

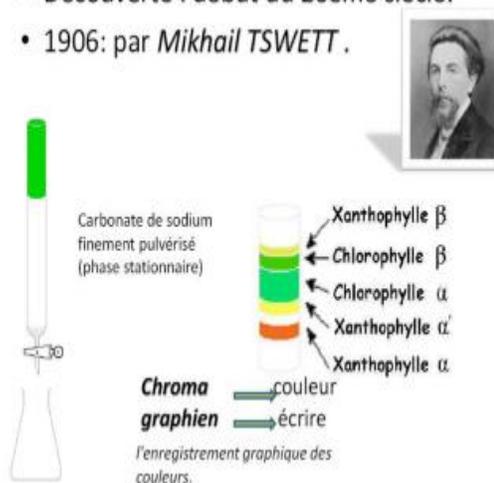
CHAPITRE II : CHROMATOGRAPHIE

1 . Définition :

La chromatographie est une méthode qui permet de séparer les constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeux. C'est une technique de séparation très puissante qui permet de travailler sur des quantités allant jusqu'au **µg**

Le terme chromatographie vient du grec « chroma = couleur » et « graphein = écrire ». a été réalisée en 1906 par le botaniste russe Mikhaïl Tswett chromatographie et consistait à séparer les pigments d'une feuille d'épinard sur une colonne en CaCO_3 . Tswett constatait : "Tout comme les rayons lumineux d'un spectre, les différentes composantes d'un mélange de colorants se déploient sur la colonne de carbonate de calcium selon une loi et peuvent être analysés qualitativement et quantitativement.

- Découverte : début du 20ème siècle.
- 1906: par *Mikhail TSWETT*.



2-Principe de la séparation :

- Le principe de la chromatographie consiste à **entraîner l'échantillon** à l'aide d'un **éluant** (gazeux ou liquide) appelé **phase mobile (PM)**, qui se déplace au contact d'une seconde **phase fixée** sur un support (colonne ou surface plane). Celle-ci, dite **stationnaire (PS)**, est insoluble dans la première.
- Chaque composé est caractérisé par un **coefficient de distribution de Nernst K** (appelé également **coefficient de partition**) défini comme suit:

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

2. Les différents types de chromatographie et leurs applications

Suivant l'état physique de la phase mobile, on distingue :

- **La chromatographie en phase gazeuse (CPG) :** la phase mobile est un gaz, dit gaz vecteur, et les solutés sont introduits sur la colonne directement s'il s'agit d'un échantillon gazeux ou après volatilisation dans la chambre d'injection chauffée s'il s'agit d'un échantillon liquide (éventuellement après dilution ou dissolution dans un solvant adéquat) ;
- **La chromatographie en phase liquide (CPL) :** la phase mobile est constituée d'un solvant pur ou le plus souvent d'un mélange plus ou moins complexe de solvants de grande pureté ; elle est introduite sur la colonne à débit constant par un système de pompage ;
- **La chromatographie en phase supercritique (CPS) :** la phase mobile est un fluide supercritique, c'est-à-dire porté au-delà des coordonnées en pression et température du point critique, point à partir duquel il n'existe plus de frontière définie entre les états liquide et gazeux.

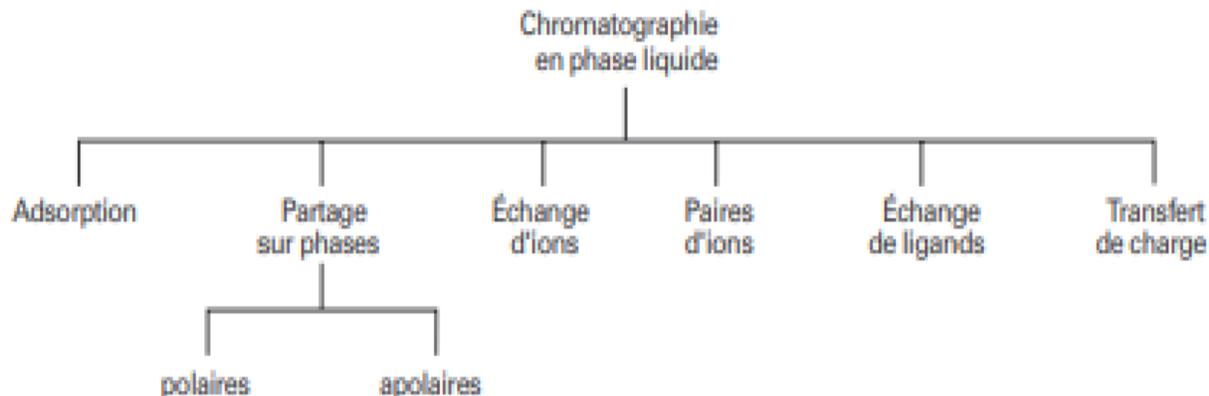
Suivant l'état physique de la phase stationnaire, on distingue :

- **La chromatographie liquide/solide (CLS)**
- **La chromatographie liquide/liquide (CLL)**
- **La chromatographie gaz/solide (CGS)**
- **La chromatographie gaz/liquide (CGL)**

Suivant le mécanisme de rétention: cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. On distingue ainsi: la chromatographie d'adsorption, de partage, d'échange d'ions, d'exclusion et la chromatographie d'affinité.

Selon la technique mise en jeu, on distingue: la chromatographie sur colonne, la chromatographie de surface (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

2.1. Chromatographie en phase liquide (CPL)



Méthodes de séparation en Chromatographie en phase liquide

2.1.1. Chromatographie de partage

➤ Chromatographie sur papier

La **chromatographie sur papier (CP)** est une chromatographie **de partage liquide liquide** qui permet de séparer et d'identifier les espèces chimiques d'un mélange. Actuellement, malgré l'apparition de la CCM et la CLHP, la CP conserve toute sa valeur pour séparer des substances très polaires. Cette méthode est basée sur leur différence d'affinité pour deux phases : La phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même, absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau.

1. Principe

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 (la technique ressemble à celle de la CCM).

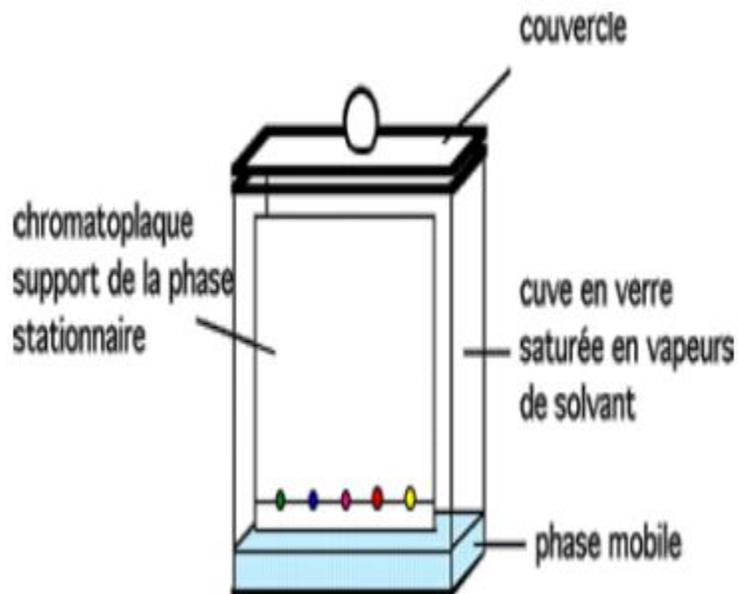
Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement. Ses plus grands inconvénients par rapport à la chromatographie sur couche mince sont : la durée de développement beaucoup plus longue et une séparation généralement moins bonne.

2. Application

La CP est employé principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels.

➤ Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est basée essentiellement sur des phénomènes **d'adsorption** et sur le principe de la **capillarité**. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve chromatographique, l'éluant monte à travers la **phase stationnaire** et entraîne les solutés à séparer en fonction de sa densité, de sa solubilité dans la **phase mobile**, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse dans l'absorbant. Le contenant sera une cuve chromatographique, à savoir un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche. La figure suivante représente les principaux éléments d'une séparation CCM.



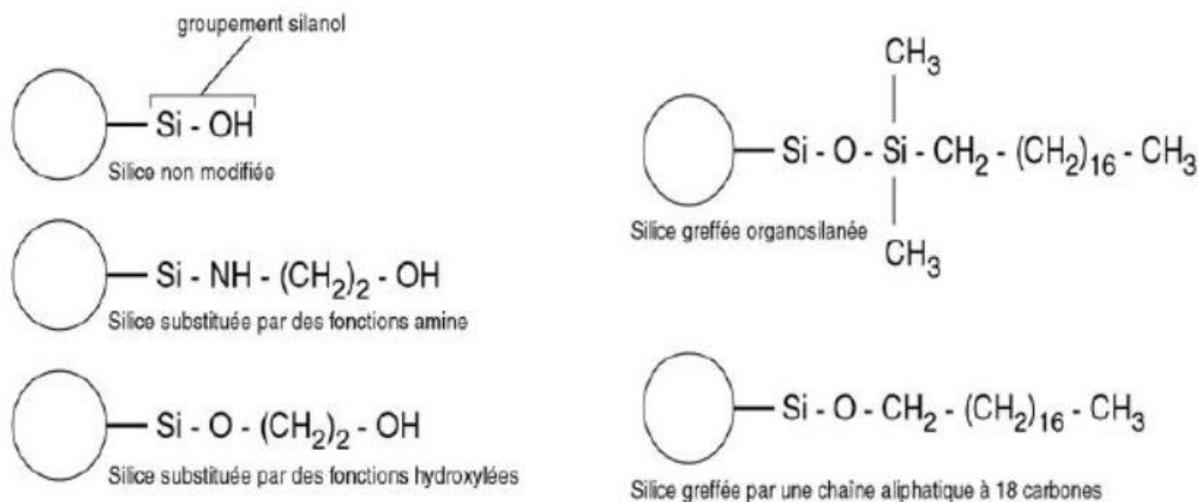
On va devoir gérer 3 éléments bien définis :

1. La phase mobile également appelée éluant: c'est un solvant (ou un mélange de solvants), qui progresse le long d'une phase dite « stationnaire », fixée sur un support, en entraînant les composants de l'échantillon. Selon le type d'analyse à réaliser, le choix de l'éluant sera variable :

- Pour des composés apolaires (les hydrocarbures et groupements fonctionnels courants) : hexane, éther de pétrole ou benzène. Hexane ou éther de pétrole, mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique.
- Pour des composés polaires : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol.

2. La phase stationnaire: c'est une couche d'environ $\frac{1}{4}$ de mm de gel de silice (un **adsorbant** parmi d'autres) qui est fixée sur une plaque de verre (ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium, voire même sur une feuille de papier), à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre), l'amidon ou un polymère organique. Après le dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont le gel de silice, l'alumine, et la cellulose.

- ❖ Les adsorbants à faible capacité d'adsorption comme l'alumine, le talc (méta silicate acide de magnésium) ou le carbonate de sodium.
- ❖ Les adsorbants forts comme le gel de silice.



Silices polaires greffées.

Silices apolaires greffées.

3. Echantillon

Il est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : les plus utilisés sont le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution (1 cm³ max.) est déposée sur la plaque, à environ 1 cm de la partie inférieure.

4. Développement de la plaque

La plaque préparée est introduite en **position verticale** dans la cuve et l'éluant qui en recouvre le fond monte par capillarité, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Lorsque

le niveau atteint par le solvant est d'environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve. On peut utiliser une **chromatographie bidimensionnelle** dans le cas où le mélange contient des solutés de polarités voisines : sur le même support, on réalise une première chromatographie à l'aide d'un système de solvants, puis une deuxième à l'aide d'un second système de solvants, dans une direction perpendiculaire à la première.

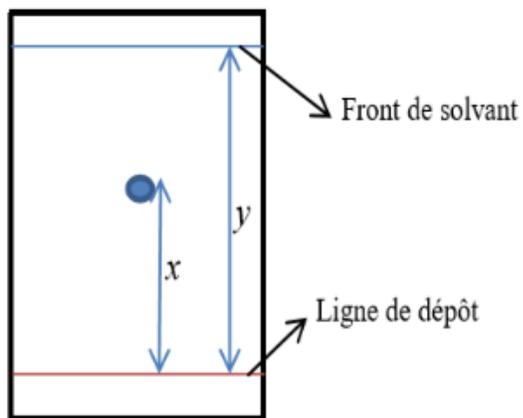
5. Révélation

Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes :

- ✚ A l'œil nu : si le produit est coloré
- ✚ Radiation UV : en exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés apparaissent sous formes de tache brillantes.
- ✚ Fluorescence : si un indicateur de fluorescence est incorporé à l'adsorbant ; la plaque entière devient fluorescente lorsqu'elle est soumise à radiation UV. Les composés sont révélés sous forme de taches sombres.
- ✚ Iode : il réagit avec un grand nombre de composé organique en formant des complexes jaunes. La révélation est réalisée en mettant la plaque, préalablement séchée en présence de quelques cristaux d'iode dans un récipient; fermé ensuite pour saturer de vapeur.

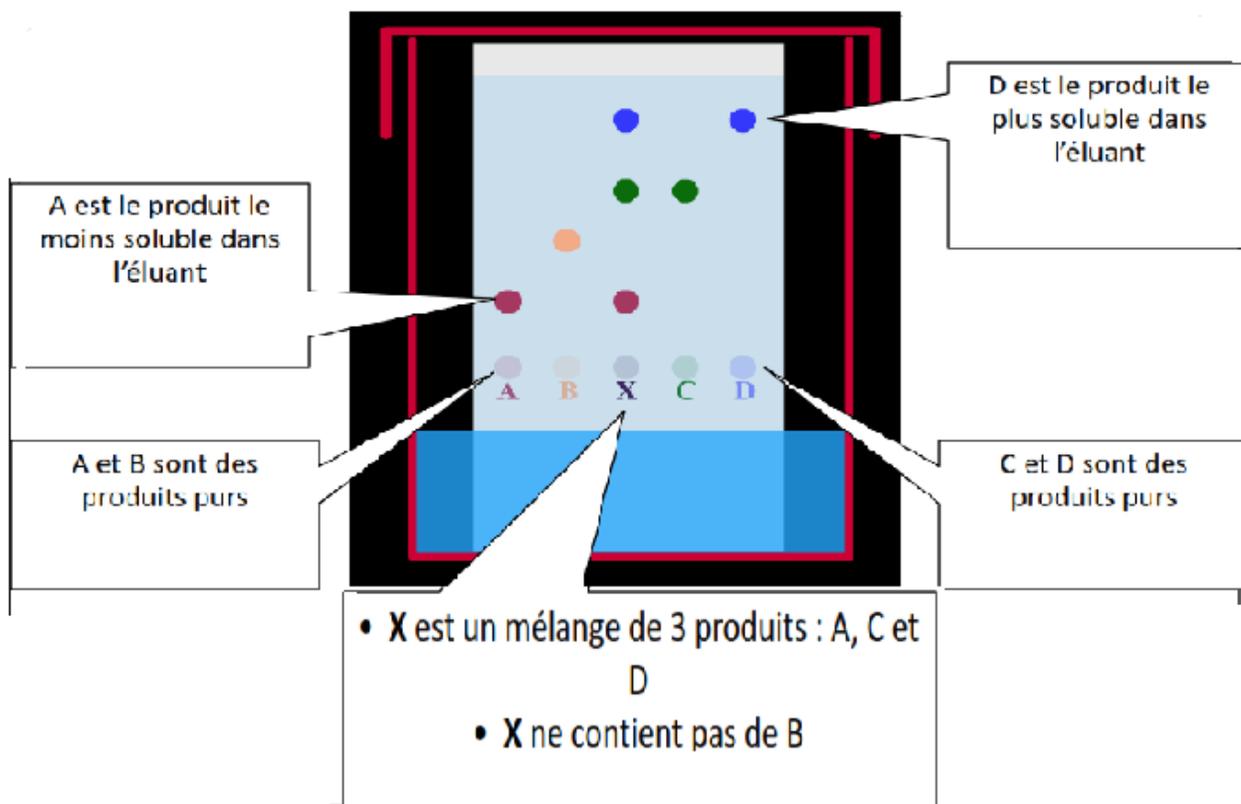
6. Paramètre du CCM

Chaque substance est caractérisée par sa mobilité appelée rapport frontal . Le rapport frontal ou rétention frontale (R_f) de chaque composé est défini par le rapport : $R_f = X / Y$ Valeur entre 0 et 1



x : distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache)

y : distance parcourue par le front de solvant



La chromatographie est donc une technique qui permet :

- ❖ Vérifier qu'une substance est pure.
- ❖ Analyser un mélange.
- ❖ Reconnaître les constituants d'un mélange par comparaison du R_f .

7. Application

La CCM présente plusieurs applications ; elle permet le contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique, le suivi de la réaction chimique ou d'un fractionnement chromatographique sur colonne et la recherche du meilleur solvant, avant d'entamer une séparation sur colonne classique. Elle permet également la purification de petites quantités de produit (jusqu'à 100 mg). La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant. Le succès de ce mode de chromatographie est dû notamment à la facilité de sa mise en œuvre et à la possibilité de son emploi dans le domaine analytique que dans le domaine préparatif.

2.1.2. Chromatographie d'adsorption

1. Définition de l'adsorption

L'adsorption est un phénomène **physico-chimique** qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide (ou gaz) sur une surface solide. Ce phénomène fait intervenir des **forces complexes** entre le soluté et l'adsorbant : forces électrostatiques, forces de liaison d'hydrogène et autre. Pour que cette adsorption soit utilisable à des fins préparatoires, il faut que cette fixation soit **réversible**. La désorption consiste à remettre, à l'aide d'un éluant approprié la substance en solution par rupture des liaisons précédentes.

2. Définition de la chromatographie d'adsorption

La chromatographie liquide/solide appelée aussi chromatographie d'adsorption met en œuvre des phases stationnaires ayant des propriétés adsorbantes, principalement les gels de silice poreuse et les gels d'alumine. Cette technique est complémentaire à la chromatographie de partage phase en normale. La séparation est fondée sur les **différences d'adsorption** des molécules du mélange sur cette phase, donc basée sur l'existence de dipôles dans une structure moléculaire.

3. Adsorbants

Les adsorbants sont sous forme de fines granulométries 3 à 20 μm . La séparation est meilleure, mais plus lente si les grains sont fins. Plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires. La séparation se fait par ordre croissant de leurs forces d'interaction avec les composés polaires. On distingue :

- ❖ Les supports pelliculaires : constitués de billes de verre avec un diamètre moyen de 40 μm recouvertes d'une pellicule d'adsorbant de 2-3 μm d'épaisseur.
- ❖ Les supports entièrement poreux, caractérisés par une grande capacité (100 fois plus grandes que celle des supports pelliculaires). L'un des adsorbants les plus couramment utilisés est la silice provient de la déshydratation de l'acide silicique, elle se présente sous forme d'une poudre blanche de très fine granulométrie.

4. Phase mobile

Il faut que le soluté soit soluble dans l'éluant pour que la migration se fasse et il est possible de faire des mélanges de solvants pour changer sa polarité. Sous réserve de leur miscibilité et de leur compatibilité avec le système de détection pour obtenir de bonne séparation. La plupart des séparations chromatographiques s'effectuent en adaptant la polarité de la phase stationnaire à celle du soluté; on utilise par contre une phase mobile dont la polarité est extrêmement différente.

5. Application

La chromatographie d'adsorption s'applique pour la séparation des composés apolaires de masses moléculaires inférieure à 3000. Elle est très utile pour les isomères, tels que les dérivés du benzène substitués en méta et en para et complémentaire à la chromatographie de partage en phase normale

2.1.3. Chromatographie d'échange d'ions

1. Définition

La chromatographie ionique (CI) est une technique analytique qui permet l'analyse **qualitative** (par séparation des espèces présentes) et **quantitative** des espèces ioniques présentes dans un échantillon liquide dépourvu de matières en suspension.

2. Principe

En chromatographie ionique le mécanisme de séparation se produit par échange d'ions entre une phase stationnaire, qui porte des groupements fonctionnels chargés et une phase mobile. Des gels de silice chimiquement modifiés à l'état solide remplissent une colonne d'acier et servent de phase stationnaire.

3. Phase stationnaire

La **phase stationnaire** dans la chromatographie ionique est une **résine** (polymère insoluble préparé sous formes de billes) **échangeuse d'ions** contenant des groupements **chargés** positivement ou négativement permettant la rétention des espèces dont on désire obtenir la séparation. Le soluté ionique ou ionisable interagit avec les groupes de charges opposées de la phase stationnaire.

L'échangeur d'ions comporte deux parties : les groupements fonctionnels qui lui confèrent ses propriétés et la matrice (support fixe) sur laquelle ces derniers sont greffés. Les groupements fonctionnels sont fixés par des liaisons covalentes sur la matrice; ils sont de deux types :

1. les échangeurs de cations portent des groupements chargés négativement (-) Résine anionique (échangeur de cations) : l'échange se fait suivant l'équation **Résine-G- / H+ + cation+ Résine-G/cation+ + H+**
2. les échangeurs d'anions portent des groupements chargés positivement (+) Résine cationique (échangeur d'anions): l'échange se fait suivant l'équation **Résine-G+ / OH- + anion- Résine-G+/anion- + OH-**

Chaque type d'échangeur se divise en deux groupes :

- 1) échangeur fort : reste pleinement chargé entre pH 3 et 10
- 2) échangeur faible : reste chargé dans une gamme de pH restreint

4. Support

Les supports peuvent être de deux types: minéraux comme la silice et organiques comme la résine **polystyrénique, cellulose, dextrane.**

Les caractéristiques des supports sont:

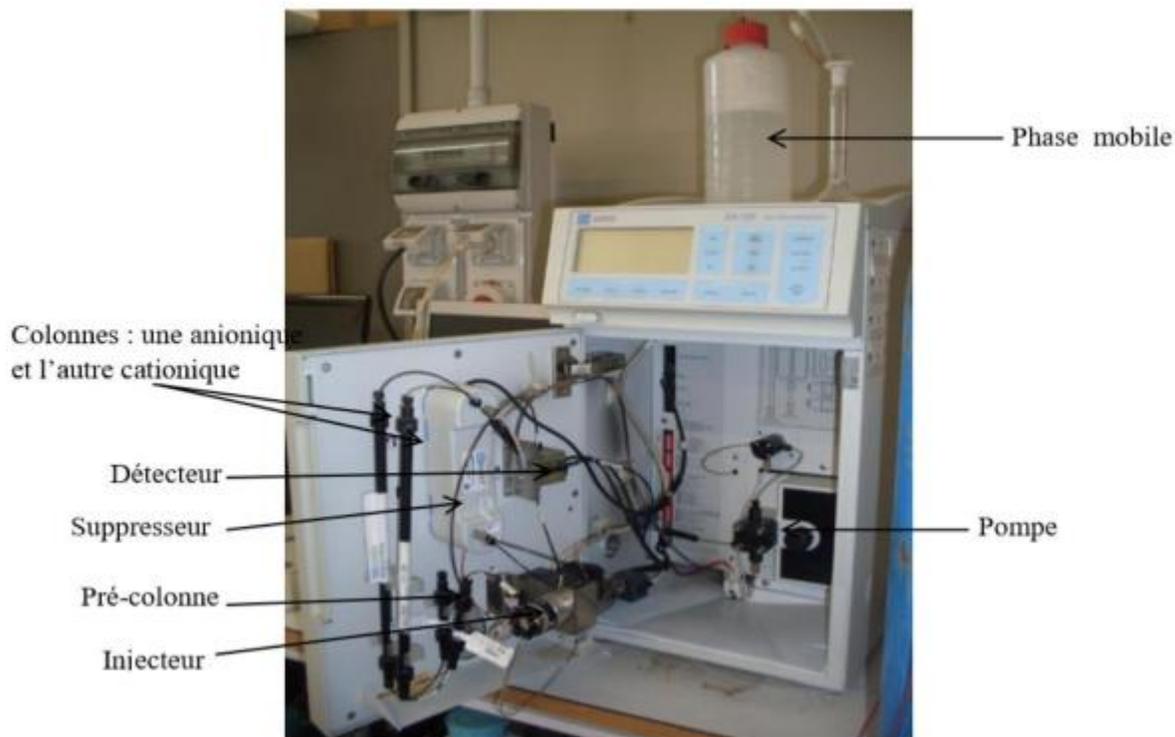
- ❖ **Porosité** : le support est un polymère plus ou moins réticulé. La porosité dépend du **taux de pontage** : un polymère très réticulé a des pores de petite taille et convient pour des petites molécules.
- ❖ **Granulométrie** : le support est commercialisé sous forme de grains de diamètre variant de 30 à 800 μm (chromatographie basse pression) celui des colonnes HPLC a une granulométrie de 5-10 μm (supports totalement poreux) ou légèrement supérieure (supports pelliculaires, en couche de 1 μm sur des billes de verre). Les échanges sont d'autant plus rapides et efficaces que les grains sont petits.

5. Phase mobile

La phase mobile est une solution aqueuse de force ionique donnée (généralement un tampon de pH). On peut éluer avec une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou avec un gradient de pH et (ou) de force ionique, pour décrocher successivement les différents ions fixés sur l'échangeur. Toutefois, il peut être nécessaire d'utiliser des mélanges de solvants polaires (méthanol-eau) afin d'optimiser une élution ou faciliter la solubilité de certains solutés. Le pH est paramètre principal de rétention.

6. Phase mobile

Un détecteur de conductivité est souvent utilisé avec ce type de chromatographie vu la nature ionique des analytes. Chaque ion peut donner un signal de conductivité, selon sa concentration en solution et sa conductivité. Une colonne de neutralisation ou de suppression de l'éluant est habituellement combinée à ce type de détecteur afin de supprimer la conductivité de l'éluant sans affecter celle de soluté donc transforme les ions de l'éluant en une espèce moléculaire peu dissociée. La détection par ampérométrie est appropriée pour les solutés, dont les produits d'oxydation se déposent à la surface des électrodes de mesure. Il s'agit notamment d'hydrates de carbone (sous forme ionique à des valeurs élevées de pH) ainsi que la plupart des composés sulfurés comme les thiols. La détection photométrique concerne la plupart des acides et amines aromatiques ou hétérocycliques comme l'acide benzoïque, l'aniline ainsi que les nitrates, les iodures et sulfites.



7. Applications

La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour **séparer des molécules ionisables**, quelle que soit leur taille: ions minéraux (tous les cations alcalins, alcalino-terreux ou métalliques), acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés. C'est une méthode analytique de référence en analyse des eaux, et est adaptée aux milieux biologiques.

2.1.4. Chromatographie par perméation sur gel

Chromatographie d'exclusion ou tamisage moléculaire

1. Définition

La chromatographie d'exclusion sur gel est une technique chromatographique qui permet de séparer des molécules, en fonction de leur **taille** et de leur **forme**.

2. Principe

Dans cette technique de chromatographie on utilise des granules de gels poreux, dont les pores ont une taille voisine de celle des molécules des composés. La séparation résulte de la différence de taille est fondée sur la possibilité de soluté à pénétrer ou de ne pas pénétrer à l'intérieur des pores de la phase stationnaire (limite d'exclusion). Les molécules de l'échantillon ; certains sont assez petites pour pénétrer dans la matrice poreuse, tandis que les plus grandes restent dans le volume

interstitiel de la phase stationnaire. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

3. Phase stationnaire

Les phases stationnaires sont constituées par des polymères réticulés organiques ou minéraux, sous forme de grains sphériques de 3 à 10 μm de diamètre avec des pores compris entre 4 nm et 200 nm et sous forme de billes ou de perles parfaitement calibrées. Mis en leur présence le solvant pénètre à l'intérieur de chaque particule et provoque leur gonflement. Dans cette technique le matériel servant de base est un gel. La filtration de gel est une chromatographie d'exclusion sur un support hydrophile qui est utilisé pour séparer des espèces polaires. Tandis que la perméation de gel est une chromatographie d'exclusion sur un support qui est utilisée pour séparer des espèces non polaires.

4. Phase mobile

La phase mobile doit surtout être capable de mouiller la phase stationnaire et d'éviter l'adsorption. Lorsque le gel est mou, le solvant doit aussi le gonfler puisque la taille des pores de ce gel dépend de la quantité de solvant imbibée. Les solvants les plus couramment utilisés sont : Eau, chloroforme, trifluoroéthanol. Cette méthode chromatographique est pratiquement indépendante de la nature du solvant donc on n'utilise pas de gradient d'éluion puisqu'il n'y a pas d'interaction soluté/phase mobile. Le volume d'éluion dans la colonne décomposée en deux parties :

Le volume interstitiel ou volume mort V_I (extérieur aux pores laissé libre entre les grains du gel) et le volume V_P le volume total des pores. V_I : volume nécessaire pour transporter une grosse molécule $V_e = V_I + V_P$ est le volume de la phase mobile correspondant pour une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores

5. Détection

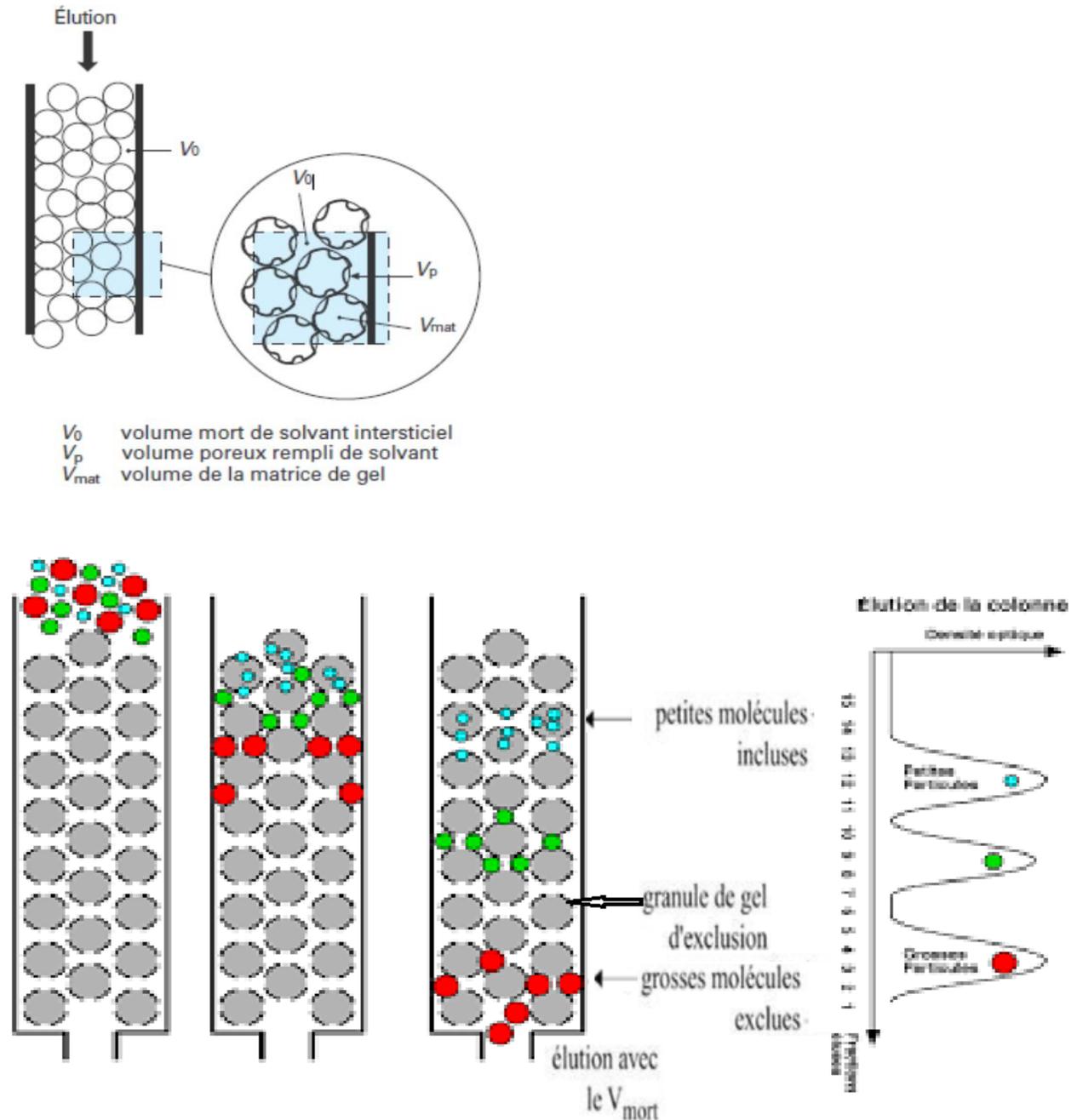
Le détecteur le plus employé est le réfractomètre différentiel ; d'autres détecteurs sont parfois ajoutés au réfractomètre.

6. Applications

Les applications de la chromatographie d'exclusion sont diverses, on peut citer, à titre d'exemple la séparation de polymère ou de macromolécules de poids moléculaires élevé d'origine biologique (fractionnement des polymères et les protéines), la caractérisation des pétroles bruts et la séparation des polyélectrolytes et des biopolymères dans le domaine biochimique. Cette technique est également appliquée au fractionnement de mélanges de macromolécules et à la détermination

Chapitre 2 : Chromatographie

(approximative) de la masse molaire des protéines. IL existe une relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire. Dans ce dernier cas, il faut d'abord étalonner la colonne avec des protéines de masse molaire connue, tracer le courbe $\log(M)$ en fonction du volume d'élution, puis effectuer une détermination graphique.



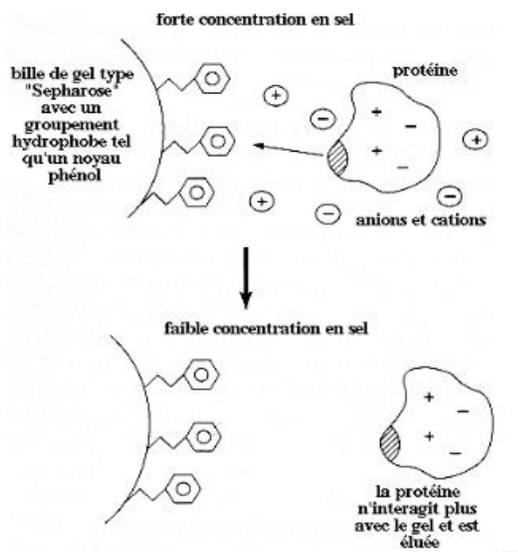
V = volume mort de la colonne, c'est le volume d'élution d'une substance qui n'interagit pas avec la phase stationnaire

Variation du **volume d'élution** en fonction de la **masse moléculaire** du soluté au cours d'un **tamissage** moléculaire

2.1.5. Chromatographie d'interactions hydrophobes et d'hydroxyapatite

1. Définition

Le gel de chromatographie d'interactions hydrophobes porte un groupement hydrophobe tel qu'un noyau phénol à l'extrémité d'une chaîne carbonée. Les parties hachurées (figure ci-dessous) représentent les régions de caractère hydrophobe en surface de la protéine.



6. Principe

1ère étape: On fixe la protéine à séparer sur le support chromatographique en présence d'une forte concentration en sel. Dans un milieu à haute force ionique, les molécules d'eau de l'enveloppe d'hydratation des protéines sont mobilisées pour hydrater les anions et les cations issus de la dissociation du sel, c'est le phénomène de "salting -out". Il en résulte une modification de l'organisation des molécules d'eau autour des protéines et ce changement d'environnement est thermodynamiquement favorable à l'établissement d'interactions hydrophobes entre les régions hydrophobes à la surface des protéines et le groupement hydrophobe porté par la phase stationnaire.

2ème étape: après rinçage du gel afin d'éliminer les protéines non adsorbées, l'élution des protéines fixées est obtenue en faisant passer un tampon de force ionique décroissante, les ions du sel étant ainsi progressivement éliminés. Les acides aminés chargés ou polaires à la surface des protéines

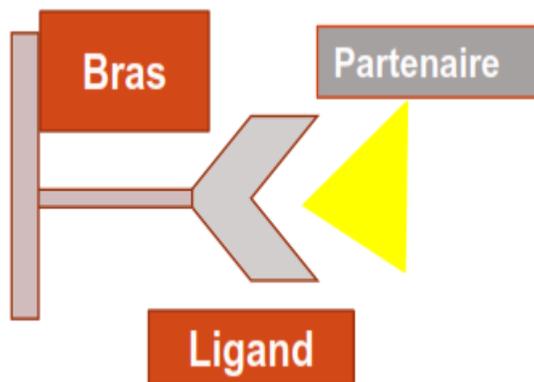
peuvent de nouveau établir des liaisons hydrogène avec la phase mobile, c'est-à-dire que la solubilité des protéines dans la phase mobile redevient maximale et elles sont éluées.

2.1.6. Chromatographie d'affinité

1. Définition

La chromatographie d'affinité est basée sur les interactions entre un effecteurs, lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase stationnaire (fixe), et son partenaire d'affinité en solution (molécule à purifier). Dans le complexe de nature biologique, dont la formation est à la base de la chromatographie d'affinité, l'un des partenaires au moins est une protéine ; cette protéine peut constituer le ligand fixe ou le partenaire d'affinité en solution. En général le complexe peut être :

- enzyme-substrat
- hormone-récepteur
- antigène-anticorps



2. Principe

Le principe de cette technique consiste à préparer le **gel d'affinité (Résine)**, en fixant le **effecteurs** (ligand) sur un **support inerte** . Une colonne est remplie de ce gel d'affinité, on y fait passer la solution aqueuse contenant la molécule à purifier. Celle-ci est retenue, alors que les **contaminants** en solution passent librement. On élimine toute trace de produits indésirables par des lavages successifs. Enfin, on élue la molécule retenue en décomposant le complexe. Pour cela, on modifie les conditions de milieu : changement de pH, utilisation d'un dénaturant réversible ou l'on fait passer une solution contenant un ligand ayant, pour la macromolécule retenue, plus d'affinité que le ligand fixe (inhibiteur compétitif réversibles) .

3. Caractères de supports

Les supports utilisés en chromatographie d'affinité doivent présenter les propriétés suivantes :

- ❖ être insolubles dans l'eau

- ❖ être poreux
- ❖ être stables chimiquement et mécaniquement
- ❖ porter des groupements fonctionnels réactifs permettant la fixation des **effecteurs**.

4. Effecteurs (Ligand)

Peuvent être effecteurs toutes les substances capables de former des complexes stables avec les molécules à isoler.

Les effecteurs utilisés sont :

- ❖ **pour la purification des enzymes :**

Des substances et analogues de substrats

Des inhibiteurs réversibles

Des coenzymes

- ❖ **en immunologie :**

Des antigènes.

Des anticorps.

- ❖ **pour l'étude des protéines réceptrices :**

Des hormones.

5. Étapes d'une chromatographie d'affinité

Quand une solution contenant un mélange de protéines traverse la colonne, la protéine d'intérêt se liera au ligand immobilisé, alors que les autres protéines ne s'y lieront pas et sortiront de la colonne on peut récupérer la protéine désirée sous une forme très pure en modifiant les conditions d'élution pour faire en sorte que la protéine se détache du ligand.

- **Etape de fixation**

Un ligand biospécifique est fixé par liaison covalente à une matrice (dextrane, agarose) sans perdre son affinité pour le produit à analyser. 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.

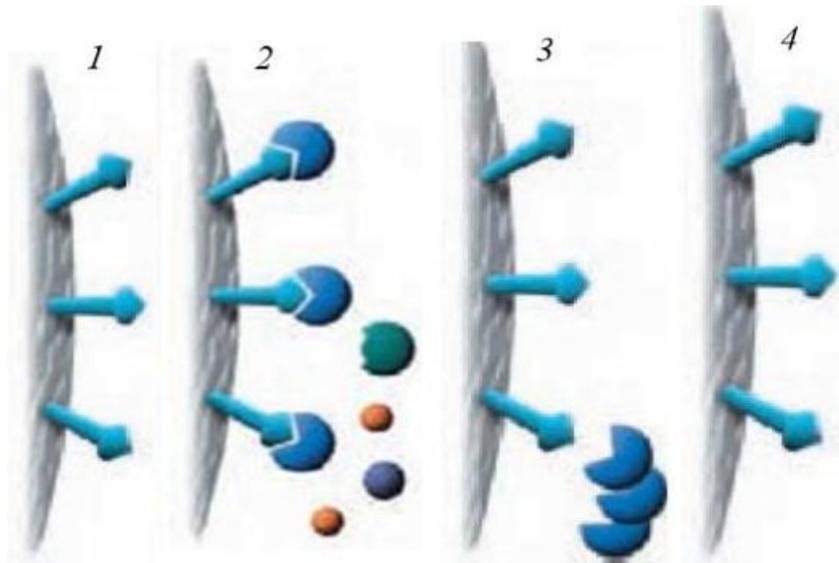
- **Etape de purification**

En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminant sont éliminées et éluées.

- **Etape d'élution**

La molécule est finalement décrochée de la colonne et recueillie. Cette étape peut être réalisée de différentes façons :

- + Tampons de pH différent de celui ayant permis la charge donc changement de l'état d'ionisation de la molécule donc on a désorption
- + Tampon de pH ionique différent de celle ayant permis la charge donc changement de conformation de la molécule.
- + Compétition avec un ligand libre (libération de la molécule d'intérêt par compétition pour les sites de fixation).



6. Application de la chromatographie d'affinité

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 protéinochimie, pour l'étude des protéines membranaires

2.1.7. Chromatographie liquide de haute performance HPLC/CLHP

1. Définition

La chromatographie liquide haute performance appelé CLHP est une technique instrumentale qui permet de **séparer** les composants d'un mélange **non volatile, thermosensible, de polarité élevée** afin de les identifier et les quantifier. Elle met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire,

des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. Son développement très rapide, à partir de 1970, réside dans le fait qu'elle n'a pas les inconvénients de la chromatographie liquide classique ; cette dernière a toujours été peu utilisée, en raison de la lenteur de la séparation ; de l'absence de détecteur qui aurait permis de suivre facilement le développement de chromatogramme et la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

2. Appareillage

Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance on retrouvera toujours les éléments de base suivants :

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile contenant soit des solvants purs soit des mélanges de solvants dans des concentrations connues.
- un système d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée.
- une colonne remplie, en acier inoxydable, de quelques centimètres de long.
- un détecteur permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés, dans un mélange.
- L'utilisation d'un solvant pur ou d'un mélange de solvants de composition constante dans le temps correspond à une étude en mode ISOCRATIQUE (le solvant utilisé possède le même pouvoir éluant durant toute l'élution).
- L'utilisation d'un mélange de solvants dont la composition est variable dans le temps correspond à une étude en mode GRADIENT.

1) Réservoir de phase mobile (un ou plusieurs réservoirs de phase mobile)

Un réservoir de solvant (éluant) qui contient la phase mobile en quantité suffisante mode ISOCRATIQUE OU Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) mode GRADIENT, à l'aide de la pompe.

2) Système de pompage

La pompe est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant. Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques microlitres/mn à plusieurs ml/min.

3) un système d'injection (vanne d'injection)

Le système d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative, il est constitué le plus souvent d'une vanne d'injection, la boucle d'injection (capacité de 5 à 5000 μ l).

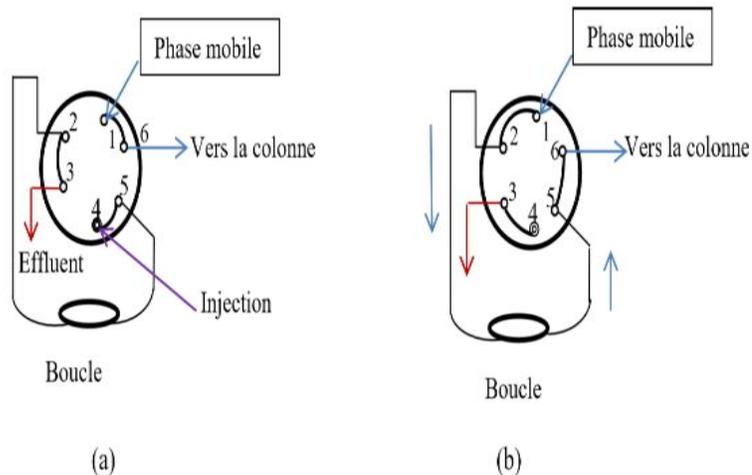
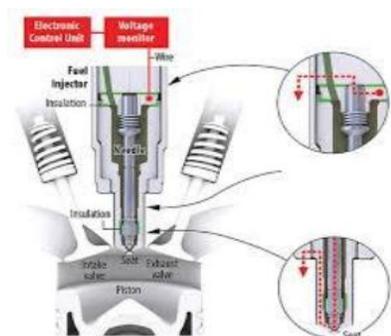


Fig. 1.3 Injecteur à boucle

(a) Remplissage de la boucle (b) Injection dans la boucle

4) Colonnes

Les colonnes de HPLC sont usuellement en acier inoxydable. La plupart des colonnes ont une longueur de 5 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 mm.

La colonne est souvent précédé pour augmenter sa durée de vie, d'une pré-colonne dite colonne de garde, courte de 1cm, qui retient les composés indésirables. On change périodiquement cette pré-colonne, bien qu'il soit par ailleurs conseillé de faire passer les échantillons avant analyse à travers un filtre de porosité inférieure à 0,5 μ m.

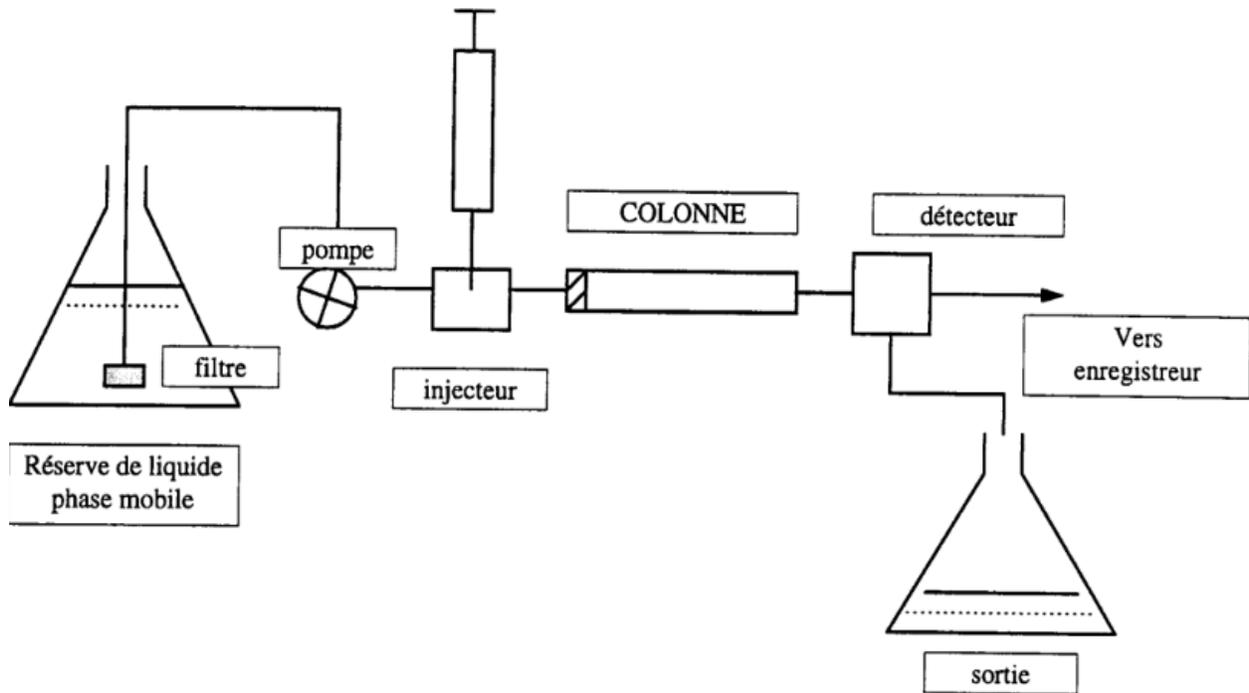
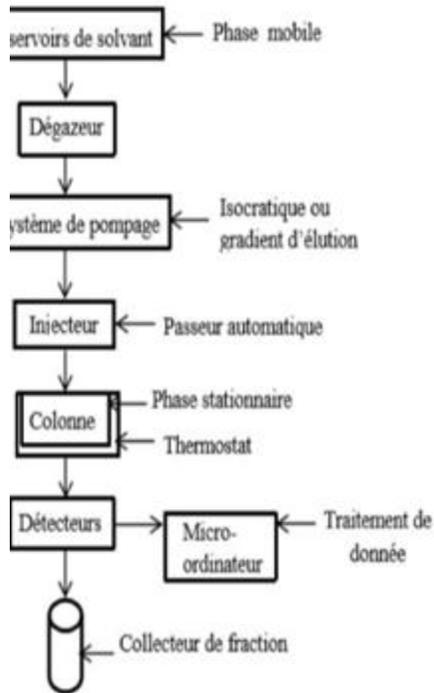


Figure 3 : principe de fonctionnement de l'HPLC



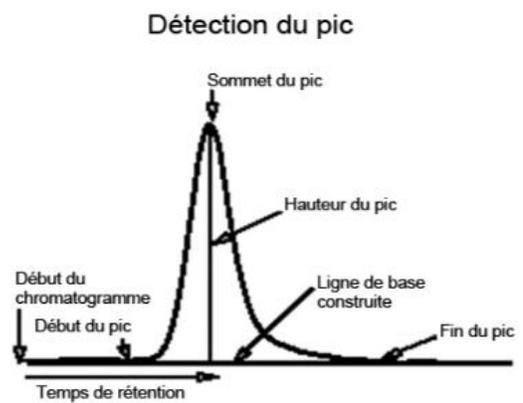
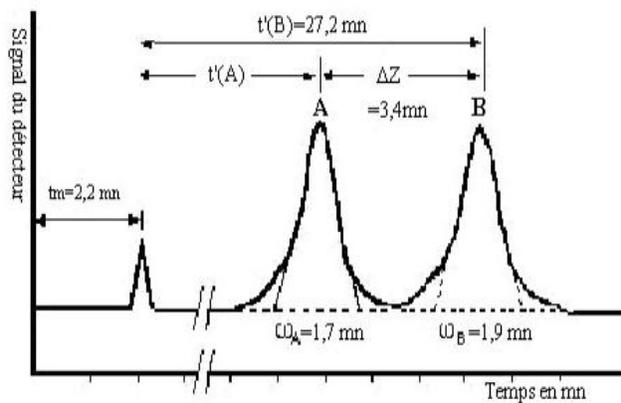
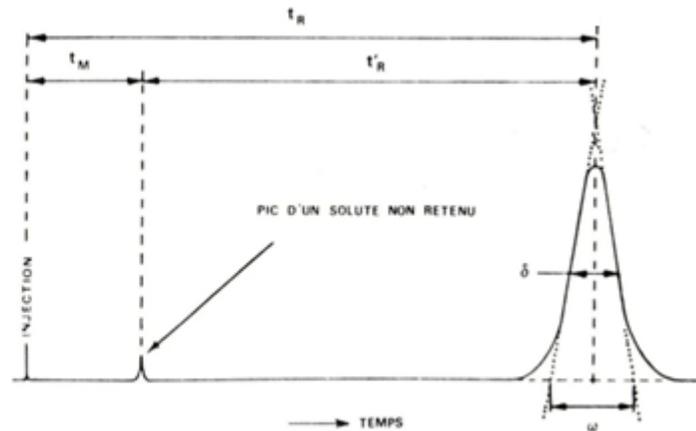
Les composants d'un chromatographe liquide à haute performance

(Appareil Dionex)

t_M : temps d'éluion de la phase mobile

t_R : temps de rétention

t_R' : temps de rétention réduit = $t_R - t_M$



V_0 = volume mort de la colonne, c'est le volume d'éluion d'une substance qui n'interagit pas avec la phase stationnaire

t_0 = temps mort = V_0 / D

$t - t_0$ = temps de rétention réduit

V = volume de rétention total (volume de solvant nécessaire pour éluier le composé).

$V - V_0$ = volume de rétention réduit

W_b = largeur du pic à la base

W_h = largeur du pic à mi-hauteur

h = hauteur du pic

5. Applications

Les domaines d'applications sont nombreux et vastes, l'HPLC est particulièrement employée en cosmétologie ou en biochimie.

- elle permet l'analyse de substances thermiquement instables, puisqu'elle s'effectue à T° ambiante.

- l'analyse de substances peu volatiles.
- l'analyse des substances ionisés (protéines, acides aminés...)

2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

1. Définition

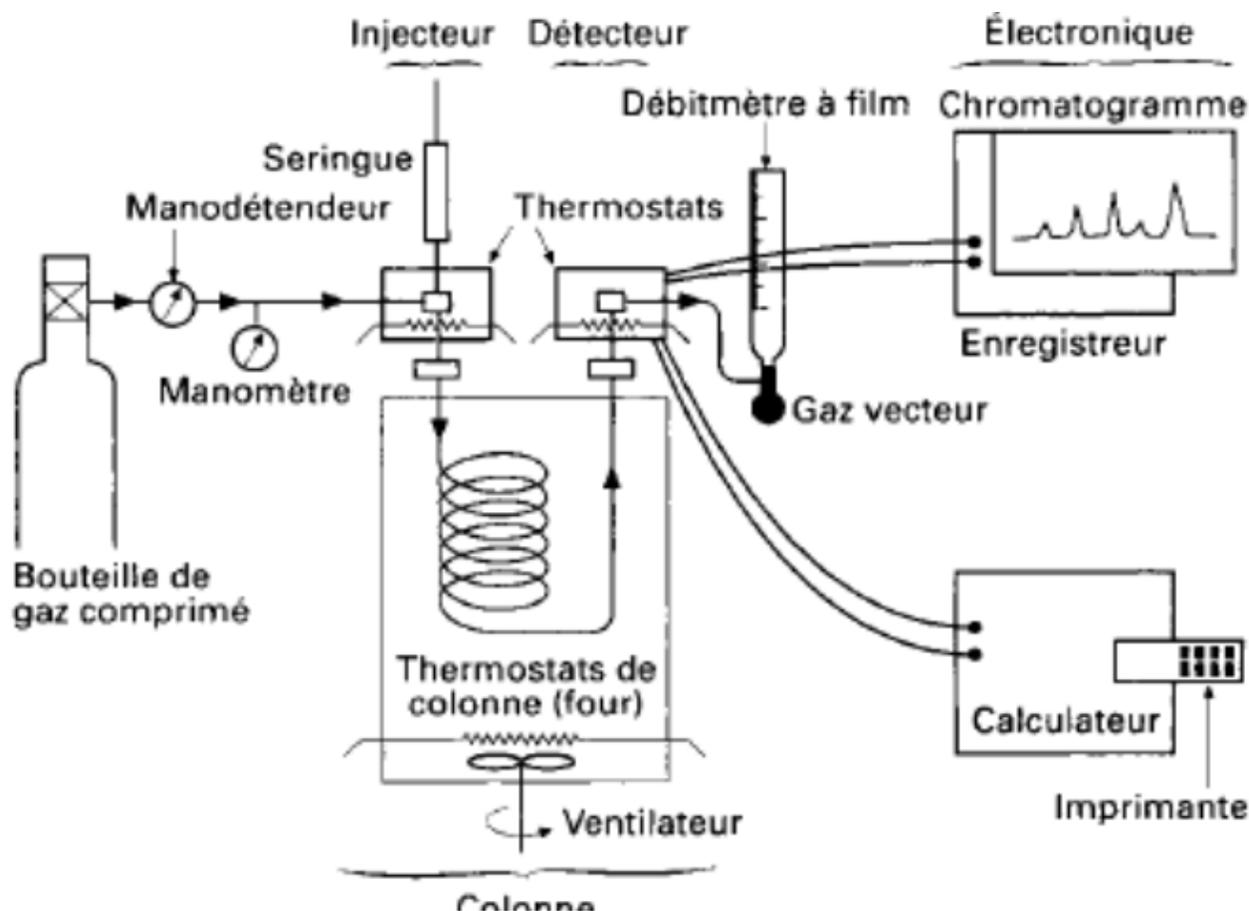
La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation dont les principes généraux sont les mêmes que ceux énoncés pour la chromatographie en général, c'est-à-dire fondés sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser au travers d'un substrat choisi. La particularité du procédé est d'opérer en totalité sur des produits volatilisés, ce qui implique de maintenir une température minimale convenable, mais sans qu'il y ait volatilisation du substrat, et de travailler en circuit étanche aux gaz.

2. Principe

La chromatographie en phase gazeuse est une transposition de la chromatographie sur colonne dans laquelle la phase mobile liquide a été remplacée par un gaz.

La CPG gaz-solide est une chromatographie d'adsorption, la phase stationnaire étant un solide adsorbant, la migration différentielle est assurée par les différences d'adsorbance.

La CPG gaz-liquide est une chromatographie de partage, la phase stationnaire étant un liquide non volatil réparti sur un support inerte. Le gaz vecteur est le gaz qui véhicule les solutés. la migration différentielle est obtenue par les différences de solubilité dans le liquide fixe. Le soluté separtage entre le gaz vecteur et le liquide stationnaire.



2.1. Alimentation en gaz vecteur (phase mobile) par bouteille à haute pression

Le gaz vecteur peut être de l'hélium, de l'azote, de l'hydrogène ou de l'argon, son choix dépend de facteurs tels que la disponibilité, la pureté, la consommation et le type de détecteur utilisé (avec des détecteurs à conductivité thermique, on choisit l'hélium en raison de sa conductivité thermique élevée par rapport à la plupart des vapeurs de composés organiques).

L'alimentation en gaz vecteur à haute pression implique des débitmètres et des régulateurs de pression, l'efficacité de l'appareil dépend beaucoup du maintien d'un débit constant du gaz vecteur.

2.2-injecteur

Les échantillons liquides sont injectés à l'aide d'une micro-seringue graduée dans la chambre de vaporisation, au travers d'un bouchon généralement constitué de téflon, la température doit être suffisante à l'entrée de l'échantillon pour permettre une vaporisation du liquide sans que l'échantillon se décompose ou que s'effectue une séparation partielle des constituants, en règle générale on choisit la température d'ébullition du constituant le moins volatil, pour plus

d'efficacité, on prélèvera le plus faible volume d'échantillon (1 à 10 μ l) qui soit compatible avec la sensibilité du détecteur.

Nature d'échantillon injecté

Le traitement de l'échantillon varie selon les substances analysées :

- lorsque les solutés à analyser sont directement volatilisables, les substances sont extraites, purifiées, solubilisées dans un solvant volatil pur et chromatographées.
- lorsque les solutés ne sont pas volatils à la température du chromatographe ou bien sont décomposés à cette température, il faut les transformer avant l'analyse en dérivés volatils stables ; les acides aminés sont estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés....

2.3. Colonne

La colonne est placée dans un four fermé à thermostat pour maintenir la température constante à 0,5°C près et pour que les conditions soient reproductibles. Cette température peut être choisie dans une gamme allant de la température ambiante jusqu'à plus de 400°C et pour une opération isotherme.

Les colonnes remplies (classiques):

Constituées de tubes ayant jusqu'à 5m de long, de 2 à 4 mm de diamètre intérieur, en verre, en métal (aluminium, acier inoxydables ou cuivre ou en plastique résistant aux hautes températures (téflon).

Les colonnes capillaires:

Les premières colonnes capillaires en quartz étaient préparées en revêtant la surface interne d'un tube de silice vitreuse, de 50m de longueur et de 0,22 mm de diamètre intérieur.

2.4. Détecteur

Placé à la sortie de la colonne de séparation, leur fonction est de détecter et de mesurer, après séparation la présence de petites quantités de constituants dans l'éluat de la colonne. Les résultats sont envoyés à un appareil qui trace une courbe appelée chromatogramme. Le choix du détecteur dépend de plusieurs facteurs tels que le niveau des concentrations à mesurer et la nature des constituants séparés. On distingue trois types de détecteur:

- ✚ Détecteur à ionisation de flamme.
- ✚ Détecteur à capture d'électron.
- ✚ Détecteur à cathétomètre.

3. Applications

- Détection des traces (toxicologie, la répression des fraudes...)
- Dosages en biologie (stéroïdes, acides gras, oses...)
- Microbiologie (analyse des produits de fermentation, taxonomie

On résume Les paramètres physico-chimiques sur lesquels reposent les principes de séparation dans le tableau suivant :

Paramètres	type de chromatographie	domaine d'application
la charge électrique	échange d'ions	<ul style="list-style-type: none"> • <u>protéines</u> • polypeptides • <u>acides aminés</u> • acides nucléiques • <u>sucre</u>s
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