphériques poreuses) hydrophile ou hydrophobe	Bon solvant des composés analysés	On peut décrire la SEC (Size Exclusion Chromatography) et la GPC (Gel Permeation Chromatography). En SEC, la phase mobile traverse une certaine épaisseur de particules poreuses ; le volume d'élution (V_E) est en relation avec le volume interstitiel (V_i entre les particules) et le volume poreux (V_p lié à la porosité des particules). $V_E = V_i + K V_p$ avec $K \leq 1$ En GPC, la phase mobile traverse un gel formant un maillage étroit de fibres. La chromatographie d'exclusion stérique est basée sur le fait que les solutés sont élués selon leur parcours dans la matrice poreuse. Les molécules les plus volumineuses (PM élevé) ont le trajet le plus court à travers la matrice, tandis que les molécules les moins volumineuses (PM faible) ont le trajet le plus long car elles suivent le dédale de pores et d'anfractuosités duquel les grosses molécules sont exclues. Ainsi, plus une molécule a un faible PM, plus son temps de rétention est important. Plus une molécule a un haut PM, plus son temps de rétention est bref. Si le PM est trop important, il peut arriver que la molécule ne soit pas éluee correctement.	Impossible