

Chapitre 1.

Méthodes de fractionnement Macroscopiques

I. La filtration et l'ultrafiltration

1. Définition et principe : La filtration est l'opération qui consiste à séparer les particules solides qui se trouvent en suspension dans un liquide. Dans ce but la suspension à filtrer est versée sur un filtre qui laisse passer le liquide mais retient les matières solides, le liquide recueilli après filtration est appelé « filtrat », le solide déposé sur le milieu filtrant est appelé « gâteau ».

2. Applications : Les applications les plus fréquentes sont :

- L'élimination d'impuretés insolubles : on veut alors conserver le filtrat débarrassé de ces impuretés.
- L'isolement d'un solide qui se sépare par précipitation dans le milieu réactionnel ou dans un solvant de recristallisation : on veut alors conserver « le gâteau ».

3. Procédés de filtration : Deux procédés peuvent être utilisés :

- La filtration par gravité : le liquide s'écoule sous l'effet de son propre poids à travers le filtre ; un filtre en papier lisse ou plissé est placé sur un entonnoir.
- La filtration sous vide : elle nécessite un entonnoir de type « Büchner », un bouchon qui s'adapte au col de la fiole à vide, des tuyaux en caoutchouc épais et une pompe à eau permettant de créer un vide partiel qui accélère la filtration. Ici, soit on exerce une pression pour accélérer la filtration, soit on crée un vide qui fait aspirer le liquide et laisse les particules sur la membrane.

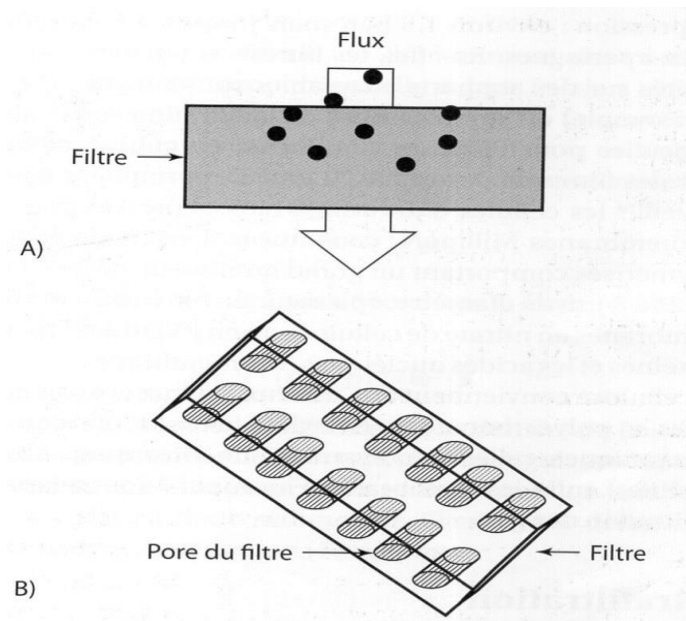
Selon le gradient de pression et la taille des pores nous avons : la microfiltration, l'ultrafiltration, la nanofiltration et l'osmose inverse.

4. Les différents types de filtres et mécanismes de la filtration:

Il existe 2 types de filtres : « les filtres en profondeur » (Fig. A) et les filtres « Ecran » (Fig.B) qui diffèrent par leur principe et leur application.

4.1. Les filtres en « Profondeur ».

Ils sont constitués de substances fibreuses « fibre de verre, de cellulose, de coton ... ou de substances agglomérées (verre fritté, sable, charbon, ...) qui créent un réseau de canaux à l'intérieur du filtre. Ces filtres bloquent les particules arrêtées par filtration dans ces réseaux. Ce **mécanisme (adsorption)** consiste à retenir à l'intérieur du réseau poreux du filtre des particules dont la taille peut être inférieure au diamètre des pores. On en distingue :



- Papiers filtres** : utilisé sur un support de type « entonnoir conique ou büchner », peut être plat ou plissé. Le type de papier est différent selon que la filtration souhaitée est rapide (exp. filtres whatman® n° 4 et 90), à vitesse moyenne (whatman n°1 et 7) ou lente (whatman® n° 5 et 6).
- Filtres en Fibres diverses ou en verre borosilicatée** : Ils ont une forme circulaire et toujours utilisés à plat sur büchner ou sur entonnoir préliminer les particules de taille inférieure à 1 μm
- Les tubes filtrants** : ils ont la forme de cylindres creux, constitués de microfibres de verre, pouvant être monté sur des embouts de connexion. La rétention est de l'ordre de 2 μm , utilisés pour clarifier rapidement de grands volumes de solutions.
- Les papiers filtres séparateurs de phases** : le papier filtre séparateur de phases whatman® IPS peut remplacer une ampoule à décanter, il s'agit d'un papier hydrophobes qui, placé sur un entonnoir en verre, retient la phase aqueuse tandis que la phase organique (huiles, solvants,...) traverse le filtre.
- Les plaques frittées** : il s'agit de plaques poreuses constitués de poudre de verre agglomérée présentée dans un entonnoir et permettant la filtration sous vide. Elles existent sous diverses dimensions de pores.

4.2. Les filtres « Ecrans » ou « f. membrane »:

- Les filtres « écrans » sont des membranes perforées par des pores calibrés et de diamètres voisins.
- Le filtre retient toutes les particules dont le diamètre est supérieur au diamètre des pores par **mécanisme de criblage ou tamisage**.
- Parmi ces membranes on peut citer :

- Les membranes millipores constitués d'ester de cellulose polymérisé avec des pores (0.025 à 8 μm) de diamètre, épaisseur du filtre (0.15 mm).
- Les membranes en nitrate de cellulose ou en PVDF adsorbants les protéines et les acides nucléiques.
- Les membranes en acétate de cellulose : conviennent aux milieux aqueux et alcooliques.
- Les m. en polycarbonate ou en nylon : aux solutions aqueuses et organiques.
- Les m. en polyamide : aux solvants et sol alcalines.
- Les m. Fluoropor® : adaptés à la filtration des gaz.

5. L'ultrafiltration :

- Elle permet la séparation des substances selon leur taille moléculaire donc approximativement selon leur masse moléculaire, les membranes jouent le rôle des filtres écran au niveau moléculaire.
- On définit les membranes d'ultrafiltration par leur seuil de coupure exprimé en Mr (Masse moléculaire Relative) situé entre 1-1000 KDa.
- En particulier utilisé dans des ... d'ultrafiltration à agitation magnétique : La force permettant l'ultrafiltration est une pression exercée sur le liquide, par l'azote ou de l'air comprimé.
- Les membranes sont généralement stérilisables et réutilisables.

- Les applications de l'ultrafiltration sont multiples :

Concentration, fractionnement, dessalage des protéines, bouillants de culture et autres biomolécules, séparation des virus par des m. spéciales, etc...

II. La dialyse

1. Définition et principe

La dialyse est une technique qui permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane semi-perméable appelée « membrane de dialyse ». Elle concerne autant les macromolécules (protéines, ADN, anticorps, polymères synthétique) que les molécules biologiques plus petites comme les oligo-nucléotides et les peptides.

- Les molécules de grande taille restent dans le boudin de dialyse.
- Les petites molécules contenues dans le boudin sortent du boudin vers le liquide de contre dialyse.

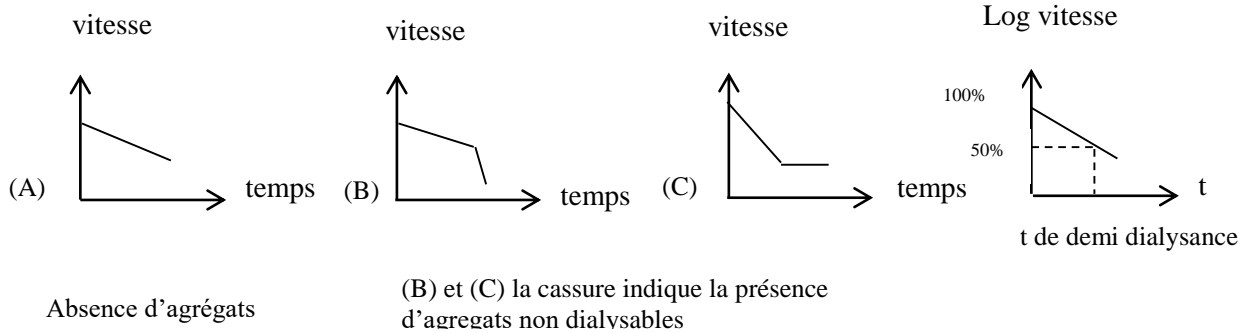
2. Les membranes utilisées dans la dialyse :

On utilise plus les membranes en « collodion », mais actuellement les m. en cellulose modifiée de type « Visking® ou Spectra/por®, transparent ou opaques, rigides ou souples. Elles représentent toutes dans de large gamme de dimensions et de seuil de coupure ; représentant la taille maximale des molécules qui peuvent passer la membrane semi-perméable, soit entre 1000 et 60000 Da selon la porosité de la membrane. Exp :

- Membranes en ester de cellulose (protéines).
- Membranes en PVDF (Fluorure de polyvinylidène : hydrophes et très résistant au solvant organiques, aux acides et aux bases.

3. Facteurs influençant la dialyse

- Une membrane de dialyse ne doit pas être chargée électriquement afin de diminuer les phénomènes parasites
- L'épaisseur de la membrane : plus elle est faible, plus la vitesse sera grande.
- Le rapport (surface de la membrane / volume la solution à dialyser): Pour un volume donné, la vitesse augmente avec la surface de la membrane.
- Le pH du liquide à dialyser et surtout de celui de la contre dialyse : il n'y a pas de règle précise, l'apparition de charges électriques sur les molécules peut ou non ralentir la vitesse de la dialyse.
- La température : elle amplifie l'agitation des molécules, augmentant la probabilité pour une molécule donnée de traverser la membrane.
- De nombreuses substances peuvent modifier cette vitesse :
 - L'utilisation d'une solution d'acétate l'ammonium 0,15 M au lieu de l'H₂O pour dialyser l'ACTH a un effet inhibiteur sur la dialyse par la formation d'agrégats non dialysables cela est déterminé par l'étude des courbes de vitesse de dialyse / temps.



- L'ajout de l'urée augmente la vitesse de dialyse par fragmentation de la structure spaciales des molécules ce qui augmente leur pénétration.

4. La loi de Fick : Le flux de substance de masse m (vitesse) sera : $\frac{dm}{dt} = -D \cdot S \cdot \frac{dc}{dx}$

$\frac{dc}{dx}$: gradient de concentration, s : surface de la membrane de dialyse. D : coefficient de diffusion. ($D = 10^{-2} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$).

La vitesse de dialyse est proportionnelle à la concentration de la substance à dialyser : $\frac{dc}{dt} = C_0 e^{-\varepsilon t}$

ε : Coefficient de dialyse. La vitesse décroît en fonction du temps ; la dialyse est donc une opération lente.

3. Les techniques de Dialyse

3.1. Préparation des membranes de dialyse

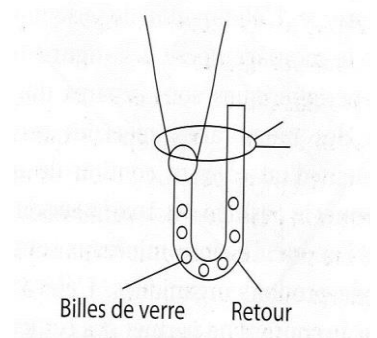
Les membranes de dialyse peuvent contenir des composés sulfurés et des métaux lourds qu'il faut préalablement éliminer comme suit :

- Trempage 1h dans un mélange à volume égal d'éthanol et d'eau.
- Puis 1h dans un sol de bicarbonate de Na 10mM. 1h dans l'EDTA.
- 2h dans l'eau distillée. Puis conservé à 4°C en présence d'agides de Na à 0,1% (agent inhibiteur de la poussée bactérienne).

3.2. Préparation des Boudins de Dialyse :

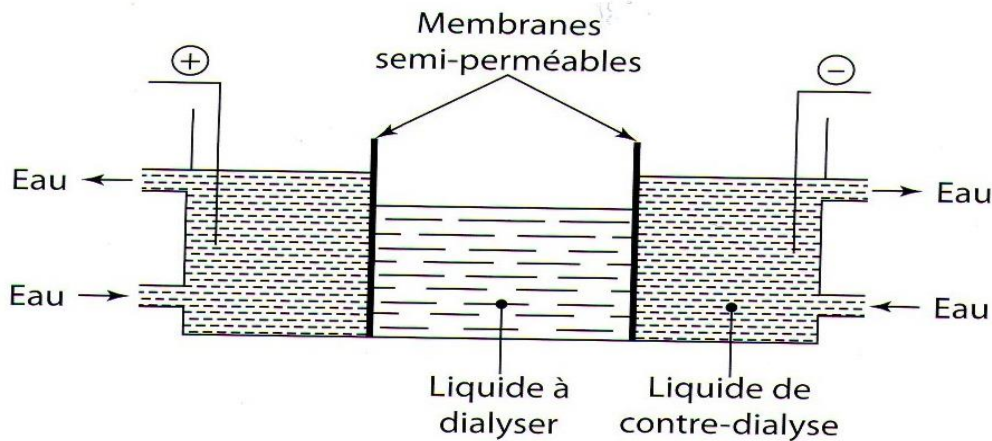
- Il faut fermer les boudins à leurs 2 extrémités.
- immerger complètement le boudin dans le liquide de contre dialyse en plaçant des billes de verre dans le retour du boudin.
- assurer une agitation convenable du liquide de contre dialyse afin d'éviter la formation de gradient de concentration des substances diffusibles.
- renouveler fréquemment le liquide de contre dialyse afin d'accélérer la dialyse.

Fermeture des boudins de dialyse

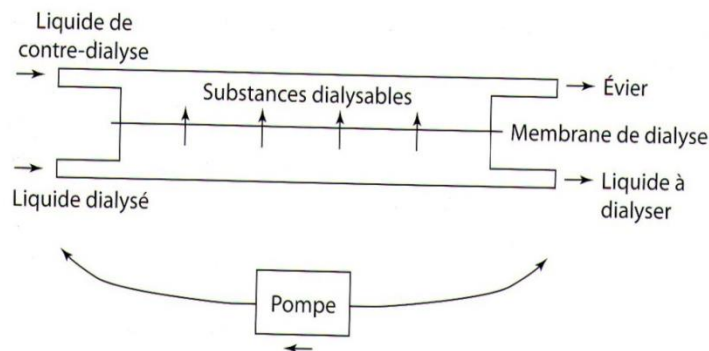


4. Electrodialyse : - l'élimination de sels minéraux peut être réalisée par électrodialyse. 2 compartiments périphériques sont séparés du compartiment central par des membranes semi perméables.

- l'établissement d'un courant continu de quelques milliampères permet le passage des anions vers la cathode et des cations vers l'anode les ions minéraux sont ainsi éliminés sans perte de produit organique.



5. Dialyse sur grand volume (dialyse en flux continu) : Le liquide à dialyser passe au contact du liquide de contre-dialyse dont il n'est séparé que par une membrane semi-perméable la dialyse s'effectue sur une grande surface. Le liquide de contre dialyse est renouvelée en permanence alors que le liquide à dialyser repasse sans cesse dans le système grâce à une pompe péristaltique; c'est le principe utilisé en dialyse médicale, rénale en particulier.



6. Applications de la Dialyse: Elles sont multiples :

- Dessaler les échantillons par dialyse simple extensive ou par électrodialyse.
- Equilibrer une solution protéique avec un tampon qui modifie le pH.
- Eliminer les produits diffusibles contenues dans une solution protéique $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou urée (par exp).
- Inversement, apporter dans une solution protéique une substance diffusible placée dans un Bourdin de dialyse.
- Concentrer une solution protéique en plaçant le boudin dans du PEG en poudre : l'eau quitte le boudin pour solubiliser le PEG, qui ne pénètre pas dans la solution protéique.

III. Centrifugation et Ultracentrifugation

1. Définition : La centrifugation (sédimentation) est une technique qui permet de séparer les constituants d'un mélange sur la base de leurs densités dans solvant.

→ Les particules dans un solvant subissent l'action de 2 forces opposées: \vec{P} : la pesanteur et \vec{F} qui s'y oppose et due à la viscosité du milieu.

→ Si la particule a une densité supérieure que celle du solvant, c'est la sédimentation (sous l'effet de la pesanteur seulement).

→ Si la densité de la substance est plus faible que celle du solvant, la sédimentation sera gérée par l'agitation thermique ; il faut donc accélérer ce phénomène en remplaçant l'accélération de la pesanteur par accélération centrifuge développée par un rotor tournant avec une vitesse très grande (10 000 – 100 000 tr/ min) \Rightarrow l'opération est dite centrifugation.

2. Principe et calculs

2.1. Sédimentation

Considérant une particule de masse m assimilée à une sphère de rayon « r » dispersée dans un liquide de coefficient de viscosité μ :

- La force de frottement F est donnée par la loi de Stokes :

$$F = 6\pi \mu r V$$

A : force de la pesanteur.

P : force de la viscosité.

V : vitesse de sédimentation.

- Il y a sédimentation lorsque: $P > A + F \Rightarrow P - A - F = 0 \Rightarrow P - A = F \Rightarrow P - A = 6\pi \mu r V$

$$V = \frac{P - A}{6\pi \mu r} = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3 (\rho_p - \rho_l) g}{6\pi \mu r}$$

ρ_p : Masse volumique la particule et ρ_l : Masse volumique du liquide

Noter également l'équation suivante : (voir TD1) $V_s = \frac{2}{9} \frac{r^2 g}{\mu} \Delta \rho (1-d)$

2.2. L'accélération par centrifuge

Quand on remplace la pesanteur p par l'accélération centrifuge γ : $F = m \cdot \gamma = m \cdot \omega^2 \cdot x$

x : distance qui sépare l'axe du rotor du fond du tube de centrifugation.

ω : est la vitesse de rotation angulaire du rotor $\omega = 2\pi n/60$

γ : accélération centrifuge. F : Force centrifuge

On dit qu'on fait une centrifugation à y rpm avec le rotor z qui se caractérise avec son rayon équivalent de x dans la formule.

Pour l'expression de l'accélération centrifuge en Nombre de g, Il suffit de diviser l'accélération centrifuge γ par 9.81.

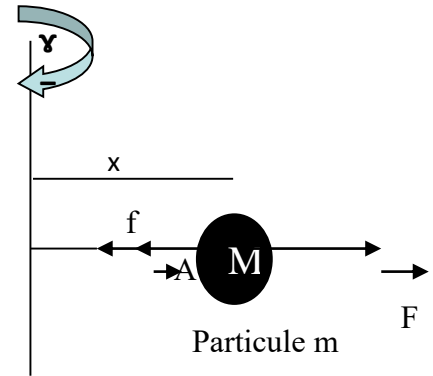
$$Ng = \frac{\gamma}{9.81} = \frac{w^2 x}{9.81} = w^2 \cdot \frac{x}{9.81} = \left(\frac{2\pi n}{60}\right)^2 \cdot \frac{x}{9.81}$$

- $F = m \gamma = mw^2x$ force centrifuge
- $f = 6\pi r\mu V$ f. de frottement ou de friction
- $A = m' w^2x$ Poussée d'Archimède

La particule sédimente lorsque :

$F > A + f$ donc $F - A - f = 0$ donc

$$F - A = f = 6\pi r\mu V \Rightarrow V = \frac{F - A}{6\pi r\mu}$$



$$V = \frac{mw^2x - m'w^2x}{6\pi r\mu} = \frac{(m - m')w^2x}{6\pi r\mu} = \frac{2r^2(\mathcal{J}_p - \mathcal{J}_e)w^2x}{9\mu}$$

m : masse de la particule. m' : masse du liquide. r : rayon de la particule. w : vitesse angulaire.

\mathcal{J}_p : masse volumique (particule). \mathcal{J}_e : masse volumique du liquide.

Ici, la sédimentation dépend de la force motrice $(F - A)$ qui dépend elle-même de la distance de l'axe de rotation.

3. Appareillages :

3.1. Selon le volume du matériel à centrifuger, l'accélération requise et la T° du travail, il existe plusieurs types:

- Les centrifugeuses de table : permettant d'atteindre des vitesses assez basses (1000- 2000)g.
- Les micro-centrifugeuses: conçues pour les micro-volumes. Se réalisant dans des eppendorf. Les accélérations peuvent atteindre (12000- 15000)g.
- Les centrifugeuses au sol: accélérations jusqu'à 20 000 g (30 000 tr/min) et sont réfrigérées.
- l'ultra centrifugeuse: sont des appareils plus perfectionnés permettant d'obtenir des accélérations très élevées (500 000g).

3.2. Selon la position du rotor:

a. centrifugeuse horizontales: les tubes sont placés dans des pots métalliques qui lorsque l'appareil est à l'arrêt, son position est verticale. Lorsque l'appareil est mis en marche, les pots se placent à l'horizontale.

b. les centrifugeuses obliques: Ils sont faits de blocs de métal dans lesquelles sont creusés des puits servant des logements aux tubes de centrifugation. Ces tubes sont inclinés avec un certain angle par rapport à l'horizontale (de 15 à 35° selon les modèles), le rayon de ces rotors étant relativement court, les particules sédimentent le long des parois des tubes et s'accumulent sur les côtés du fond des tubes.

4. l'ultracentrifugation:

Elle permet d'obtenir des accélérations élevées ($\geq 100\,000g$), elles sont caractérisées par la puissance de leur moteur et l'établissement d'un vide très poussé dans la chambre de rotation nécessaire à la réfrigération et permettant d'éviter l'échauffement du rotor. Elle est introduite en 1925 par Svedberg et consiste à étudier le déplacement d'une macromolécule « M » sous l'effet du champ de l'accélération centrifuge créée par la rotation rapide du rotor.

$$M = \frac{RTV}{D(1-v\mathcal{J})w^2x} = \frac{RT}{1-\frac{\mathcal{J}0}{\mathcal{J}}} \cdot \frac{S}{D} \text{ avec } S = \frac{V}{w^2x}$$

R: constante des gaz parfaits. V: vitesse de sédimentation. v : volume spécifique de la substance. \mathcal{J} : Masse volumique du solvant. W: vitesse angulaire. T: la température. D: densité du solvant. S: coefficient de sédimentations.

Chaque molécule possède un coefficient de sédimentations S «Svedberg» qui est généralement compris entre 0 et 200 ce coefficient plus il est étalé, plus la séparation sera bonne.

$$1 \text{ unité de Svedberg «S»} = 10^{-13} \text{ secondes.}$$

5. Ultracentrifugation préparative: elle a pour but l'obtention de préparations purifiées des particules présentes dans un milieu liquide elle peut être différentielle ou en gradient.

5.1. Ultracentrifugation différentielle: après centrifugation on obtient habituellement 2 phases; un culot contenant les particules sédimentées et un surnageant où se trouvent d'autres particules qu'on peut les sédimenter par une autre centrifugation,... etc. en utilisant une vitesse plus élevée.

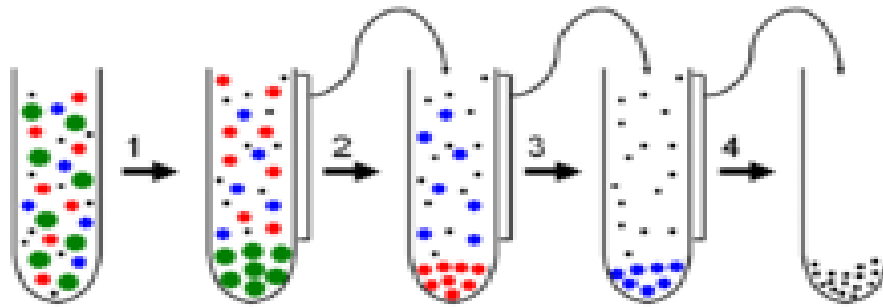
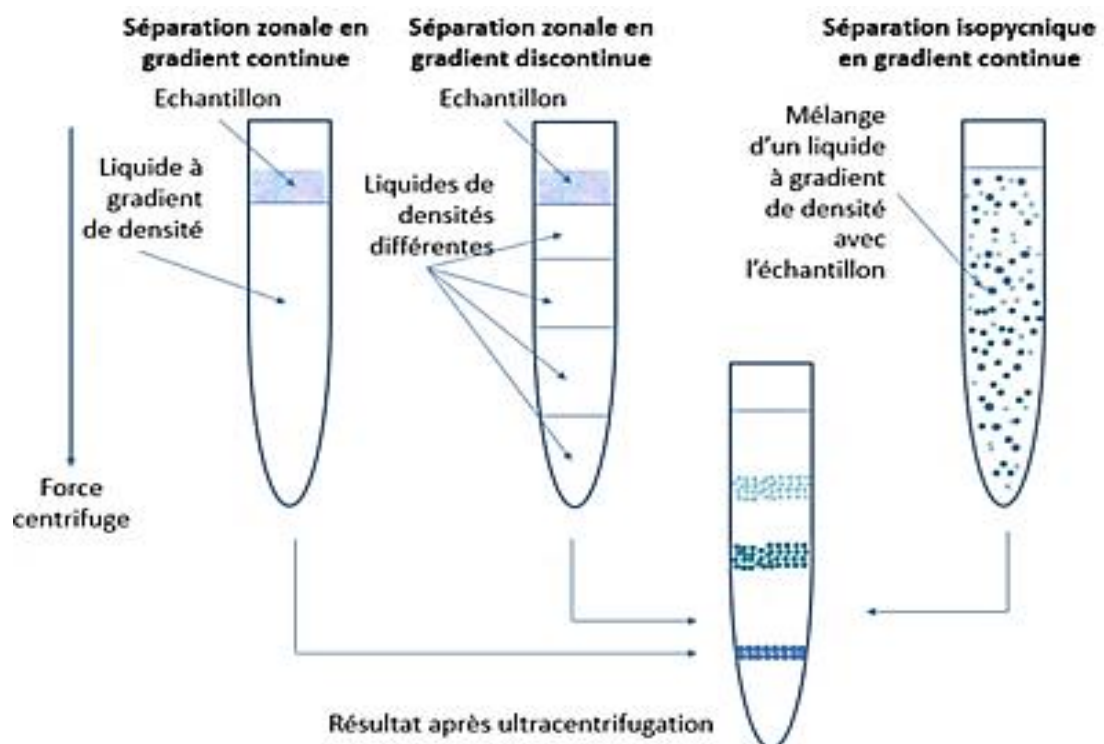
5.2. Ultracentrifugation en gradient de densité: Il est possible d'améliorer la séparation des particules en effectuant les centrifugations selon leur constante de sédimentation (Séparation zonale en gradient) ou selon la densité relative des particules par rapport au solvant (Séparation isopycnique en gradient continu).

6. Conditions et mesures de l'utilisation d'une centrifugeuse :

- Equilibrage des poids au niveau des pots métalliques
- Il faut verrouiller le couvercle pour éviter la pénétration de l'air.
- Il faut régler la température, le temps et la vitesse de la centrifugation.
- Il faut s'assurer de l'arrêt total de la machine qui se fera de façon progressive afin d'éviter de remettre en suspension les substances que l'on veut sédimenter.

7- Applications de la centrifugation : Elle est appliquée à :

- La séparation de deux phases non miscibles.
- Le fractionnement sub-cellulaire (ribosomes, mitochondrie, noyaux,...).
- Séparation des particules selon leurs tailles ou leurs densités. La mesure de la constante de sédimentation « S », de la masse moléculaire et de la densité des molécules.

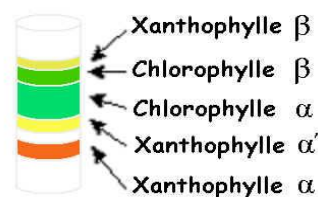
**Ultracentrifugation différentielle****Ultracentrifugation en gradient de densité**

Chapitre 2.

Techniques Chromatographiques : Aspects Généraux

1. Historique

En 1906, un botaniste russe *Mikhail Semenovitch TSWETT* purifie des pigments végétaux, comme la chlorophylle, sur une colonne de craie. Il donne alors à ce phénomène de séparation le nom de *chromatographie* (du grec *chrôma*, couleur et *graphein*, écrire) qu'il définit comme *l'enregistrement graphique des couleurs*. On assiste alors à la naissance de la chromatographie, dont la définition a fortement évolué.



- 1906 Tswett : Invention et développement de la chromatographie.
- 1941 Martin Synge : Chromatographie de séparation
- 1948 Stern et More : Séparation d'acides aminés par chromatographie d'échange ionique.
- 1952 Martin et James : mise au point de la Chromatographie en phase gazeuse CPG ;
- 1953 Weaton et Bauman : Observation du principe d'exclusion.
- 1959 Porath et Flodin : Mise au point de chromatographie de perméation sur gel.
- 1965 More : Mise au point de la chromatographes à phase liquide haute pression HPLC.
- En 1979, première séparation chirale par HPLC.

2. Définitions et principes

Chromatographie: méthode physique de séparation et de quantification basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.

- Les différents composants de l'échantillon ont une *vitesse caractéristique* qui permet de les séparer, voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement dépendante de la nature de la phase mobile et de la phase stationnaire.
- Pour un système chromatographique donné, le **coefficient de distribution K** (ou coefficient de partage) est défini par:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Cs : concentration du soluté dans la phase stationnaire, Cm : concentration du soluté dans la phase mobile.

Phase stationnaire : est une phase fixe qui reste en place soit dans une colonne (HPLC) soit sur une surface plane (CCM). La phase fixe peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitée, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes.

La phase fixe peut aussi être constituée par un liquide imprégnant un support solide (chromatographie sur papier) ou encore par une chaîne carbonée fixée sur un support (phase greffée) cas de (chromatographie en phase gazeuse).

Phase mobile : phase qui se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant les analytes. La phase mobile est:

- soit un gaz (ex: chromatographie en phase gazeuse): la phase mobile est appelée gaz vecteur ou gaz porteur.
- soit un liquide (ex: chromatographie sur papier, couche mince ou colonne): la phase mobile est appelée éluant.

Chromatogramme : graphique d'une fonction de la concentration en analyte en fonction du temps (ou du volume) d'élution.

L'élution : est un processus au cours duquel les analytes sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile.

Cette technique d'analyse chimique peut être couplée à un détecteur en vue d'une analyse *qualitative* (temps de rétention d'un composé) ou *quantitative* (surface du pic chromatographique) du milieu.

La **chromatographie analytique** est utilisée pour identifier ou doser les composés chimiques d'un mélange et apprécier leur concentration.

La **chromatographie préparative** est utilisée pour *purifier assez de produit* pour d'autres utilisations. Son but est d'obtenir de la substance; c'est pourquoi, à toute échelle, elle implique de collecter des fractions.

3. Classification :

Il existe de nombreux types de chromatographie; on peut notamment les classer selon :

3.1. Selon la nature de la phase mobile :

- **La chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.)** utilisant un gaz comme phase mobile (2 types : gaz-solide et gaz-liquide).

Chromatographie gaz/liquide (CGL). La phase mobile est un gaz et la phase stationnaire est un liquide immobilisé soit par imprégnation, soit par greffage sur un support inerte lequel peut être tout simplement la paroi de la colonne. L'échantillon doit donc être porté à l'état de vapeur. Le paramètre concerné est le **coefficient de partage**.

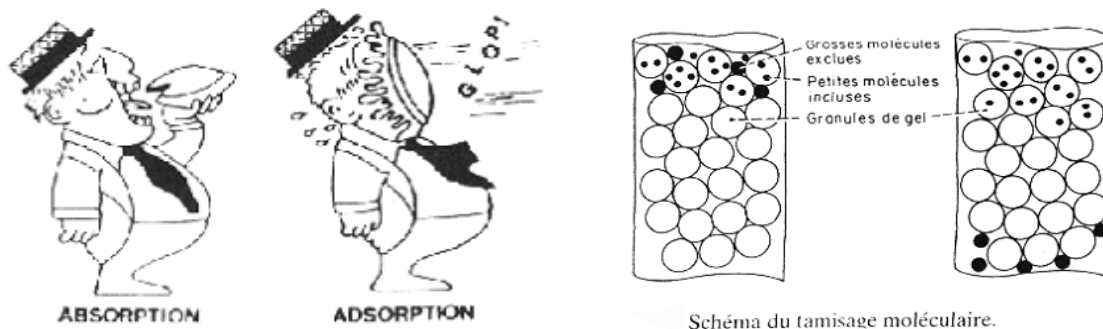
Chromatographie gaz/solide (CGS). La phase stationnaire est un solide et la phase mobile est un gaz. Ce type de CPG est très performant pour les analyses de mélanges de gaz ou de composés à bas point d'ébullition. Le paramètre concerné est **le coefficient d'adsorption**.

- **La chromatographie en phase liquide (C.L.)** où c'est un liquide qui remplit le rôle de phase mobile (schéma).

3.2. Selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation (interactions développée par la phase stationnaire, on distingue:

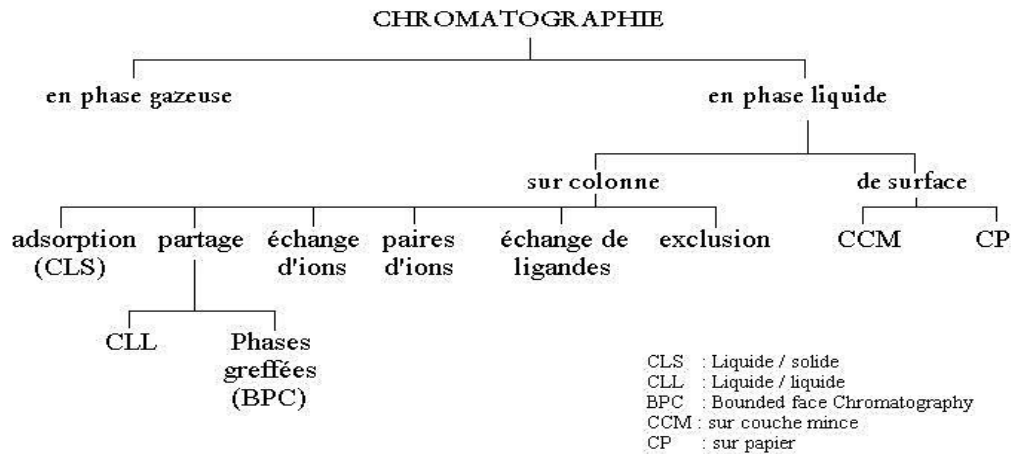
- **La chromatographie de partage** : Elle est fondée sur la **différence de solubilité** des substances à séparer dans deux fluides parfaitement miscibles. Elle est mise en pratique en chromatographie sur papier. On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents.
- **La chromatographie d'adsorption** lorsque la phase stationnaire est un solide adsorbant, la séparation étant fondée sur les **différences d'adsorption** des composants du mélange par la phase stationnaire. C'est **le principe de polarité** qui détermine les phénomènes d'adsorption. Elle est illustrée par la séparation chromatographique classique, sur colonne remplie ou sur couche mince, des composés moléculaires.
- **La chromatographie d'échanges d'ions** où la phase stationnaire est un échangeur d'ions, La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique entre les deux phases.
- **La chromatographie d'exclusion** dite également chromatographie de perméation (ou filtration) sur gel. La phase fixe est un solide poreux dont la dimension des pores est proche de celle de certaines molécules du mélange à séparer.

Un mélange de solutés de masses molaires variables traverse le gel: La séparation est réalisée par le fait que les solutés sont élués *dans l'ordre inverse des masses molaires*.



3.3. Selon le support de la phase stationnaire : On distingue :

- **la chromatographie sur colonne** (regroupant notamment HPLC et CPG): la phase stationnaire est dans une colonne et la phase mobile progresse par gravité ou différence de pression ;
- **la chromatographie plane** (qui recouvre CCM et chromatographie sur papier CP) : la phase stationnaire est sur la surface d'un support plat (CCM) ou dans une feuille de cellulose poreuse (chromatographie papier) et la phase mobile se déplace par capillarité ou par gravité.



Paramètres intervenant dans la séparation chromatographique.

Les paramètres physico-chimiques sur lesquels reposent les principes de séparation sont :

paramètres	type de chromatographie	domaine d'application
la charge électrique	échange d'ions	<ul style="list-style-type: none"> • protéines • polypeptides • acides aminés • acides nucléiques • sucres
la taille et la forme (en fait, le volume)	exclusion ou gel de filtration	<ul style="list-style-type: none"> • protéines • polypeptides • acides nucléiques • sucres • lipides
l'existence de structures particulières qui permettent d'établir des liaisons spécifiques	affinité	<ul style="list-style-type: none"> • protéines

la polarité et/ou l'hydrophobicité	polarité de phase inversée ou phase reverse	<ul style="list-style-type: none"> • protéines • polypeptides • acides aminés • acides nucléiques • sucres • acides gras
	interactions hydrophobes	<ul style="list-style-type: none"> • protéines

1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

1.1. Principe

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 de matière plastique ou d'aluminium.

- Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse qui dépend de sa polarité, déterminant d'une part, les forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, sa solubilité dans la phase mobile.
- En chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

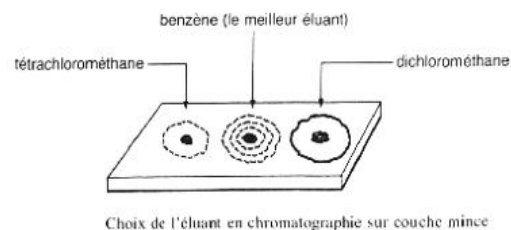
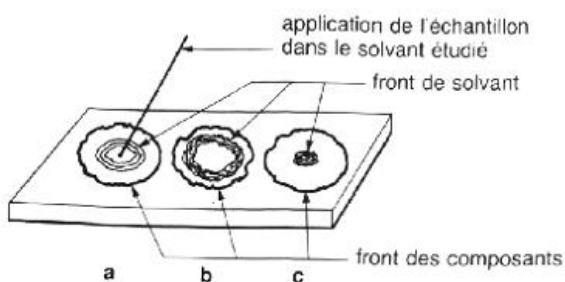
1.2. Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince:

- *la cuve chromatographique* : un récipient 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 fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant.
- *l'échantillon* : environ un microlitre (1 μ l) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser
- *l'éluant* : un solvant pur ou un mélange entraînant les composants de l'échantillon.

Adsorbants : Les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose.

Choix de l'éluant approprié:

- **Méthode 1** : consiste à préparer des solutions de l'échantillon dans différents solvants (2 à 5% en volume). A l'aide d'une micropipette, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée d'environ 1 cm. *Le meilleur éluant est celui qui, lorsqu'il a terminé sa migration, a entraîné le soluté à une distance d'environ la moitié de celle qu'il a parcourue.*
- **Méthode 2** : consiste à déposer une solution des substances à analyser en plusieurs points, séparés d'environ 2 cm. Après séchage, on applique au centre de chaque point une micropipette remplie de solvant; *Après diffusion, l'éluant qui convient sépare les solutés*



1. 3. Applications de la CCM.

- Elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique.
- Suivre la progression d'une réaction chimique : indique le nombre de composants d'un mélange,
- Rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne.

1.4. Etape d'une séparation par CCM

- Saturation de la cuve

On place souvent du papier filtre contre les parois de la cuve pour saturer plus rapidement la cuve en vapeurs d'éluant et éviter les effets de bords.

- Dépôt de l'échantillon:

L'échantillon mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil est déposée (à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire) en un point de la plaque situé à environ 1 cm de la partie inférieure : le diamètre de la tache ne devrait pas dépasser 3 mm.

Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application.

On vérifie l'identité des composants présumés d'un échantillon, en procédant à un dépôt solutions témoins

- Développement de la plaque :

La plaque est placée en position verticale dans une cuve et le solvant qui en recouvre le fond monte par capillarité. Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve; Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée.

Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir.

- Révélation : L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes :

- directement si les substances sont colorées.
- à l'aide de révélateurs si elles sont incolores afin de les transformer en taches colorées; les acides aminés par la ninhydrine qui donne avec la plupart une couleur bleu-violet, les acides organiques par des indicateurs colorés, les sucres par le réactif de Molisch qui utilise le pouvoir réducteur des sucres.
- les produits fluorescents, on peut les identifier sous une lampe ultraviolette. Il faut noter les positions des taches colorées juste à la fin de la chromatographie en les cerclant.

- **Calcul de Rf (retarding factor ou rapport frontal) :**

$$R = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{x}{x_0}$$

Pour un couple éluant et support déterminé, Rf est une caractéristique de chaque soluté à la température de l'expérience.

CCM bi-dimensionnelle : s'effectue en deux étapes entre lesquelles on change de solvant et on tourne le papier de 90°. Les interactions développées par le nouveau solvant seront différentes, ce qui modifiera la séparation dans cette deuxième dimension et permettra une meilleure séparation des mélanges complexes de substances similaires.

PARAMÈTRES DE SÉPARATION ET DE RÉTENTION

Chaque composé est défini par son *Rf*, (abréviation de « *retardation factor* »), qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant :

$$R = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{x}{x_0}$$

Efficacité N: On définit l'efficacité de la plaque pour un composé dont la distance de migration est *x* et le diamètre du spot *w* et *H* (HEPT) :

$$N = 16 \frac{x^2}{w^2}$$

$$H = \frac{x}{N}$$

Facteur de rétention *k* d'un composé ou sélectivité entre deux composés : En admettant que le rapport des vitesses *u* et *u*₀ de migration sont les mêmes sur la plaque et la colonne (ce qui n'est qu'une approximation), on pourra relier *Rf* et *k* :

$$R_f = \frac{x}{x_0} = \frac{\bar{u}}{\bar{u}_0} = \frac{t_0}{t} = \frac{1}{k+1} \quad \text{soit} \quad k = \frac{1}{R_f} - 1$$

Résolution R:

$$R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_1 + w_2}$$

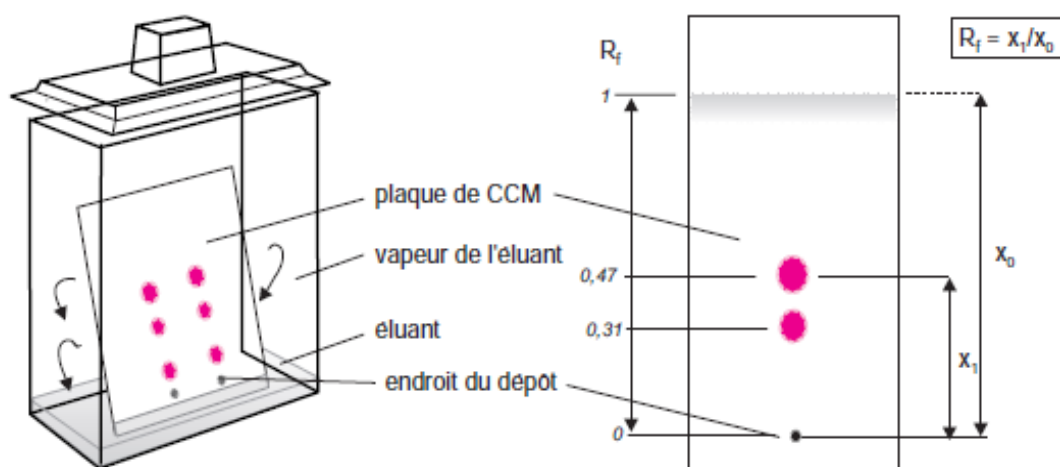


Figure 5.2 Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM. De dimensions variées en fonction de la taille des plaques (de 5×5 à 20×20 cm) elles sont en verre et munies d'un couvercle. Aspect classique d'une plaque après révélation des spots de migration, calcul du R_f .

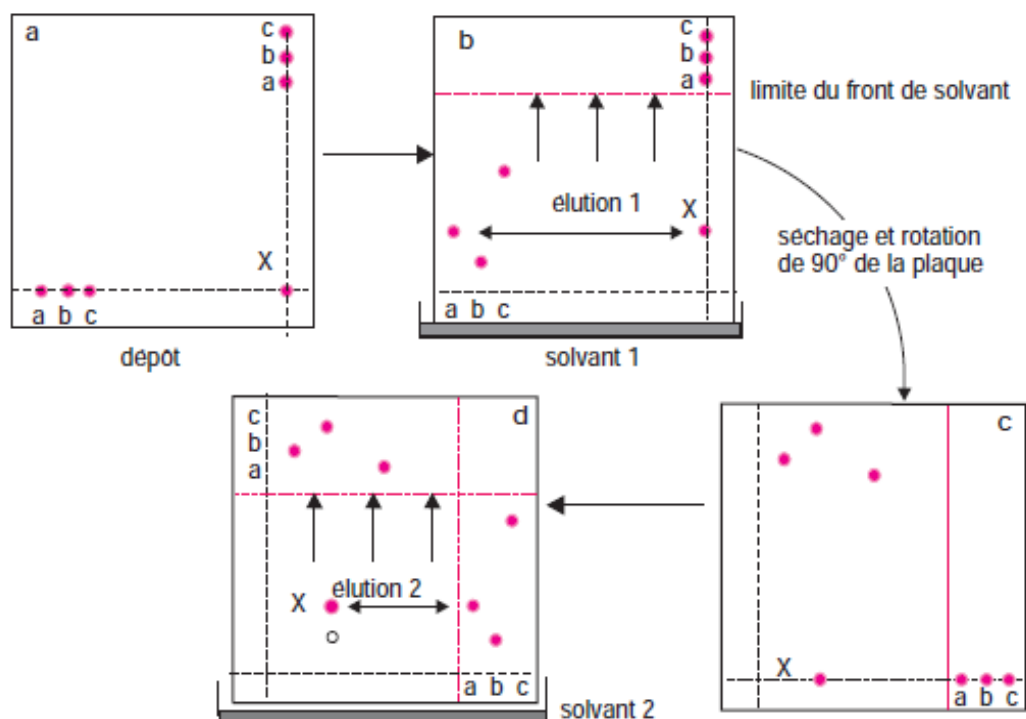


Figure 5.3 Une expérience de CCM bi-dimensionnelle.

En procédant à 2 éluions successives dans les 2 directions, on peut conclure que le composé X est un mélange d'au moins deux composés parmi lesquels le composé de référence a (même R_f dans les deux solvants), mais le second composé n'est pas b, bien qu'ayant le même R_f dans l'éluion 2.

2. Chromatographie sur papier:

2.1. Principe de la technique et applications:

La technique ressemble à celle de la CCM mais le principe repose sur des phénomènes de **partage**. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même adsorbée sur la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. Comme en chromatographie sur couche mince, l'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier et le solvant, qui se déplace par capillarité, fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité. Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement. Lorsque l'eau est un des solvants de la phase mobile, le ou les solvants organiques doivent y être assez solubles. Des produits comme l'acide éthanoïque, le propanol, le phénol ou la pyridine sont les solvants les plus fréquemment utilisés en mélange avec de l'eau pour développer un chromatogramme.

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés *très polaires*, tels les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels.

Ses plus grands inconvénients par rapport à la CCM sont:

- une durée de développement beaucoup plus longue
- une séparation généralement moins bonne.

2.2. Papier:

On peut utiliser du papier filtre ordinaire, mais il est préférable de se procurer du papier conçu pour cet usage, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques sont uniformes. Les marques principales sont Whatman, Schleicher et Schüll, Durieux, Arches. Il existe huit catégories de papier Whatman, classés selon leur épaisseur, la texture de leur surface et la vitesse avec laquelle l'eau y diffuse. Par exemple le papier Whatman n° 1 est le plus utilisé, mais si on désire une grande vitesse d'écoulement, on emploiera le n° 4; le papier n° 20 est très lent, mais il permet une meilleure séparation, donnant des taches très denses et uniformes.

2.3. Etapes de l'analyse par chromatographie sur papier: La procédure est identique à celle de la CCM. Pour identifier les endroits où se trouvent les produits ainsi séparés si:

1. les produits sont colorés, il n'y a rien de spécial à faire.
2. les produits sont fluorescents, on peut les identifier sous une lampe ultraviolette.
3. sinon, il faudra utiliser un révélateur qui réagira chimiquement avec les produits et dont le résultat sera coloré.

3. Chromatographie sur colonne (CL)

1. Description et principe:

La chromatographie sur colonne est une méthode préparative; basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase stationnaire, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne; l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression.

- Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant.
- Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille.

2. Facteurs dont dépend la séparation: Quatre facteurs interviennent:

2.1. Adsorbant:

Le plus utilisé est l'**alumine** pour les composés organiques stables et le **gel de silice** pour séparer les composés qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être traités par l'alumine. La granulométrie de l'adsorbant est habituellement comprise entre 50 et 200 μm .

2.2. Eluant:

L'éluant est en général un mélange de deux solvants. On commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les substances les moins retenues. Ensuite on fait varier la composition de l'éluant en additionnant graduellement le solvant le plus polaire. Ainsi les composés les plus polaires, ne migreront que graduellement vers le bas de la colonne.

2.3. Dimension de la colonne:

La quantité d'adsorbant est telle qu'il occupe une hauteur égale à environ 10 fois le diamètre de la colonne. Il faut également prévoir un espace de 10 cm environ au-dessus de l'adsorbant pour placer le solvant.

2.4. Vitesse d'élution: Elle doit être la plus constante possible et suffisamment lente.

3. Méthodologie :

3.1. Remplissage de la colonne:

La colonne étant verticale, le remplissage peut être réalisé selon deux méthodes au choix.

Remplissage par voie humide: On prépare dans un bécher un mélange homogénéisé de l'adsorbant et du moins polaire des solvants utilisé pour le développement pour obtenir une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement. A l'aide d'un entonnoir, on verse suffisamment de bouillie pour que l'adsorbant qui se dépose progressivement forme une couche d'environ 2 cm. On tapote les parois de la colonne pour

favoriser le tassement de l'adsorbant. On ouvre alors le robinet pour que le solvant s'écoule lentement et on poursuit l'addition de la bouillie par portions successives. Quand tout l'adsorbant est introduit, on laisse décanter jusqu'à ce que le liquide qui surnage soit limpide.

Remplissage par voie sèche: La colonne est remplie au deux tiers par le moins polaire des deux solvants et l'adsorbant en poudre est ajouté en portions successives dans la colonne à l'aide d'un entonnoir; pendant l'addition, on frappe continuellement sur les parois pour obtenir un tassement maximal. Quand la première portion forme une couche d'environ 2 cm, on ouvre le robinet pour faire couler lentement le solvant. On termine comme précédemment.

3.2. Dépôt des produits à analyser: A l'aide d'une pipette, on coule l'échantillon au sommet de la colonne de façon uniforme sur toute la surface de la colonne sans la déformer. l'échantillon est ainsi adsorbé uniformément au sommet de la colonne.

3.3. Elution: On peut alimenter la colonne en continu à l'aide d'une ampoule de coulée (vitesse de 5 à 50 gouttes à la minute) ou bien ajouter manuellement l'éluant. Dans tous les cas, la surface de l'adsorbant ne doit jamais être au contact de l'air. Les substances obtenues sont généralement d'une très grande pureté.

Grandeurs caractéristiques en analyse chromatographique sur colonne

1 .Vitesses de déplacement des solutés : sont fonction du coefficient de distribution des solutés entre les 2 phases stationnaire et mobile :

Coefficient de distribution ou de partage :
$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

C_S : concentration du soluté en phase stationnaire et C_M : concentration du soluté en phase mobile.

Temps de rétention t_R : temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition d'un pic de soluté sur le détecteur d'une colonne chromatographique.

Temps mort t_M : temps nécessaire pour qu'une espèce non retenue par la phase stationnaire traverse la colonne.

Vitesse linéaire moyenne de déplacement du soluté : $U = L/t_R$ où L est la longueur de la colonne.

Vitesse linéaire moyenne de la phase mobile :
$$\bar{u} = \frac{L}{t_M}$$

Relation entre vitesse de déplacement et le coefficient de distribution :
$$\bar{v} = \frac{\bar{u}}{1 + K \frac{V_S}{V_M}}$$

où V_S et V_M sont les volumes de solutés respectivement dans la phase stationnaire et mobile (aussi appelé *volume mort*).

Temps réduit t'_R :
$$t'_R = t_R - t_M$$

Volume réduit V'_R :
$$V'_R = V_R - V_M$$

Débit D :
$$D = \frac{V_M}{t_M} = \frac{V_R}{t_R}$$

2. Facteur de capacité k' : décrire la *vitesse de progression des solutés* dans les colonnes. C'est le rapport des quantités d'un analyte présentes à l'équilibre dans les 2 volumes de phase stationnaire et mobile adjacentes.

$$k' = \frac{t'_R}{t_M}$$

- $k' < 1$: élution trop rapide
- $1 < k' < 5$: élution optimale
- $5 < k'$: élution trop lente

3. Facteur de sélectivité α : Rapport du coefficient de distribution du soluté le plus retenu sur le coefficient de distribution du soluté le moins retenu. Le facteur de sélectivité de deux analytes permet d'estimer à quel point la colonne peut les séparer. Il est donc utilisé pour calculer le *pouvoir séparateur* d'une colonne. $\alpha > 1$ toujours.

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t'_R(B)}{t'_R(A)} = \frac{V'_B}{V'_A}$$

4. Efficacité d'une colonne N : s'évalue à partir de l'un ou l'autre de ces deux termes :

- H = hauteur équivalente à un plateau théorique
- N = nombre de plateaux théoriques

L'efficacité augmente quand N augmente ou quand H diminue à L constante. σ est la variance, ω est la largeur de la base du pic, δ la largeur du pic à mi-hauteur :

$$N = \frac{L}{H} \qquad H = \frac{\sigma^2}{L} N = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 \qquad N = 5,54 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

5. Résolution de la colonne : La résolution R_S d'une colonne est la mesure quantitative de son *aptitude à séparer deux analytes A et B* :

$$R_S = 2 \frac{t_R(B) - t_R(A)}{\omega_B + \omega_A}$$

Si $R_S > 1,5$: séparation complète de A et B ; Si $R_S \approx 1,0$: séparation incomplète de A et B ; Si $R_S < 0,75$: analytes A et B mal séparés ; *Remarque* : une résolution de 1,5 correspond à un recouvrement des pics de 1 %.

Lien entre résolution et nombre de plateaux théoriques :

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt[2]{N} (1 - \alpha) \frac{k'}{1 - k'}$$

4. CHROMATOGRAPHIE D’AFFINITE

1. Principe de base :

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 utilisés :

- *Affinité enzyme-substrat* : substrats, analogues, inhibiteurs réversibles, effecteurs allostériques,
- *Affinité ligand-récepteur* : haptènes, antigènes, anticorps.
- *Affinité antigène-anticorps* : hormones, peptides, analogues peptidiques.

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.

Une chromatographie d'affinité comporte trois étapes: le couplage du ligand sur la résine, l'adsorption de la molécule d'intérêt, et finalement la désorption de la molécule d'intérêt.

2. La phase stationnaire (le gel d'affinité) :

Elle est constituée d'un effecteur fixé par covalence à un support (carboxyméthylcellulose, Séphadex, gel de polyacrylamide) par l'intermédiaire d'un bras de fixation ("spacer" en anglais).

Exemples de dérivés de la carboxyméthylcellulose ou CM-cellulose :

- La CM-aminohexylique : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle. - O - CH₂ - CO - NH - (CH₂)₆ - NH₂ (spacer long)
- La CM-hydrazide : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle. - O - CH₂ - CO - NH - NH₂ (spacer court)
- La CM- aminohexylique succinylée : permet la fixation d'un effecteur à fonction -NH₂réactive.
- O - CH₂ - CO - NH - (CH₂)_n - NH - CO - CH₂ - CH₂ - COOH

3. Phase mobile : Elution est peut être réalisée de différentes façons :

- Tampon de pH différent de celui ayant permis la charge : changement de l'état d'ionisation de la protéine
- Tampon de force ionique différente de celle ayant permis la charge : changement de conformation de la protéine.
- Compétition avec un ligand libre.

4. MÉTHODOLOGIE ET APPAREILLAGE

➤ Couplage du ligand sur une résine à chromatographie.

Ce couplage consiste donc 1) à "activer" le gel pour qu'il puisse former un lien covalent avec le ligand; 2) mettre en présence la résine avec ce ligand; 3) déclencher la réaction de formation du lien covalent; 4) éliminer les réactifs résiduels en percolant le gel avec un tampon approprié.

- **Adsorption** : L'adsorption se fait évidemment dans des conditions physico-chimiques (pH, force ionique, etc.) où l'équilibre de la réaction tend fortement vers le maintien de l'interaction ligand-molécule d'intérêt. Toutes les molécules sans affinité pour le ligand ne se lieront évidemment pas et éluèrent rapidement. On lave ensuite la colonne avec le solvant d'adsorption pour éliminer toute molécule contaminante résiduelle.
- **Désorption** : La désorption est faite en exposant la résine contenant le complexe ligand-molécule d'intérêt à des conditions qui déstabilisent l'interaction (voir 3). On peut aussi utiliser des détergents doux (Tween, Triton, etc.) qui vont briser certaines interactions protéine-protéine.
- **Détection des effluents** : Lorsqu'on emploie une colonne il faut évidemment suivre au fur et à mesure la sortie des molécules d'intérêt à l'aide d'un détecteur (UV-VIS) : les protéines 280 nm, les acides nucléiques 260 nm.

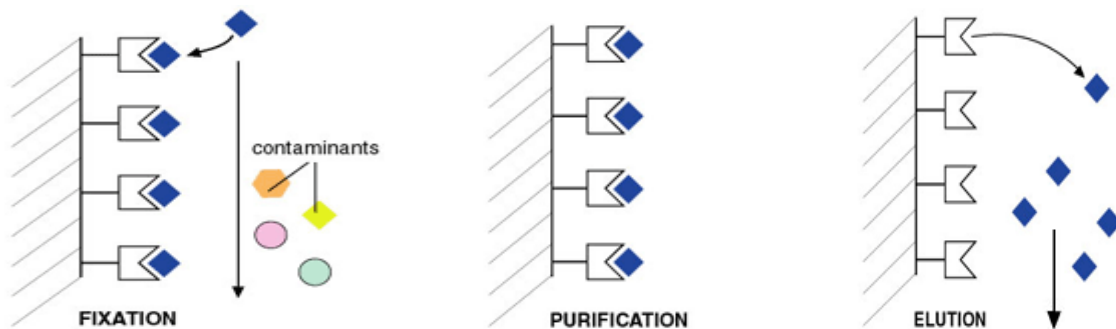


Figure 1 : Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité

6. Applications en Biochimie

- **Isolement de protéines** : De nombreux types de molécules peuvent être utilisés comme ligand.

Les anticorps sont des ligands très efficaces pour isoler leur antigène spécifique, on parle alors d'immunoaffinité. Le défi dans ces chromatographies est de détacher l'antigène sans l'endommager et, si possible, sans endommager la colonne et l'anticorps qui lui est attaché. On doit donc employer des conditions douces de détergents (Triton, Tween), de pH, de forces ioniques...

Les ligands d'une enzyme peuvent être un cofacteur non hydrolysable de cette enzyme, ou encore un analogue structural non hydrolysable du substrat.

Un *glucide* peut être un bon ligand pour une *lectine*. Inversement, une *lectine* servira de ligand pour une glycoprotéine. On peut multiplier à l'infini les possibilités.

- **Isolement des acides nucléiques** : Ainsi les ARNm polyadénylés peuvent facilement être isolés par chromatographie sur des résines d'oligo(dT)-cellulose ou de poly(U)-Sephadex.
- Elle appliquée dans la séparation et la résolution des mélanges racémiques et des isomères en chimie organique.
- Très utilisée en industrie pharmaceutique

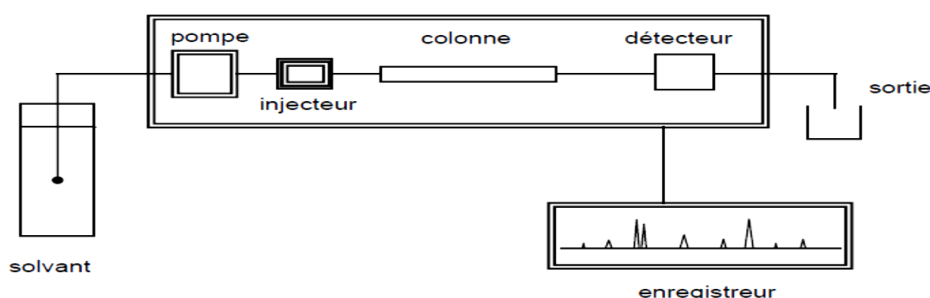
5. Chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

1. Description et principe :

Le mélange à analyser est injecté puis transporté, par la phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention", caractérise qualitativement une substance. La surface de ces pics permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

2. Appareillage et matériaux :

La chromatographie liquide à haute pression s'effectue avec un appareil, dont les principales composantes sont illustrés dans le schéma suivant :



Chromatographe HPLC

A. Phase mobile : La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne.

B. Pompe : Le rôle de la pompe en HPLC est de pousser l'éluant à travers la colonne à une pression élevée et à un débit constant. Elle doit être inerte à la corrosion des solvants utilisés, offrir un bon choix de débits. Les pompes utilisées en HPLC sont des pompes à piston.

C. Injecteur : Comme la pression dans le circuit pompe-colonne est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'échantillon à l'entrée de la colonne. Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une seringue dans un injecteur à **boucle** externe, en position **LOAD**. On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la boucle. En tournant la valve en position **INJECT**, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne.

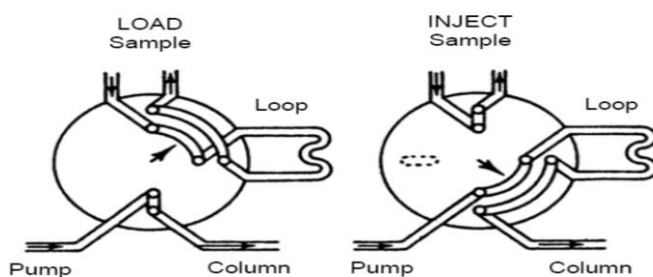


Schéma d'un injecteur à boucle externe

D. Colonnes : Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 5 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire, dont le diamètre des particules varie de 3 à 10 μm .

- **La phase normale:** La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.
- **La phase inverse :** La phase inverse est majoritairement composée de silice greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

E. Détecteurs : Le détecteur est placé à la sortie de la colonne chromatographique et doit être capable de détecter les composés qui sortent de la colonne. Les principaux détecteurs utilisés en HPLC sont

a) **Détecteur à absorbance dans l'U.V. et le visible :** Le détecteur mesure l'absorbance du liquide qui sort de la colonne, à une longueur d'onde déterminée par le filtre utilisé. Son principal inconvénient est qu'il ne détecte que les composés qui ont une absorbance appréciable à la longueur utilisée.

b) **Détecteur à indice de réfraction :** Le détecteur mesure l'indice de réfraction du liquide sortant de la colonne. C'est un détecteur universel puisque l'indice de réfraction de l'éluant est modifié lorsqu'un composé, quel qu'il soit, sort de la colonne. Il donne une réponse similaire pour les composés de la même famille (ex. : sucres), mais son principal inconvénient est sa faible sensibilité.

F. Enregistreurs : Les enregistreurs sont les mêmes que ceux utilisés en chromatographie en phase gazeuse. Les logiciels d'application, comme le Millennium, sont également utilisés en HPLC.

3. Technique expérimentale :

Les principales étapes d'une analyse en chromatographie liquide à haute pression sont :

a) **Préparation des échantillons :** Les produits doivent habituellement être soumis à une purification préliminaire pour éliminer du mélange les produits indésirables. Les extraits obtenus sont filtrés sur une membrane jetable de type Luerde 0,5 μm ou moins, avant d'être injectés.

b) **Ajustement des paramètres** (débit d'éluant et pression, nature de l'éluant, etc.) pour la séparation optimale des composés du mélange inconnu.

c) **Injection** des échantillons inconnus et des standards.

d) **Interprétation des résultats :** analyse qualitative et quantitative des chromatogrammes obtenus.

4. Applications :

L'HPLC est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyses chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces et il est possible de la coupler à un spectromètre de masse.

6. LA CHROMATOGRAPHIE ECHANGEURS D'IONS

1. Principe :

Cette technique de chromatographie est adaptée à la séparation des ions minéraux et de toutes sortes de molécules organiques *polaires*. Pour cela on utilise des colonnes contenant des phases stationnaires comportant des sites ioniques pour qu'il se crée des interactions dipolaires avec les analytes à séparer. *Plus grande est la charge portée par un soluté, plus ce dernier est retenu par la phase stationnaire*. Ce processus d'échange est lent, comparé à ceux qui régissent les autres types de chromatographie.

2. Appareillage :

Les appareils sont constitués de modules identiques à ceux déjà rencontrés en CLHP (fig). La progression et la séparation des composés de l'échantillon reposent sur des phénomènes d'échanges ioniques. On distingue deux situations:

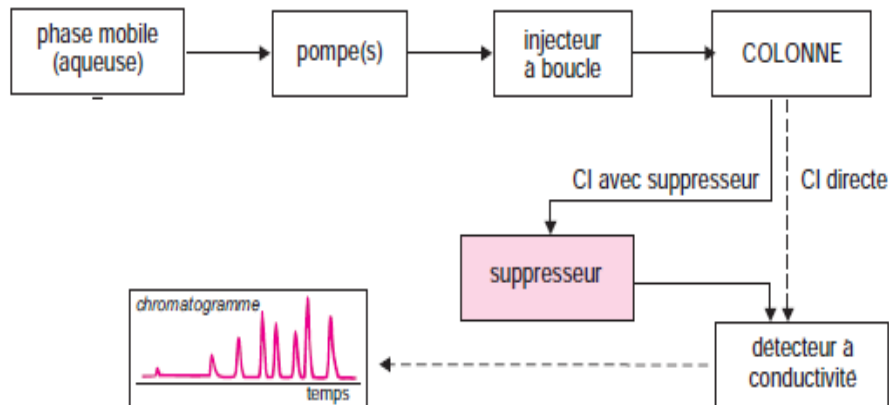


Figure. Installation de chromatographie ionique.

- **Résine cationique** : qui échange réversiblement des cations. Une résine cationique est chargée négativement, (si on cherche à séparer des espèces cationiques M^+).

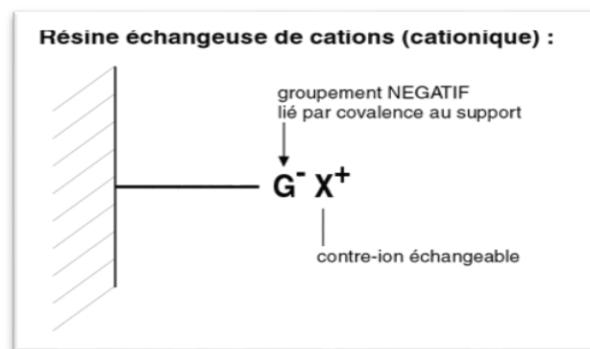
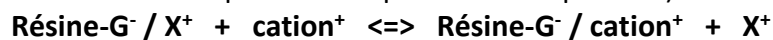


Figure: Résine échangeuse de cations (résine cationique).

- **Résines anioniques** : qui échange réversiblement des anions. Une résine anionique est chargée positivement, (si on cherche à séparer des anions A⁻).

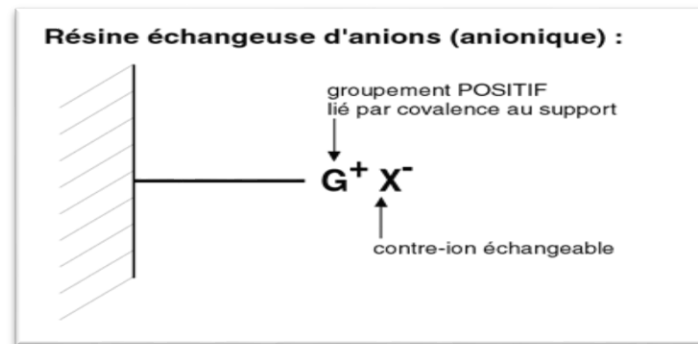
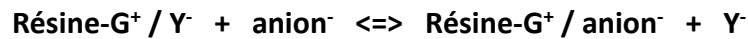


Figure: Résine échangeuse d'anions (résine anionique).

3. Méthodologie :

La chromatographie par échange d'ions se pratique le plus souvent sur colonne. On peut résumer le processus comme suit :

- Dépôt des substances sur la colonne choisis en fonction des charges des molécules et de la résine.
- Elution des molécules en augmentant de façon graduelle la force ionique du solvant d'élution, suivie par leur
- détection.
- Régénération de l'échangeur d'ions et ce par lavage extensif avec une solution de pH permettant de remettre les charge dans leurs valeur initiale.

4. Phase stationnaire :

Les phases stationnaires doivent satisfaire aux impératifs de distribution granulométrique étroite (monodisperse), de grande surface spécifique, de résistance mécanique, de bonne tenue aux pH acides ou basiques et assurer un transfert rapide des ions.

4.1. Les groupements fonctionnels des résines cationiques

- **Résines cationiques fortes** : sulfoniques (très fortement ionisées, quel que soit le pH) :

- **Résine sous forme acide :**

Résine-SO₃⁻ / H⁺
(contre-ion : H⁺)

- **Résine sous forme sodique :**

Résine-SO₃⁻ / Na⁺
(contre-ion : Na⁺)

- **Résines cationiques intermédiaire** : à groupement phospho :

- Résine-H₂PO₄⁻ / H⁺

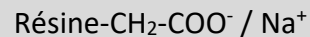
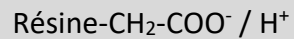
- Résine-H₂PO₄⁻ / Na⁺

- **Résines cationiques faibles** : carboxyliques (non ionisées en milieu fortement acide) :

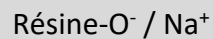
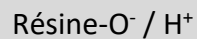
Résine-COO⁻ / H⁺

Résine-COO⁻ / Na⁺

- à groupement carboxyméthyl :



- **Résines cationiques très faibles:** phénoliques (uniquement ionisées en milieu alcalin) :



4.2. Les Groupements fonctionnels des résines anioniques :

- **Résines anioniques fortes** : résines à groupements aminés quaternaires et tertiaires.
- **Résines anioniques faibles** : résines à groupements aminés secondaires et primaires.

5. Phase mobiles

L'élution consiste à déplacer l'ion fixé par un autre, de densité de charge et de concentration plus élevée on utilise de petits ions fortement chargés : Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+ ...

Suivant le type, cationique ou anionique de la colonne, les ions de l'éluant sont apportés soit par des acides minéraux ou organiques (perchlorique, benzoïque, phthalique, méthanesulfonique...), soit par des bases (hydroxyde de potassium ou de sodium, carbonates ou bicarbonates...).

L'élution est assurée par déplacement des équilibres :

- soit par la présence d'un ion ayant plus d'affinité pour la résine, soit l'élévation des concentrations en ions H^+ ou OH^-
- soit dans le cas des échangeurs faibles, par modification du pH qui agit ainsi sur l'ionisation aussi bien des groupements échangeables de la résine que ceux des solutés.

6. Détecteurs

- Un détecteur de *conductivité*: mesure en sortie de colonne, la *conductance* de la phase mobile entre deux micro-électrodes.
- Détecteurs spectrophotométriques basés sur l'absorption ou la fluorescence dans l'UV/VIS, utilisables lorsque la phase mobile n'absorbe pas elle-même dans le domaine de mesure.

7. Applications :

Elle est adaptée à la séparation des ions minéraux et de toutes sortes de molécules organiques à la condition qu'elles soient polaires (les mono ou polysaccharides, les nucléosides et nucléotides, les acides carboxyliques les anions et cations organiques ou minéraux divers (métaux de transition, terres rares)...

7. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

1. Principe

La **chromatographie en phase gazeuse (CPG)** est, une technique qui permet de séparer les composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La séparation est basée sur le phénomène d'adsorption (CPG/gaz-solide) ou de partage (GPG/gaz-liquide).

2. Appareillage : Les appareils de chromatographie gazeuse sont principalement composés de (fig. 1):

- **Gaz porteur (ou gaz vecteur)** Il y a quatre types de gaz utilisés : hélium, hydrogène, azote et argon. Ces gaz vecteurs doivent être purs, *insolubilité* dans les liquides, inerte vis-à-vis des *solutés* et de la *phase stationnaire*, exempts d'eau, d'oxygène et d'hydrocarbures légers pour éviter toutes réactions avec les solutés et la phase stationnaire.
- **Four** : permet une programmation de température ajustable de 20 °C à 450 °C et qui est également équipé d'un système de refroidissement rapide;
- **Injecteur** : qui va permettre d'introduire et de rendre volatil l'échantillon à analyser.
- **Colonne (remplie)** : maximum 2 mètres ou et **capillaire** (de 15 à 100 mètres) : elle est placée dans un four et sépare les molécules suivant leurs affinités avec la phase stationnaire;
- **Détecteur**, qui va permettre de mesurer le signal émis par les différentes molécules et de pouvoir les identifier : *spectromètre de masse (MS)* ou la *spectroscopie infra-rouge (IR)*; détecteur électrique (TCD), détecteur à ionisation de flamme (FID), ,
- **Enregistreur** : Pour l'enregistrement du signal émis par le détecteur,
- **Système de détendeur-régulateur** pour la régulation des gaz utilisés (hélium, hydrogène, azote et air comprimé).

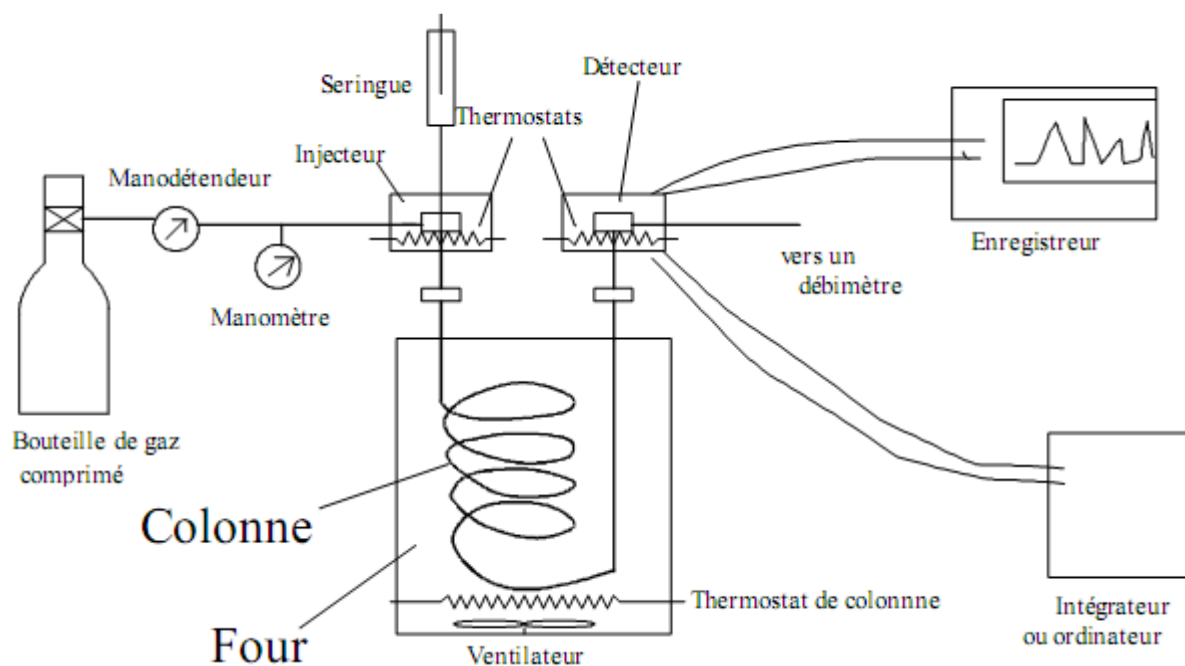


Figure. CPG

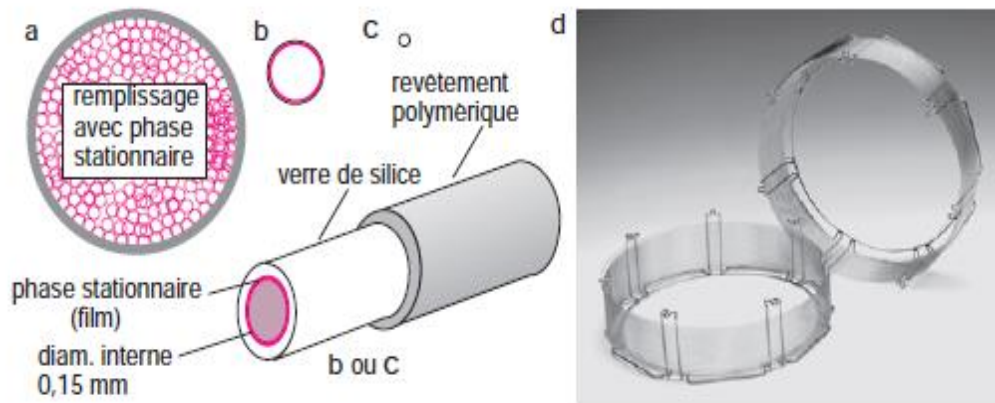


Figure. Colonnes de CPG.

a) Colonne remplie de 2 mm de diamètre ; b) colonne capillaire « 530 » de 0,53 mm ; c) colonne capillaire de 0,1 mm ; détail d'une colonne capillaire. À cette échelle, l'épaisseur de phase stationnaire serait à peine visible ; d) colonnes commerciales de 50 m de longueur

3. Fonctionnement

- L'échantillon (liquide volatil de 0.2 à 5.0 μ l) est d'abord introduit en tête de colonne par l'intermédiaire d'une microseringue qui va traverser le *septum*, pour se retrouver dans l'injecteur qui est porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon.
- Une fois rendus volatils, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le *gaz* vecteur à travers la colonne et se séparer les uns des autres en fonction de leur affinité avec la *phase stationnaire*.
- La phase stationnaire peut être un liquide non volatil (chromatographie gaz-liquide) ou un solide adsorbant (chromatographie gaz-solide). Plus le composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne (*temps de rétention*) ;
- A la sortie de la colonne, les composés rencontrent le *détecteur*. Cet élément évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz et envoie un signal électronique vers un enregistreur qui dessinera les courbes de chaque pic en fonction de leur intensité (courbe de type Gaussienne). L'ensemble des pics est appelé *chromatogramme*.

4. Injection en CPG : Dans le cas des colonnes capillaires, 3 modes d'injections peuvent se présenter:

- **injection avec division (split):**

L'échantillon est vaporisé et mélangé dans le gaz porteur, puis le mélange est divisé en deux parties. La plus petite partie arrive sur la colonne alors que la plus importante est évacuée. On l'appelle la *fuite*. Le *ratio* de la division se règle sur la machine. Ce mode d'injection permet d'injecter de petites quantités d'échantillons concentrés sans devoir les diluer au préalable. Dilution qui est parfois impossible pour certains produits (*huiles essentielles*, *produits pétroliers*...) car le solvant masquerait la détection des composés les plus volatils.

- **injection sans division (splitless) :**

L'échantillon est vaporisé et mélangé dans le gaz porteur, mais le mélange n'est pas divisé en deux parties. 5% seulement est évacué par l'ouverture de la vanne de fuite. Cette méthode est utilisée quand l'échantillon à analyser est très dilué et éventuellement très sale (contenant des résidus non-volatils). Elle permet également d'analyser les composés très volatils (plus volatils que le solvant de dilution) en les concentrant sur la tête de la colonne qui sera plus froide que l'injecteur.

- **injection dans la colonne (on-column) :**

Il n'y a pas d'étape de *vaporisation*. L'échantillon est directement mélangé au gaz vecteur et injecté à froid sur la colonne. Cette méthode nécessite une seringue et un injecteur spécifique (sans septum et sans chauffage). Les avantages sont de pouvoir injecter l'échantillon *sous forme liquide sans provoquer de vaporisation sélective* dans l'aiguille et à une température la plus basse possible (celle de la colonne) pour éviter la dégradation des *composés thermolabiles*. Par contre, des inconvénients comme l'accumulation de composés non volatils dans la colonne peuvent se présenter.

5. Applications :

- Industrie pétrolière, chimique et cosmétologique: analyse des huiles, des hydrocarbures, essences, parfums, arômes,
- Agroalimentaire : recherche et dosage des pesticides et des nitrosamines,..
- Contrôle analytique pharmaceutique : contrôle de la matière première (impuretés) et sur produit fini (teneur) et étude de la stabilité dans le temps.
- Dosage en milieux biologiques (dosages biochimiques : stéroïdes),
- Dosage en toxicologie : recherche de toxique en cas d'intoxication aiguë ; contrôle anti-dopage, dosage de drogues (opiacés, amphétamines, ..), dépistage de toxicomanie.