

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la
Terre
Département des Sciences Biologiques**

Support pédagogique :

**Biochimie instrumentale I : Méthodes d'analyses
chromatographiques.**

Niveau : 1 ère année Master Biochimie appliquée

Semestre : 1

Intitulé de l'UE : UE méthodologie

Intitulé de la matière : Biochimie instrumentale I

Crédits : 5

Coefficients : 3

Volume horaire semestrielle : 24 heures

Préparé par :

HAMID OUDJANA Aicha

Table des matières

Objectifs de l'enseignement.....	4
I.- Techniques chromatographiques.....	4
I.1.-Généralités	4
I.2.-Les grandes étapes de l'évolution de la chromatographie.....	4
I.3.-Principe	4
I.4.-Différents types de chromatographie.....	5
I.4.1.-Classification selon la nature physique des phases.....	5
I.4.2.-Classification selon le phénomène chromatographique.....	5
I.4.3.-Classification selon les procédés utilisés.....	5
I.5.-Terminologie générale de la chromatographie.....	6
II.- Chromatographie liquide en basse pression.....	6
II.1-Chromatographie de partage.....	6
II.1.1-Principe.....	6
II.1.2.-Solvants.....	7
II.1.3.-Support.....	7
II.1.4.-Analyse des fractions.....	7
II.1.5.-Appareillage.....	9
II.2.-Chromatographie d'adsorption.....	9
II.2.1.-Principe.....	9
II.2.2.-Eléments de la chromatographie d'adsorption.....	9
II.2.2.1.-La phase stationnaire.....	9
II.2.2.2.-La phase mobile.....	10
II.2.3.-Techniques expérimentales.....	10
II.2.3.1.-Chromatographie d'adsorption sur couche mince (CCM).....	10
II.2.3.2.-Chromatographie d'adsorption sur colonne.....	10
II.2.3.2.1.-Remplissage de la colonne.....	10
II.2.3.2.2.-Dépôt des produits à analyser.....	11
II.2.3.2.3.-Elution.....	11
II.2.3.2.4.-Analyse des fractions.....	11
II.3.-chromatographie d'exclusion ou tamisage moléculaire.....	11
II.3.1.-Principe.....	11
II.3.2.-Étude théorique.....	12
II.3.3.-Les gels.....	13
II.3.4.-Technique du tamisage moléculaire.....	14
II.3.5.- Application de la chromatographie d'exclusion.....	15
II.4.- Chromatographie d'affinité.....	15
II.4.1.-Principe.....	15
II.4.2.- La phase stationnaire de la chromatographie d'affinité.....	15
II.4.3.- Etapes de l'affinité.....	16
II.4.4.- Application de la chromatographie d'affinité.....	17
II.5.- Chromatographie échangeuse des ions.....	18
II.5.1.-Principe.....	18
II.5.2.-Support	18
II.5.3.- groupements fonctionnels des résines.....	19
II.5.4.- Etapes d'une chromatographie sur échangeur d'ions.....	20
II.5.5.- Techniques expérimentales.....	20

II.5.6.- Applications de la chromatographie par échanges d'ions.....	20
III.- Chromatographie liquide en haute pression.....	20
III.1.- Chromatographie liquide haute performance HPLC/CLHP.....	20
III.1.1.-Principe.....	20
III.1.2.-Notion de plateaux théoriques.....	21
III.1.3.-Appareillage.....	21
III.1.3.1.-Réservoir de phase mobile.....	22
III.1.3.2.-Système de pompage.....	22
III.1.3.3.-Vanne d'injection.....	22
III.1.3.4.-Colonnes.....	22
III.1.3.5.-Détecteurs.....	22
III.1.3.5.1.-Spectrophotomètre UV-Visible.....	22
III.1.3.5.2.-Détecteur à fluorescence.....	23
III.1.3.5.3.-Détecteur réfractométrique.....	23
III.1.3.6.-Phase mobile.....	23
III.1.3.7.-Phase stationnaire.....	23
III.1.4.-Application.....	24
III.2.- Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	24
III.2.1-Principe.....	24
III.2.2-Appareillage.....	24
III.2.2.1-Alimentation en gaz vecteur (phase mobile) par bouteille à haute pression.....	24
III.2.2.2-injecteur.....	25
III.2.2.3-La colonne.....	25
III.2.2.4- Détecteur.....	25
III.2.3.-Application.....	27
VI.- Analyse qualitative des donnés.....	27
V.- Analyse quantitative des donnés.....	29
V.1.- Mesure de l'aire.....	29
V.2.- Mesure de la concentration.....	29
Références bibliographiques.....	30

Objectifs de l'enseignement :

L'objectif général de cet enseignement est de permettre aux étudiants en master biochimie appliquée la compréhension du principe et techniques d'analyse chromatographique

I.- Techniques chromatographiques

I.1.-Généralités :

La chromatographie, méthode d'analyse immédiate, sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixée). La première chromatographie a été réalisée en 1906 par le botaniste russe Mikhaïl Tswett et consistait à séparer les pigments d'une feuille d'épinard. Tswett avait observé la séparation des colorants végétaux, dont les chlorophylles, lorsqu'il filtrait leurs solutions dans l'éther de pétrole, sur une colonne de carbonate de calcium (CaCO_3). Dans ces conditions, en effet, des zones colorées vertes et jaunes se forment, ce qui explique l'origine du nom de la méthode en grec. Chroma : signifie «couleur » et graphein « écrire».

I.2- Les grandes étapes de l'évolution de la chromatographie :

1906 - Le botaniste russe, M. TSWETT, publie son livre: "Les chromophylles dans le monde végétal et animal", où sa méthode de séparation de pigments est décrite en détail.

1931 - KHUN et LEDERER séparent à une échelle préparative les carotènes et des xanthophylles. Le long sommeil de la méthode de Tswett est rompu ; elle se développe rapidement, grâce aussi aux travaux de BROCKMANN, KARRER, WINTERSTEIN et ZECHMEISTER.

1938 - REICHSTEIN introduit le "chromatogramme liquide" permettant des séparations de substances incolores. Cette forme de chromatographie est depuis, très largement utilisée.

1940-1943 - TISELIUS met au point ses méthodes "d'analyse frontale" et de "développement par déplacement".

1941 - MARTIN et SYNGE introduisent la chromatographie d'adsorption sur gel de silice. Dorénavant, au lieu de quelques grammes de protéine, quelques milligrammes sont suffisants pour l'analyse des acides aminés neutres.

1944 - CONSDEN, GORDON et MARTIN inventent la chromatographie de partage sur papier, méthode très ingénieuse, permettant d'analyser non plus quelques milligrammes, mais quelques grammes d'acides aminés, de sucres, etc.

1940-1947 - WILSON, DEVAULT, WEISS, GLÜCKAUF, MARTIN, SYNGE et d'autres développent des théories détaillées de la chromatographie.

1947 - Un groupe de chercheurs américains, dont BOYD, MARINSKY, SPEDDING, TOMPKINS, etc., publient des détails de leurs travaux de séparation de terres rares et de corps radioactifs sur échangeurs d'ions. Ces recherches ont permis des séparations importantes à une échelle industrielle et sont à la base de la fabrication de certains isotopes actuellement sur le marché. La chromatographie s'est ainsi assurée une place importante en Chimie minérale.

I.3-Principe :

Le principe de la chromatographie est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans l'échantillon analysé et obtenue par la partition des solutés entre les phases fixe et mobile. Chaque molécule du mélange à séparer est soumise à une force de rétention, affinité du soluté pour la phase fixe et une force de mobilité, entraînement du soluté par la phase mobile (entraînement qui dépend essentiellement de la solubilité de la molécule dans la phase mobile). La résultante de ces deux forces étant variable selon la molécule, chacune d'elle migrera à une vitesse qui lui est propre.

Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille, la forme, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers, la polarité, la charge électrique.

I.4 Différents types de chromatographie

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon trois modalités différentes :

- ☞ Classification selon la nature physique des phases.
- ☞ Classification selon le phénomène mis en œuvre.
- ☞ Classification selon le procédé opératoire.

I.4.1 Classification selon la nature physique des phases

- ☞ La phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz (soit encore un fluide supercritique)
- ☞ La phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide fixé sur un support solide.

Donc selon le type des phases mobile et solide on distingue :

La chromatographie liquide-solide(LSC).

La chromatographie liquide-liquide(LLC).

La chromatographie gaz-liquide (GLC ou GC).

La chromatographie gaz-solide (GSC-GC).

La chromatographie supercritique (SFC).

I.4.2 Classification selon le phénomène chromatographique

Ce dernier dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée. On distinguera donc :

- ☞ La chromatographie d'adsorption : c'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide.
- ☞ La chromatographie de partage : c'est une chromatographie liquide-liquide. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte. cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.
- ☞ La chromatographie sur échangeurs d'ions : la phase stationnaire est un échangeur d'ion constitué par une résine porteuse de groupement ionisés négativement ou positivement exerçant des interactions de type électrostatiques avec les solutés ioniques du milieu.
- ☞ La chromatographie d'exclusion : appelée aussi tamisage moléculaire ou perméation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, cependant les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel.
- ☞ La chromatographie d'affinité : la phase stationnaire est un support chimiquement inerte, sur lequel est greffé un secteur qui présente une bio-affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité entre enzyme-substrat, enzyme-effecteur, antigène-anticorps).

I.4.3 Classification selon les procédés utilisés :

Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :

- ☞ La chromatographie sur colonne.
- ☞ La chromatographie sur papier.
- ☞ La chromatographie sur couche mince.
- ☞ Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera :
- ☞ La chromatographie par développement (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire). C'est le cas d'un support contenant la phase stationnaire où une colonne remplie par cette phase.

☞ La chromatographie d'élution (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).c'est généralement le cas d'une colonne remplie par la phase stationnaire.

I.5-Terminologie générale de la chromatographie :

- ☞ élution : percolation d'un composé sur une colonne.
- ☞ éluat : solution recueillie au bas de la colonne.
- ☞ Soluté: toute substance constituant d'un mélange, séparée par chromatographie.
- ☞ Phase mobile: le vecteur, liquide ou gazeux, qui déplace le soluté.
- ☞ Phase stationnaire: le produit qui, par ses affinités avec les solutés, va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace.
- ☞ Support: Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire.
- ☞ Remplissage: l'ensemble des produits (adsorbant, support + phase stationnaire, etc...) qui garnissent une colonne chromatographique.
- ☞ Colonne chromatographique: tube de diamètre et longueur variable, en verre, métal, ou autre substance, à l'intérieur duquel s'opèrent les séparations chromatographiques.
- ☞ Développant: une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, de telle manière qu'ils demeurent dans celle-ci : cas de la CP et de la CCM.
- ☞ Éluant: une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, jusqu'à ce qu'ils sortent de celle-ci.
- ☞ Rapport frontal: rapport entre la distance parcourue par un soluté dans une phase stationnaire et la distance parcourue en même temps par le développant(solvant).
- ☞ Coefficient de partage: rapport des concentrations respectives du soluté dans la phase stationnaire et la phase mobile, au cours de l'analyse.
- ☞ Valeurs de rétention: toutes données qui permettent de chiffrer l'action spécifique d'une phase stationnaire donnée sur un soluté donné, au cours d'une analyse chromatographique.
- ☞ Chromatogramme: trace sur un papier enregistreur des réponses successives du détecteur, au cours de l'élution des solutés hors des colonnes.

☞

II.- Chromatographie liquide en basse pression

La phase mobile est un liquide. La phase stationnaire est de nature variée. Selon le cas on distingue :

II.1-Chromatographie de partage

Connue aussi sous le nom de chromatographie liquide-liquide car la phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte et la phase mobile est elle aussi un liquide. Le soluté se répartit entre deux phases liquides.

II.1.1-Principe

La séparation est basée sur le partage différentiel de chaque soluté à analyser entre deux liquides non miscibles l'un formant la phase stationnaire et l'autre la phase mobile.

✓ Coefficient de partage

Lorsqu'un soluté A est distribué entre deux liquides non miscibles (S et S'), il s'établit un équilibre :

$$A_S \rightleftharpoons A_{S'}$$

On définit le coefficient de partage comme étant le rapport des concentrations du soluté A dans les deux phases S et S' à l'équilibre et à température donnée :

$$q = [A]_s / [A]_m$$

La transposition de cette partition entre deux phases liquides dans un système chromatographique est rendue possible par la fixation de l'un des solvants sur un support inerte, l'autre constituant la phase mobile.

Un soluté très soluble dans la phase fixée migrera lentement, la force de rétention prédominant la force d'entraînement. A l'inverse, un soluté soluble dans la phase mobile migrera rapidement.

On appelle rapport frontal R_F (référence front) le rapport :

$$R_F = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

- ✓ Un soluté très soluble dans la phase fixe aura un R_F faible
- ✓ Un soluté très soluble dans la phase mobile aura un R_F élevé et proche de 1.

II.1.2.-Solvants

Un partage est caractérisé par ses deux solvants de développement, l'un fixe, l'autre mobile. Les deux solvants sont caractérisés par leurs différences de polarité et leurs non-miscibilités. Généralement, le solvant fixe est polaire (très souvent l'eau). Le solvant mobile, non polaire, est constitué fréquemment d'un mélange de solvants plus au moins apolaires, selon les nécessités de la séparation.

II.1.3.-Support

Pour servir de support à la phase stationnaire, il faut des matières poreuses neutres, peu ou pas adsorbantes, finement divisées.

- Terre d'infusoires Ex. célité 535, hyflo superce.
- Gel de silice : qui peut être purifié par lavage à l'éther ou au chloroforme.
- Cellulose : un lavage préliminaire et soigné est utile.
- Caoutchouc en poudre : purifié par extraction à l'acétone.
- Terre d'infusoires imprégnée : Ex.hyflo supercel exposé à des vapeurs de diméthyl dichlorosilane.
- Papier cellulosique type Whatman.

II.1.4.-Analyse des fractions

L'analyse des fractions est presque toujours qualitative et elle peut être quelque fois quantitative.

☞ Analyse qualitative

L'identification des composés du mélange peut se faire selon plusieurs procédés :

- par utilisation de témoins (standards): ce sont des composés supposés du mélange dont on dépose des solutions pures sur le même chromatogramme. On compare la migration des témoins à celle des spots de l'échantillon analysé.
- on caractérise la migration des solutés 1 et 2 soit par leur R_F soit par leur R_T :

$$R_T = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par le solvant mobile}}$$

$$R_T = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par un témoin}}$$

Dans le cas où l'on chromatographie des substances incolores, il est nécessaire de visualiser les spots : plusieurs procédés peuvent être utilisés :

☞ par fluorescence.

☞ par une réaction chimique, on distingue :

- Des réactions générales, utilisées pour un groupe de composés, comme la réaction à la ninhydrine pour les acides aminés et la réaction de Molisch pour les oses.
- Des réactions spécifiques, employées pour une seule substance, la réaction de Millon pour la tyrosine par exemple.

☞ **Analyse quantitative**

La chromatographie de partage peut quelque fois donner lieu au dosage des solutés séparés. Dans ce cas, les dépôts sont quantitatifs. Les procédés consistent en :

- Une planimétrie des spots : cette méthode, utilise la proportionnalité qui existe entre le logarithme de la surface du spot et la concentration du soluté $\log S = k \cdot (C_s)$.
- Une élution : les spots sont découpés, élués dans un solvant convenable, dosés par absorptiométrie moléculaire.
- Une densimétrie directe sur chromatoplaque : ce procédé courant mesure la densité optique du spot, grandeur proportionnelle à la concentration.

Remarque :

Dans le cas où le mélange contient des solutés de mobilités voisines, on peut augmenter le pouvoir séparateur en réalisant une chromatographie bidimensionnelle : 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.



Fig. Chromatographie bidimensionnelle.
a) première chromatographie ; **b)** deuxième chromatographie.

II.1.5.-Appareillage :

La chromatographie de partage liquide-liquide peut être réalisée :

- ☞ **Sur colonne** : La colonne est remplie d'un support imprégné d'un solvant fixe. L'ensemble constitue la phase stationnaire.
- ☞ **Sur papier** : la feuille de papier, sur laquelle le dépôt a été fait, est introduite dans la cuve contenant la phase fixe, le plus souvent aqueuse.

II.2.-Chromatographie d'adsorption :

II.2.1.-Principe

La chromatographie d'adsorption est basée sur la répartition des solutés entre l'adsorbant solide fixe (phase stationnaire) et la phase liquide (phase mobile). Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

L'adsorption est la fixation des molécules dissoutes par la phase fixe solide. cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée (liaison dipôle-ion, dipôle -dipôle ou liaisons de Van der Waals)

II.2.2.-Eléments de la chromatographie d'adsorption :

II.2.2.1.-La phase stationnaire

Les adsorbants doivent être insolubles dans le solvant et chimiquement inertes, vis-à-vis du solvant et des solutés.

La qualité d'un adsorbant dépend de sa pureté, de sa surface, de son homogénéité, de sa teneur en eau, il est caractérisé par les critères expérimentaux suivants :

- ☞ La polarité : certains adsorbants présentent une forte polarité **Exp** : la silice SiO₂ utilisée sous forme hydratée comme le gel de silice, qui présente des fonctions silanol Si-OH, l'alumine Al₂O₃, tandis que d'autres, au contraire, ont une faible polarité comme le charbon actif.
- ☞ La capacité d'adsorption : On distingue :
 - Les adsorbants faibles (à faible capacité d'adsorption) **Exp** : le talc ou le carbonate de sodium,
 - Les adsorbants forts (à capacité d'adsorption élevée) **Exp** : le gel de silice ou l'alumine.

Remarque : dans certaines techniques on peut utiliser comme phase stationnaire des silices greffées polaires, la nature du greffon fixé sur les groupements silanols permet de moduler le caractère polaire de la phase stationnaire.

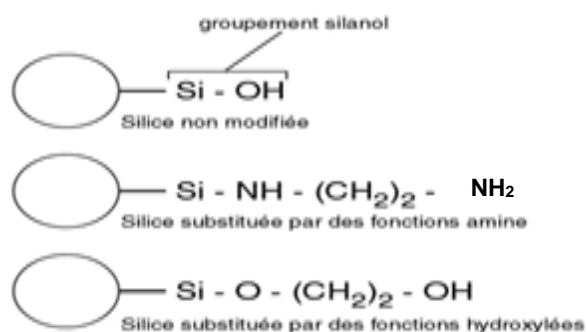


Fig. Silices greffées polaires

- ☞ La granulométrie : les adsorbants sont commercialisés sous forme de granules calibrés ; la séparation est meilleure mais plus lente si les grains sont fins.

II.2.2.2.-La phase mobile :

On utilise soit un solvant pur, soit un mélange monophasique de solvants, soit la phase organique d'un mélange diphasique.

Pour un système chromatographique donné (caractérisé par une phase stationnaire, la température, la pression et le soluté), le pouvoir éluant dépend de la polarité du solvant.

Exemple d'une phase stationnaire constituée d'un adsorbant polaire (gel de silice), d'un soluté polaire adsorbé et d'un solvant polaire (méthanol). Le solvant polaire possède un pouvoir éluant élevé, fortement adsorbé, il déplace le soluté. En revanche un solvant apolaire comme l'éther de pétrole possèdera un mauvais pouvoir éluant, mais entrainera un soluté apolaire.

II.2.3.-Techniques expérimentales :

La chromatographie d'adsorption est appliquée selon différentes techniques :

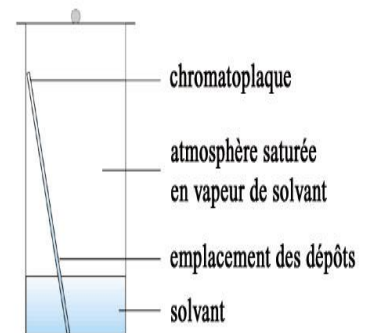
- ☞ Dans une colonne remplie avec l'adsorbant qui sera déposé de façon régulière et homogène. Le remplissage peut se faire soit avec de l'adsorbant sec ou humide.
- ☞ sur une couche mince où l'adsorbant en mélange avec un liant (plâtre par exemple) est uniformément étalé sur une plaque de verre, d'aluminium ou un support plastique.
- ☞ Sur papier en chromatographie ascendante ou descendante dans ce cas le papier constitue la phase fixe.

II.2.3.1.-Chromatographie d'adsorption sur couche mince (CCM)

L'adsorbant (gel de silice, gel de cellulose,..) mélangé à un liant est uniformément étalé sur une plaque de verre, d'aluminium ou un support plastique.

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

- ☞ la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche est saturée en vapeur avant la chromatographie. La saturation de la cuve a pour but de limiter l'évaporation de la phase mobile depuis la chromatoplaque et de compenser le processus d'entraînement des solutés par la phase mobile.
- ☞ la phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.



- ☞ l'échantillon : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.

II.2.3.2.-Chromatographie d'adsorption sur colonne

II.2.3.2.1-Remplissage de la colonne :

Le remplissage de la colonne est effectué avec soin, l'adsorbant est régulièrement disposé de manière à réaliser un lit homogène, sans fissure ni bulle.

On distingue deux techniques de remplissage :

☞ Remplissage par voie humide :

On réalise une bouillie de l'adsorbant dans le solvant, après dégazage sous vide, on l'introduit dans la colonne. On homogénéise et tasse le lit par agitation (On tapote les parois de la colonne ou rotation de la colonne).

☞ **Remplissage par voie sèche :**

Dans ce cas on introduit l'adsorbant en poudre dans la colonne, puis on l'imbibe de solvant, le contenu de la colonne est tassé ; on peut terminer le tassage par une légère dépression.

Remarques :

- 1- Il convient de ne jamais laisser une colonne à sec, ce qui provoquerait l'apparition de fissures et de bulles.
- 2- On peut placer un disque de verre fritté ou une rondelle de papier filtre au-dessus de l'adsorbant pour prévenir une remise en suspension de l'adsorbant.

II.2.3.2-Dépôt des produits à analyser:

L'échantillon à analyser est déposé sous forme d'un disque étroit, de façon uniforme, en une seule fois, à la surface du solide adsorbant, en évitant toute turbulence.

II.2.3.2.3-Elution :

Le développement (élution) est fait en percolant la phase mobile, à débit constant à l'aide d'un réservoir contenant le solvant et adapté en haut de la colonne.

II.2.3.2.4-Analyse des fractions :

☞ **Analyse par développement :** les constituants se séparent, mais restent dans la colonne, pour les composés colorés, les zones visibles sous forme de disques s'échelonnent le long de la colonne. Si les composés incolores sont fluorescents, on peut observer les zones de fixation par fluorescence, à l'aide d'une lampe à ultraviolets. Ou bien la phase stationnaire sèche est sortie de la colonne puis, à l'aide d'un pinceau, on l'imbibe avec un révélateur.

☞ **Analyse par élution :**

Si on continue à verser le solvant, la progression des zones se poursuit et l'on peut recueillir les différentes fractions séparées de l'échantillon, l'ensemble des fractions de l'éluat constitue un chromatogramme liquide.

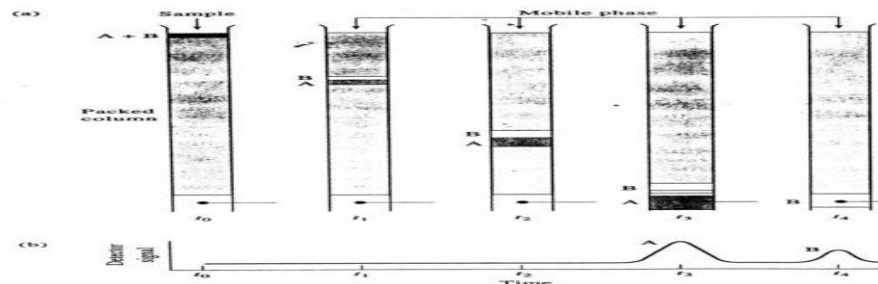


Fig. Courbe d'élution

Chaque fraction est caractérisée par son volume de rétention (V_A pour la molécule A , V_B pour la molécule B,....).

II.3.-Chromatographie d'exclusion ou tamisage moléculaire :

II.3.1.-Principe :

La chromatographie d'exclusion sur gel est une technique chromatographique qui permet de séparer des molécules, en fonction de leurs tailles et de leurs formes.

Un mélange de solutés de masse molaires variables traverse une épaisseur donnée de gel dans ce cas :

- ☞ les grosse molécules, celles dont le diamètre est supérieur à celui des pores, sont exclues et sont éluées les premières
- ☞ les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses, leurs migrations sont freinées en diffusant dans le gel.

La séparation est donc réalisée par le fait que les solutés sont élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires, il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire.

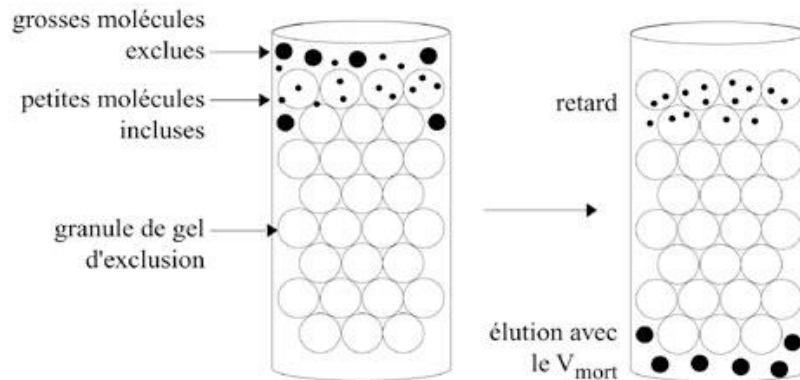


Fig. Schéma du tamisage moléculaire

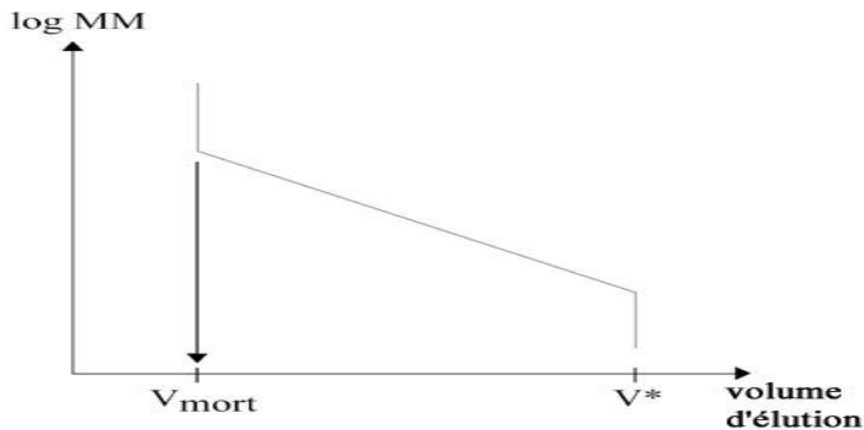


Fig. Variation du volume d'éluion en fonction de la masse moléculaire du soluté au cours d'un tamisage moléculaire

($V_{mort}=V^{\circ}$ est le volume mort de la colonne)

II.3.2.- Étude théorique :

On considère une colonne de volume total V_t et remplie d'un gel solvate. Le volume total est donné par la relation $V_t= V^{\circ}+V_i+V_g$ avec :

V° : le volume vide correspondant au volume d'eau externe aux granules

V_i : le volume d'eau interne et correspond au volume d'eau contenu dans les grains

V_g : le volume du gel matrice

Un soluté sera distribué entre l'eau interne et l'eau externe suivant un coefficient de distribution K_d .

- ☞ si $K_d = 0$, le soluté est totalement exclu.
- ☞ si $0 < K_d < 1$, le soluté est partiellement inclus. Le taux d'inclusion augmente avec K .
- ☞ si $K_d = 1$, valeur théorique correspondant à une inclusion totale d'un composé dans le gel, les molécules diffusent parfaitement dans la phase et sortent en dernier.
- ☞ si $K_d > 1$, le soluté est inclus et adsorbé de surcroit par le gel.

Remarque :

La valeur de K_d est essentiellement déterminée par la géométrie du soluté ; les très grosses molécules ont un coefficient de distribution nul, les très petites ont un K_D compris entre 0,7 et 1.

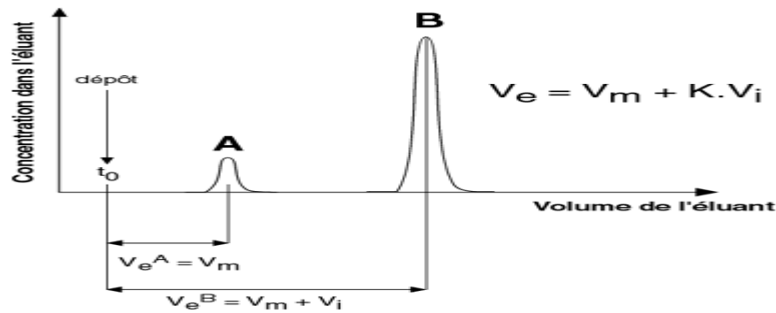


Fig. Présentation d'une séparation entre deux molécules A et B

L'expression générale qui relie le volume d'éluant d'un soluté à son coefficient de distribution est :

$$V_e = V_m + K_d \cdot V_i$$

II.3.3.- Les gels

Un gel est caractérisé par :

- ☞ le gain d'eau
- ☞ le diamètre des pores, exprimé en Å ou en nm
- ☞ la limite d'exclusion, exprimée en g (valeurs établies avec des marqueurs étalonnés)
- ☞ la surface spécifique, en m²/g
- ☞ le diamètre des granules, exprimé en mm ou en mesh (Echelle de granulométrie)

On peut distinguer les gels hydratés et les gels permanents.

☞ **Gels hydratés**

Acquièrent leur porosité après gonflement dans l'eau, on trouve des gels comme le sephadex, faits à partir de polysides bactériens : les dextrans (poly D-glucopyranosyl α, 1-6), les sephadex présentent une grande affinité pour l'eau, ils s'hydratent fortement (fixant jusqu'à 10 fois leur masse d'eau) et gonflent jusqu'à former un réseau, dont le nombre et les dimensions des mailles sont déterminés par les liaisons établies dans l'édifice moléculaire formé par le dextran hydraté.

Les gels polyosidiques sont insolubles dans l'eau et dans les solutions salines, stables dans les solutions alcalines ou faiblement acides, mais hydrolysés par les acides forts. De plus ces gels doivent être protégés d'une hydrolyse enzymatique, consécutive à une contamination bactérienne.

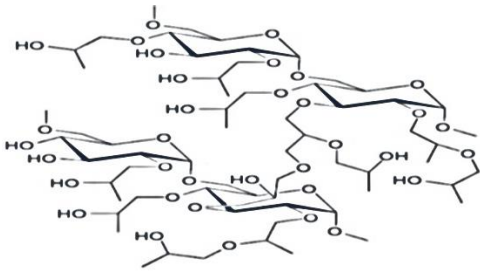


Fig. Gel de Sephadex préparé à base de dextran traités

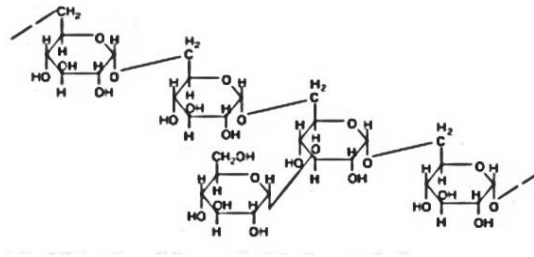


Fig. Molécule de dextran (un polymère ramifié de glucose)

Gels permanents

Ces gels possèdent une structure réticulée, à porosité permanente, ils sont organiques ou minéraux. Ces gels sont stables chimiquement et mécaniquement : ils sont ainsi utilisables en milieux aqueux et non aqueux et supportent les hautes pressions.

Exemples de quelques gels de tamisage moléculaire et du capacité d'exclusion

Nom de la résine	Capacité de fractionnement (en Da)
Gel de dextran	
Sephadex G-10	700
Sephadex G-25	1 000- 5 000
Sephadex G-75	3 000- 70 000
Sephadex G-200	5 000- 800 000
Gel de polyacrylamide	
Bio-gel P2	200- 2 000
Bio-gel P6	1 000- 6 000
Bio-gel P-150	15 000- 150 000
Bio-gel P-300	60 000- 400 000
Gel d'agarose	
Sepharose 2B	2 000 000- 25 000 000
Sepharose 4B	300 000- 3 000 000
Bio-gel A-0,5M	30 000- 500 000
Bio-gel A-15M	30 000- 15 000 000
Bio-gel A-150M	5 000 000- 150 000 000

II.3.4.-Technique du tamisage moléculaire :

La chromatographie d'exclusion est pratiquée sur colonne ou sur couche mince.

Chromatographie sur colonne :

La colonne est remplie du gel préalablement conditionné, le remplissage doit être régulier, puis l'échantillon est déposé avec soin au sommet de la colonne et l'on procède à l'éluion (l'éluant étant placé dans un réservoir prévu à cet effet). La colonne doit totalement être dépourvue de bulles d'air.

Chromatographie sur couche mince :

Le tamisage moléculaire, sur couche mince est une technique plus rapide et plus simple à utiliser que la chromatographie sur colonne, elle présente l'inconvénient d'être une méthode dans laquelle on ne recueille aucune fraction.

II.3.5.- Application de la chromatographie d'exclusion :

- la déminéralisation de solutions protéiques.
- la séparation de peptides, protéines, triglycérides, osides, dispersions de produits organiques,....
- séparation des virus .
- détermination des masses moléculaires de macromolécules.

II.4.- Chromatographie d'affinité :

II.4.1.-Principe

La chromatographie d'affinité est basée sur les interactions entre un ligand, lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase stationnaire (fixe) et son partenaire d'affinité en solution. 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
- ☞ ligand-récepteur
- ☞ antigène-anticorps

Les interactions qui conduisent à la formation du complexe $P + L \rightleftharpoons PL$ sont représentées par une constante de fixation K qui est l'équivalent d'une constante d'équilibre chimique :

$$K = \frac{(P)(L)}{(PL)}$$

Le principe de cette technique consiste à préparer le gel d'affinité, en fixant le ligand sur un support. 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.

Exp

La concanavine A est une protéine de la famille des lectines. Ces dernières sont des protéines capables de se fixer sur des glucides (glucose et mannose) et ce, de façon très spécifique, donc une chromatographie d'affinité dont une résine ayant la capacité de lier la concanavine A, Cette résine devrait donc avoir des groupements mannosyles ou glycosyles.

On peut récupérer la concanavine A en la détachant en faisant percoler sur la résine une solution contenant du glucose (ou du mannose). Cette dernière molécule pourra se lier sur les sites de la con A, ces sites étant saturés, ils ne pourront plus se lier au Sephadex, s'en détacheront et élueront hors du gel.

II.4.2.- La phase stationnaire de la chromatographie d'affinité

Cette phase est constituée d'un effecteur (ligand), fixé par covalence à un support poreux par l'intermédiaire d'une chaîne latérale : le bras fixateur

☞ les supports

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

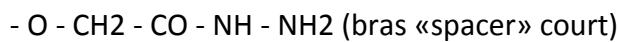
- être insolubles dans l'eau, mais mouillables ;
- être poreux
- être stables chimiquement et mécaniquement
- porter des groupements fonctionnels réactifs permettant la fixation des bras.

Parmi les supports utilisés on distingue :

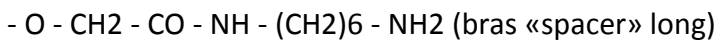
- les dérivés de polymères osidiques : la carboxyméthylcellulose et les sépharoses activées (chaines de dextrans activées par des groupements particulièrement réactifs : bromure de cyanogène) et le gel de polyacrylamide.

Exp :

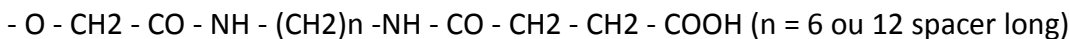
La CM-hydrasidate : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle.



La CM-cellulose aminohexylique : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle.



La CM-cellulose aminohexylique succinylée (n=6) et la CM-cellulose aminododécylique succinylée (n=12) : permettent la fixation d'un effecteur à fonction -NH₂ réactive.



Remarque : la longueur du bras sus penseur est choisie de manière à limiter les contraintes stériques.

☞ Les effecteurs (ligand)

Peuvent être effecteurs toutes les substances capables de former des complexes stables avec les molécules à isoler et possédant, par surcroît un groupement réactif assez éloigné du site actif pour que celui-ci reste librement accessible après la fixation.

Les effecteurs utilisés sont :

- pour la purification des enzymes :
 - ✓ Des substances et analogues de substrats
 - ✓ Des inhibiteurs réversibles
 - ✓ Des effecteurs allostériques
 - ✓ Des coenzymes
- en immunologie :
 - ✓ Des haptènes
 - ✓ Des antigènes.
 - ✓ Des anticorps.
- pour l'étude des protéines réceptrices :
 - ✓ Des hormones.

II.4.3.- Etapes de l'affinité

☞ Préparation de gel de fixation :

Le gel activé est initialement mis en suspension dans un tampon additionné de substances dont le rôle est de protéger la liaison entre le ligand et le support.

☞ Dépôt d'échantillon :

Immédiatement avant la séparation, le gel est lavé et l'échantillon est déposé. La réaction de complexation est faite au sein d'un tampon de pH, le pH correspond à une valeur ne provoquant pas la dénaturation de la protéine et pour laquelle la stabilité du complexe entre effecteur et partenaire est maximale. Le pH et la force ionique sont choisis de manière à éviter les interactions entre le support et les partenaires d'affinité.

☞ **Lavage de la colonne**

Après l'étape de la fixation, les groupements restés libres sont bloqués, puis le complexe partenaire-effecteur fixe est lavés plusieurs fois par des tampons de force ionique définie.

☞ **Elution de la molécule à séparer (désorption)**

Cette étape est réalisée, soit par un tampon de pH différent induisant un changement de conformation de la protéine, soit par un milieu de force ionique donnée, soit par une compétition avec un ligand libre (exp : inhibiteur).

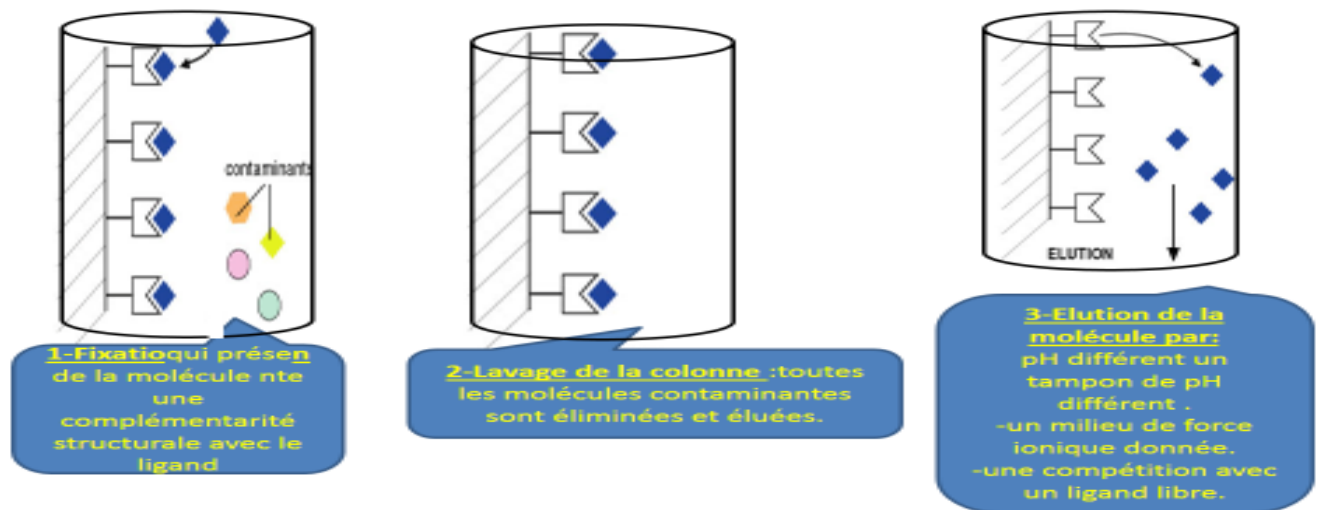
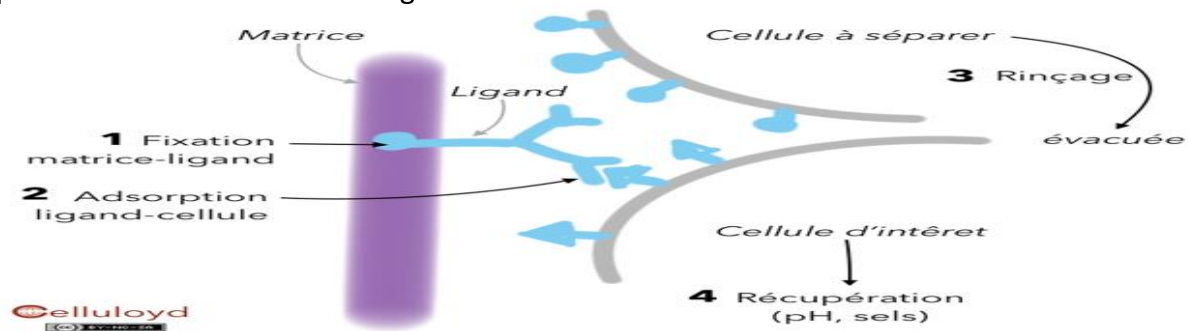


Fig. Étapes d'une chromatographie d'affinité

Exemple d'une séparation des cellules par la c. d'affinité le ligand est un anticorps, le partenaire d'affinité est un antigène fixé sur la cellule.



II.4.4.- 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

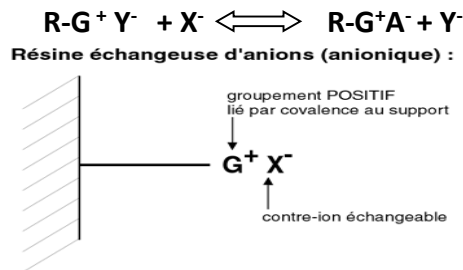
-en chimie des acides nucléiques, pour le fractionnement de divers acides nucléiques (ARNm, ARN ribosomaux,.....).

II.5.- Chromatographie échangeuse d'ions

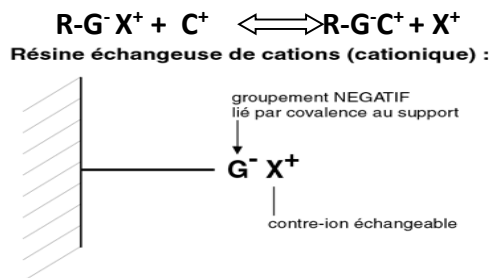
II.5.1.-Principe

La chromatographie sur échangeur d'ions permet la séparation de composantes d'après leur charge ionique intrinsèque. La phase stationnaire est formée d'une matrice possédant des groupements fonctionnels chargés et sur laquelle les particules de la phase mobile pourront être retenues.

Dans l'échange anionique, l'échantillon X^- entre en compétition avec l'ion Y^- présent dans le tampon de la phase mobile pour les sites ioniques R^+ disponibles sur la matrice (résine anionique : qui échange réversiblement des anions).



La réaction inverse se produit évidemment dans l'échange cationique. Les résines cationiques celles qui échangent réversiblement des cations:



L'élu tion, qui se fera à l'aide d'un gradient de force ionique (par exemple une concentration croissante ou décroissante de Y^- , produira une désorption graduelle, et la force de liaison ionique entre les différentes particules X^- de l'échantillon et l'adsorbant R^+ déterminant l'ordre d'élu tion des particules.

II.5.2.-Support :

Les propriétés du support vont conditionner les propriétés mécaniques et chimiques de l'échangeur d'ions, ainsi la porosité déterminera l'accessibilité des solutés de l'échantillon aux groupements fonctionnels.

Le support peut être minéral, mais il est le plus souvent organique, constitué soit d'une résine de copolymérisation, soit de polyosides (dextrans ou celluloses).

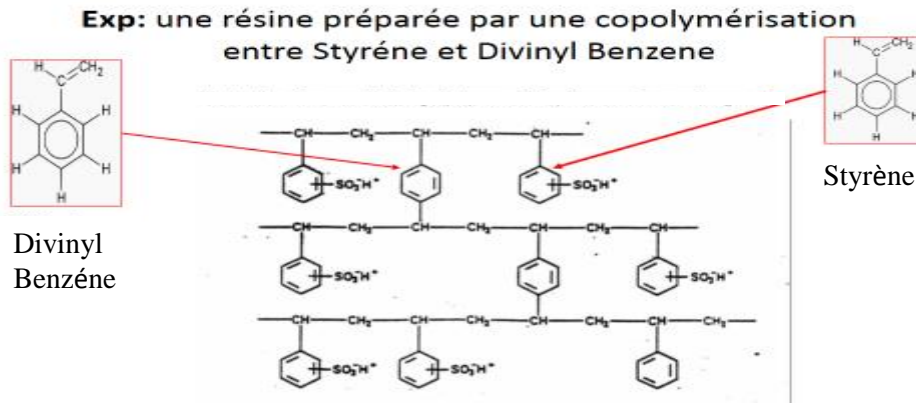


Fig. Réseau d'un copolymère DVB-styrène

Une résine dans la chromatographie échangeuse d'ion se caractérise par le pontage et la dimension des pores :

- ☞ **Le pontage** : Dans le cas d'une résine à base de DVB-styrène c'est le divinylbenzène qui crée la réticulation du polymère ; le nombre de ponts varie en changeant le rapport DVB/ styrène appelé taux de pontage. Ce rapport varie de 1 à 30%.
- ☞ **La dimension des pores** : Dépend du taux de pontage. Leur diamètre varie de 5 à 3,5nm, il est d'autant plus petit que le taux de pontage est grand. Pour de petits ions on choisit un taux de pontage de 8 à 10% et pour les ions importants un taux de 1 % à 4%.

II.5.3.- groupements fonctionnels des résines :

Les groupements fonctionnels chargés sont fixés par covalence sur le support :

☞ **résines cationiques :**

D'après leurs aptitudes à l'ionisation, ces résines sont classées en :

Type de la résine cationique	caractéristiques	Différents types
Résine cationiques fortes	sulfoniques (très fortement ionisées, quel que soit le pH)	Résine sous forme acide : Résine-SO ³⁻ / H ⁺ (contre-ion : H ⁺)
		Résine sous forme sodique : Résine-SO ³⁻ / Na ⁺ (contre-ion : Na ⁺)
Résines cationiques faibles	non ionisées en milieu fortement acide	Résine sous forme acide : Résine-COO ⁻ H ⁺
		Résine sous forme sodique : Résine-COO ⁻ Na ⁺
Résines cationiques très faibles	Exp :Phénoliques (uniquement ionisées en milieu alcalin)	Résine sous forme acide : Résine-O ⁻ / H ⁺
		Résine sous forme sodique : Résine-O ⁻ / Na ⁺

☞ **Résines anioniques :**

Ces résines sont également classées en :

Type de la résine anionique	Différents types
Résine anioniques fortes	sulfoniques (résines à groupement aminés quaternaires) Exp : résine sous forme chlorure résine sous forme basique
	résines à groupement aminés tertiaires.
Résines anioniques faibles	résines à groupement aminés secondaires et primaires.

II.5.4.- Etapes d'une chromatographie sur échangeur d'ions :

☞ Préparation et remplissage de la colonne :

La résine est mise en suspension dans le tampon de développement, la colonne est remplie sans fissures ni bulles.

☞ Etape de fixation :

Après avoir déposé le mélange à analyser, on règle la vitesse d'écoulement. Elle est généralement exprimée en gouttes. min⁻¹ ou en ml. min⁻¹.

☞ Elution :

L'éluion consiste à déplacer l'ion fixé par un autre, de densité de charge et de concentration plus élevées, il existe également une éluion par gradient soit de pH ou de force ionique.

II.5.5.- Techniques expérimentales :

La réaction d'échange d'ion peut être appliquée sur colonne ou en batch

☞ Chromatographie sur colonne.

☞ Technique en batch (procédé en cuve) : l'échantillon à séparer est mis au contact de l'échangeur dans un récipient, sous agitation. Cette technique est utilisée pour des purifications pratiquées à grande échelle.

II.5.6.-Applications de la chromatographie par échanges d'ions :

- élimination sélective d'éléments divers.
- analyse et séparation de sels minéraux (Traitement d'eau,...).
- séparation d'acides aminés, de protéines, enzymes.
- purification des glucides ionisés (Déminéralisation des jus, Décoloration de sirops).
- de nucléotides, d'acides nucléiques, de lipides ionisés.

III.- Chromatographie liquide en haute pression

III.1.- Chromatographie liquide haute performance HPLC/CLHP

La chromatographie liquide haute performance, utilisée en routine depuis 1975 a réduit en moyenne de 10 fois le temps nécessaire à l'analyse de nombreux composés biochimiques. Gain de temps et haut pouvoir de résolution sont les maitres mots de cette technique.

III.1.1.-Principe :

L'HPLC n'est pas un principe en soi, chaque type de support permet de réaliser une chromatographie dont le principe est déjà connu et appliqué en pression ambiante : adsorption, exclusion-diffusion, ionique, phase inversée.....

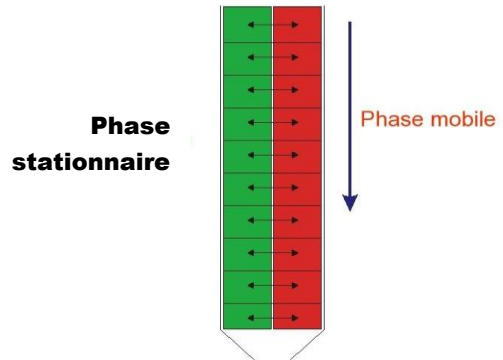
La haute performance est due à l'utilisation en HPLC de particules de granulométrie fine et de grande résistance mécanique. Dans ces conditions, la phase liquide mobile percole sous pression.

Cette méthode se distingue des systèmes classiques par :

- ☞ une augmentation de la vitesse d'échange entre phase solide et liquide.
- ☞ Un accroissement du nombre des plateaux théoriques.

III.1.2.-Notion de plateaux théoriques :

On peut considérer la colonne de chromatographie comme une colonne de distillation, constituée de « plateaux théoriques ». Au niveau de chaque plateau, l'équilibre est réalisé entre les deux phases. Il y a échange de matière horizontalement, jusqu'à ce que $K_A = [A]_{stat} / [A]_{mob}$ soit atteint. Il n'y a pas d'échange vertical.



III.1.3.- 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 inox, 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.

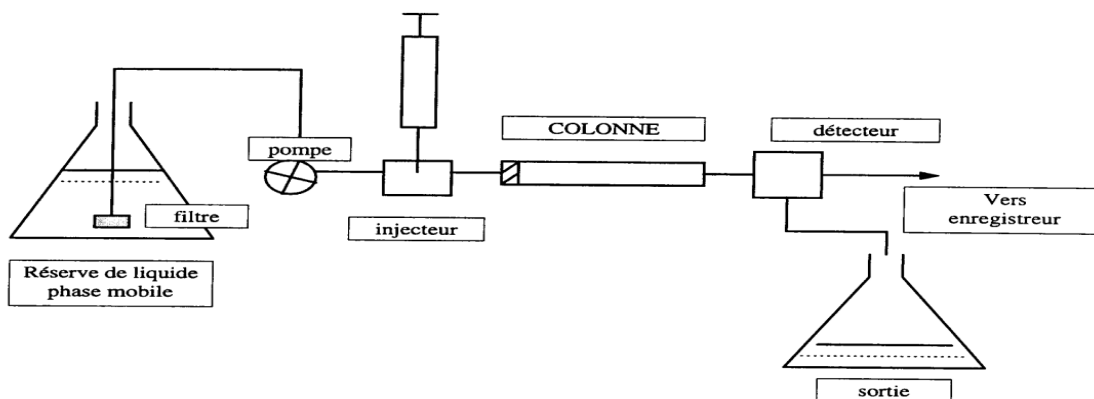


Fig. Schéma simplifié d'un HPLC à élution isocratique

III.1.3.1.-Réservoir de phase mobile

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

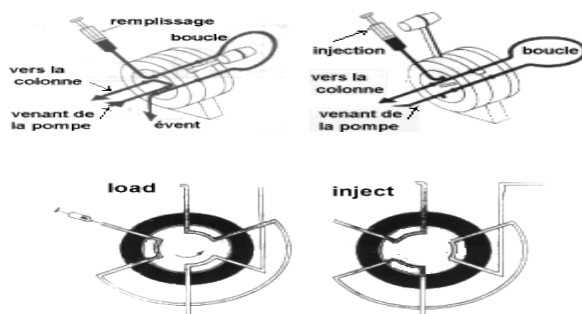
III.1.3.2.-Système de pompage La pompe est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler :

- 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.

III.1.3.3.-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 rhéodyne, la boucle d'injection (capacité de 5 à 5000µl) est remplie dans un premier temps, puis dans un deuxième temps en tournant la vanne on procède à l'injection dans de bonnes conditions, il convient :

- ☞ de ne pas surcharger la colonne (si l'échantillon est trop important on aboutit à des pics très larges et des phénomènes de traîne, ce qui diminue le pouvoir de résolution de la chromatographie)
- ☞ d'injecter très rapidement.



1-Remplissage de la boucle

2-Injection dans la colonne

Fig. Vanne d'injection à boucle

III.1.3.4.-Colonnes

Les colonnes de HPLC sont usuellement en acier inoxydable. La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 µm. La colonne est souvent précédé pour augmenter sa durée de vie, d'une précolonne dite colonne de garde, courte de 1cm, qui retient les composés indésirables. On change périodiquement cette précolonne, bien qu'il soit par ailleurs conseillé de faire passer les échantillons avant analyse à travers un filtre de porosité inférieure à 0,5µm.

III.1.3.5.-Détecteurs Le détecteur a pour but de fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de composition de l'eluat en sortie de colonne ce qui permet de détecter le passage des composés successifs, les plus utilisés en HPLC :

III.1.3.5.1.-Spectrophotomètre UV-Visible La réponse de ce type de détecteur est fondée sur la loi de Beer-Lambert $D_o = \epsilon C l$

- les détecteurs à longueur d'onde fixe. La longueur d'onde de 254 nm a été fixée par l'utilisation de la lampe à vapeur de mercure, qui a une raie d'émission maximale à 253,7 nm. Ceci a permis

la construction de détecteurs de grande sensibilité, extrêmement stables et très utiles, car la plupart des composés organiques présentent une absorption dans l'U.V. au voisinage de 254 nm. - Les détecteurs à longueur d'onde variable ; les détecteurs à longueur d'onde variable sont utiles lorsque le maximum de sensibilité correspond à une longueur d'onde autre que 254 nm. – Les détecteurs à barrette de diodes. L'utilisation du principe de la diode photoélectrique en tant que récepteur dans un spectrophotomètre est réservée au montage de type multicanal, sous forme de barrette de diodes. Une barrette de diodes de quelques mm contient plusieurs centaines de diodes, chacune reçoit le rayonnement contenu dans un petit domaine spectral. Chacun des circuits élémentaires est exploré par un système pilote : par un micro-ordinateur. Ce système permet l'acquisition du spectre de l'échantillon en temps réel, une représentation en 3 dimensions (temps, absorbance, longueur d'onde) et une caractérisation des composés par leur spectre. Détecteur à barrette de diodes

III.1.3.5.2.-Détecteur à fluorescence La fluorescence est le rayonnement émis par des composés comportant certains groupements fonctionnels, lorsqu'ils sont excités par une radiation lumineuse. Le rendement de la fluorescence est fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

Certains composés présentent une fluorescence naturelle ; si tel n'est pas le cas, il est souvent possible d'obtenir au niveau du détecteur des dérivés fortement fluorescents en faisant agir avant la séparation chromatographique des réactifs appropriés sur les composés de l'échantillon ne présentant aucune fluorescence.

III.1.3.5.3.-Détecteur réfractométrique Le réfractomètre mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice. Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur. Il existe d'autres types de Détecteurs par exemple :

- Détecteur conductimétrique (utilisable pour les substances chargées)
- Détecteur à mesure de radioactivité...

III.1.3.6.-Phase mobile

Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement pour la CLHP; ils doivent être dégazés afin de ne pas introduire de bulles d'air dans la colonne de dégazage. Le dégazage est effectué par ultra sons ou par barbotage d'un gaz inerte chimiquement par exemple azote, argon, hélium..

Ainsi malgré la haute qualité des solvants, la filtration sur filtre spécial (0,4 µm) est recommandée.

III.1.3.7.-Phase stationnaire

Les phases stationnaires en CLHP sont très variées:

- ✓ **HPLC d'adsorption** : La phase stationnaire est constituée d'un solide polaire et adsorbant : silice non greffée, silice greffée polaire....., la phase mobile est un éluant isocratique apolaire ou un gradient de polarité.
- ✓ **HPLC phase inversée** : La phase stationnaire est un solide apolaire, c'est une silice greffée apolaire, par exemple une silice greffée 18 carbones.
- ✓ **HPLC d'exclusion** : La phase stationnaire est un solide poreux, silice poreuse à groupements silanols bloqués ou supports organiques, polymères réticulés. La phase mobile est un éluant isocratique inerte.
- ✓ **HPLC ionique** :

La phase stationnaire est une silice greffée chargée ou un support acrylique chargé. La phase mobile est un gradient de pH ou de force ionique.

III.1.4.-Application :

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, puisque l'opération s'effectue à T° ambiante.

- l'analyse de substances peu volatiles.

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

III.2.-Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les premières véritables expériences de CPG ont été réalisées par Martin et James en 1951 sur les acides gras de faible masse moléculaire. La séparation se faisant par partage et la méthode a été décrite par Martin et ses collaborateurs comme de la chromatographie de partage gaz-liquide. Cette technique d'analyse est à l'heure actuelle l'une des plus utiles et des plus répandues dans les laboratoires de chimie analytique et biochimie, elle a été perfectionnée et permet maintenant de séparer les constituants de mélange très complexes contenant jusqu'à 200 composés analogues, pour des échantillons très réduits.

III.2.1.-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'adsorbalité.

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 se partage entre le gaz vecteur et le liquide stationnaire.

III.2.2.-Appareillage

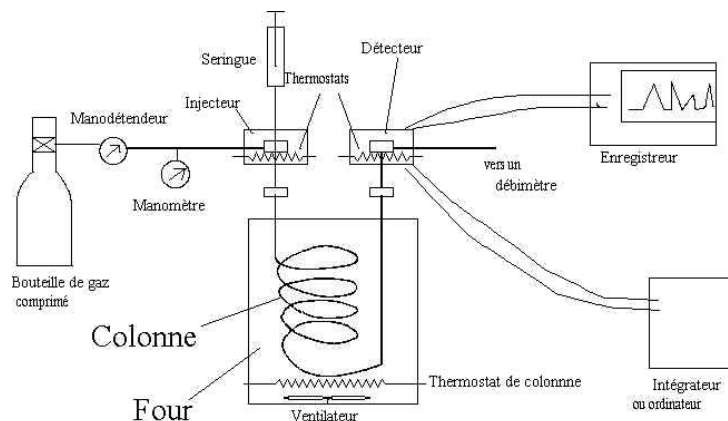


Fig. Schéma d'un Chromatographe en phase gazeuse

III.2.2.1.-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.

III.2.2.2.-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 chromatographiés.
- 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 alditoles, puis acétylés....

III.2.2.3.-La 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 sont métalliques, en plastiques (pour des séparations à basse température), en verre et joints téflon lorsque le métal des colonnes risque de provoquer une décomposition catalytique de l'échantillon analysé. Diverses formes ont été utilisées : rectilignes, en spirales, cette dernière est la plus employée car elle permet de limiter l'encombrement de l'appareil.

En CPG d'adsorption on utilise des colonnes de 1m de long et de 3mm de diamètre. En CPG de partage on travaille avec des colonnes pouvant atteindre 5m. On peut distinguer deux types de colonnes :

- ✓ **Les colonnes remplies (classiques):** constituées de tubes ayant jusqu'à 5m de long, de 2 à 4mm 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.

✓ Choix de la phase stationnaire :

En CPG gaz-solide, les adsorbants gel de silice, alumine,...peuvent subir différents traitements, afin de modifier leur pouvoir adsorbant.

En CPG gaz-liquide, la phase stationnaire est un support inerte imprégné d'un liquide. Le liquide est un hydrocarbure, un silicone, un ester, un polyol, caractérisé par sa température d'utilisation et sa polarité.

III.2.2.4.-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.

✓ **Détecteur à ionisation de flammes :**

C'est un détecteur à une voie, très sensible, le gaz vecteur, en sortie de colonne est mélangé à de l'hydrogène, puis brûle entre deux électrodes ; il s'établit un courant entre les électrodes dû à l'ionisation de la flamme. Ce courant est constant lorsque le gaz vecteur est pur et le scripteur de l'enregistreur trace une ligne de base. Si un soluté organique accompagne le gaz vecteur, sa combustion modifie l'intensité du courant et cette variation est enregistrée sous forme d'un pic.

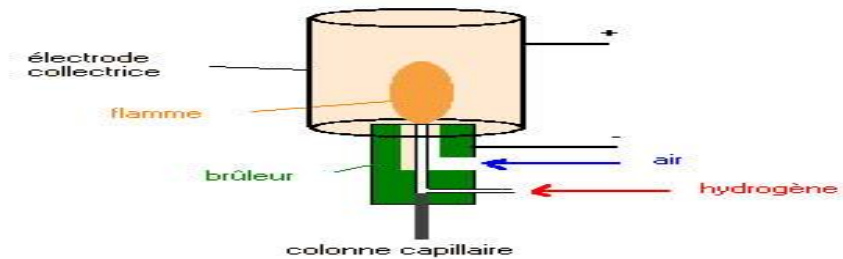


Fig. Détecteur à ionisation de flammes

✓ **Détecteur à capture d'électrons:**

Une source d'électrons est disposée en sortie de colonne. Lorsqu'une molécule est frappée par le flux d'électrons, elle prend une charge négative lorsqu'elle est capable de fixer un ou plusieurs électrons.

L'anion, ainsi formé, est attiré alors par une anode, créant un courant qui sera amplifié et enregistré.

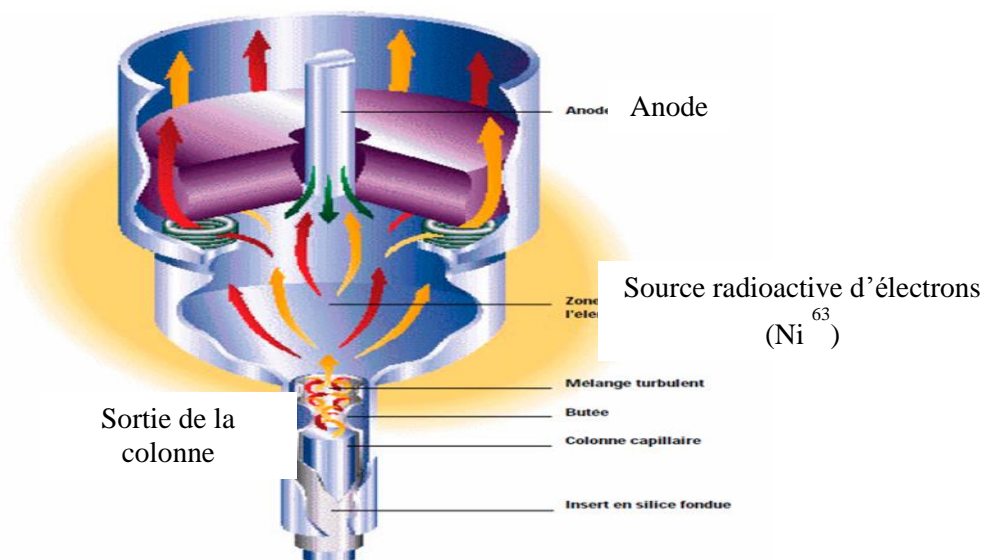


Fig. Détecteur à capture d'électrons

✓ **Détecteur à catharomètre:**

Un catharomètre est une cellule de conductivité thermique, à réponse universelle, mais relativement peu sensible. Il est fondé sur une comparaison continue entre le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur pur et le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur chargé des molécules de soluté.

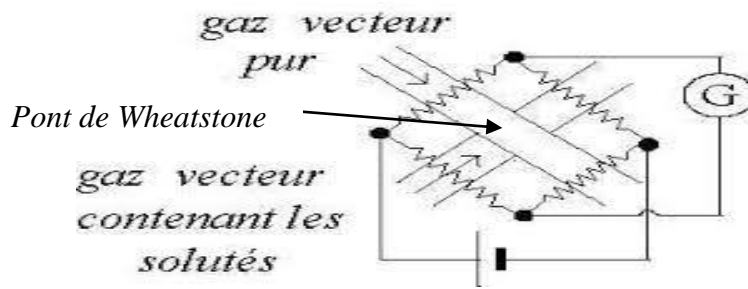


Fig. Détecteur à catharomètre:

III.2.3.-Application :

- détection des traces (toxicologie, la répression des fraudes,...)
- dosages en biologie (stéroïdes, acides gras, oses...)
- microbiologie (analyse des produits de fermentation, taxonomie...)

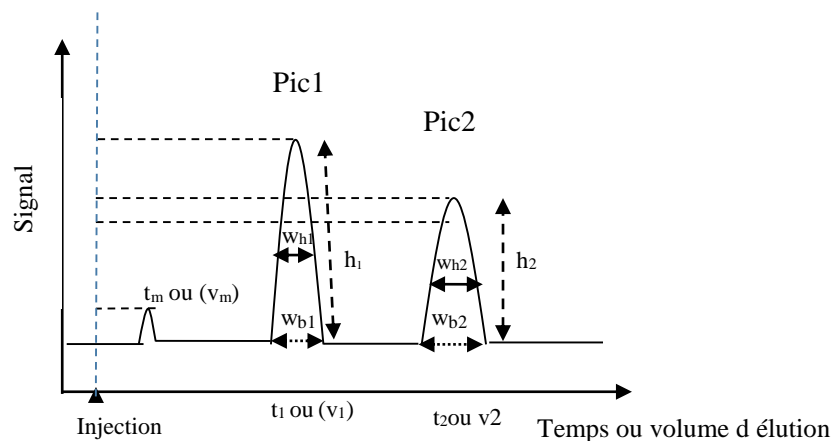
VI.- Analyse qualitative des donnés :

Il existe une grande analogie entre le tracé des pics que l'on obtient en HPLC et en CPG, un système d'acquisition et de traitement de données détermine les temps d'émergence et calcule l'aire des pics.

La représentation graphique de l'éluion d'un composé, exprimée en concentration en fonction du temps, ou en concentration en fonction du volume de l'effluent est une courbe de distribution typiquement gaussienne.

La relation entre le temps de rétention et le volume de rétention aussi appelé volume d'éluion est donné par la relation suivante:

$$V \text{ (volume d'éluion)} = D \text{ (débit)} \times t \text{ (temps)}$$



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

t° = temps mort= V° / D

$t-t^{\circ}$ = temps de rétention réduit

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

$V-V^{\circ}$ = volume de rétention réduit

W_b = largeur du pic à la base

W_h = largeur du pic à mi hauteur

h = hauteur du pic.

✓ **Coefficient de distribution K:**

C'est un facteur qui détermine le taux de distribution du composé entre la phase mobile et la phase fixe :

$$K = \frac{(V - V_0)}{V_s}$$

V_s : est le volume de la phase stationnaire.

Ainsi le facteur de capacité ou de rétention K' est donné par la relation

$$K' = \frac{(V - V_0)}{V_0} = \frac{(t - t_0)}{t_0}$$

C'est la capacité de la colonne à retenir une substance, plus K' est élevé plus le composé est retenu.

✓ **Coefficient de sélectivité α (facteur de sélectivité):**

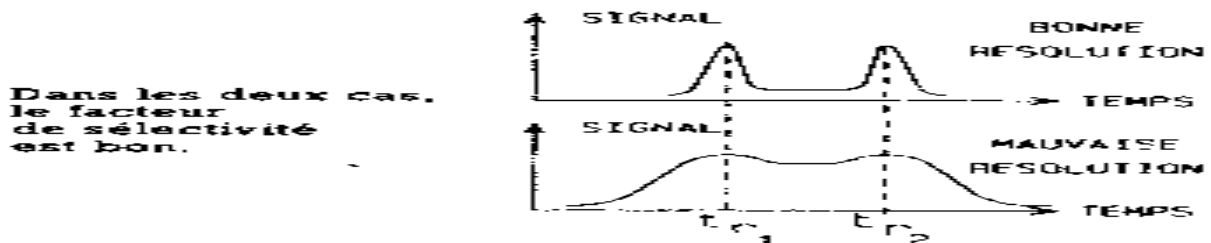
Il rend compte de l'efficacité de la séparation de deux pics voisins.

$$\alpha = \frac{(V_2 - V_0)}{(V_1 - V_0)} = \frac{k'2}{k'1}$$

✓ **Coefficient de résolution :**

Le coefficient de sélectivité ne prend pas en compte la largeur des pics, aussi définit-on le coefficient de résolution de 2 pics voisins (R) comme le rapport entre les volumes de rétention des 2 pics et la moyenne des largeurs à la base des pics :

$$R = \frac{(tr_2 - tr_1)}{\frac{1}{2}(Wb_1 + Wb_2)} = 1,177 \frac{(tr_2 - tr_1)}{(Wh_1 + Wh_2)}$$



FACTEUR DE RÉSOLUTION $R_s = 2 \frac{tr_2 - tr_1}{W_1 + W_2}$

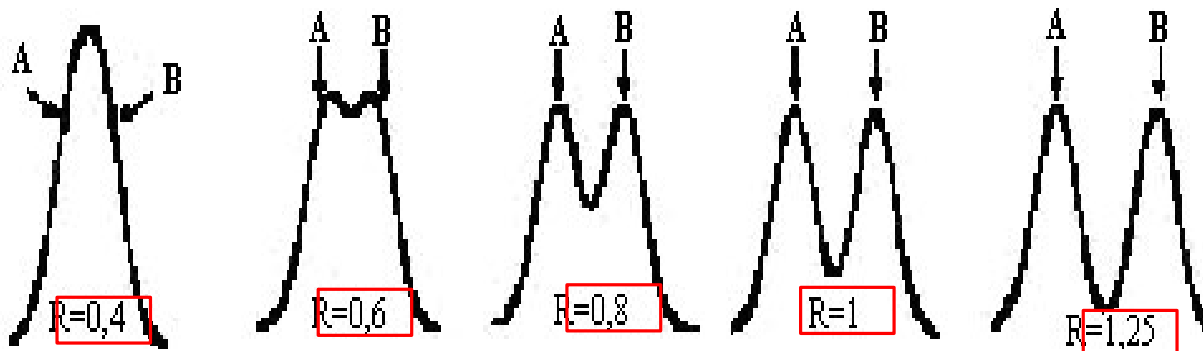


Fig. Relation entre l'allure général des pics et la valeur de R

✓ **Nombre de plateaux théoriques N :**

L'efficacité d'une colonne est évaluée par son nombre de plateaux théoriques (N):

$$N = \frac{16(tr^2)}{(Wb^2)} = \frac{5,54(tr^2)}{(Wh^2)}$$



Fig. Relation entre l'allure générale des pics et la valeur de N

Remarque : dans cette relation le rapport $(tr)^2/(W_i)^2$ est constant quel que soit le pic, car lorsque le volume de rétention (V_i) augmente, la largeur à la base (W_i) augmente également.

✓ **Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT):**

Dépend du soluté et des conditions opératoires, la longueur de la colonne (L) et le nombre de plateaux théoriques (N) selon l'équation :

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

Références bibliographiques :

ARNAUD P.- Chimie organique, Ed. Dunod, 709p.

AUDIGIE C., DUPONT G., ZONZAIN F.- Principes des méthodes d'analyses biochimique, Tome 1, Ed. Doin, 172 p.

AZZOUZ F., MEBARKI-SENNOUR K., BENMOHAMED-BOUAZZA., BENNOUNA F.-Contrôle de la qualité et analyse, OPU, 159p.

BOUCHAGRA T., Analyse instrumentale en biochimie, OPU, 107p.

ROUESSAC F., ROUESSAC A.- Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales, Ed. Dunod, 511p.

-Site web :

www.123bio.net.