

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Akli Mohand Oulhadj –Bouira

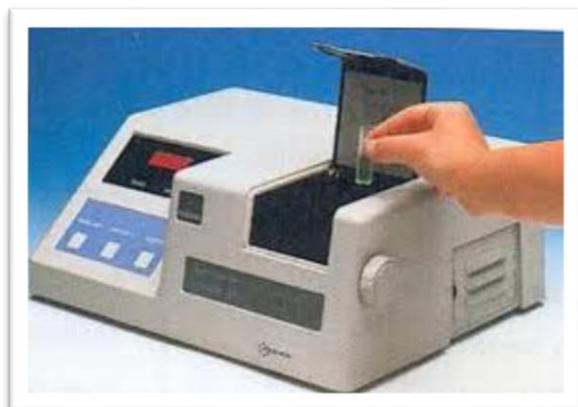
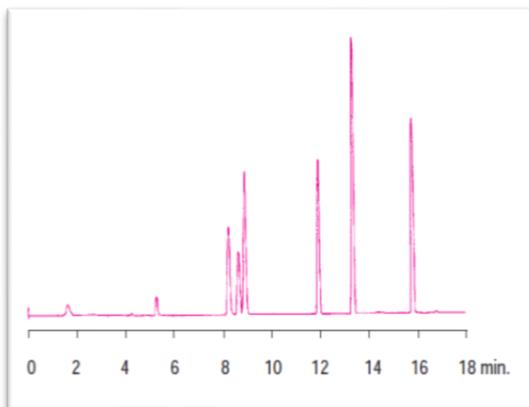
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre

Département de Biologie

**Cours pédagogique au profit des étudiants de Licence en Biochimie Du
département Biologie.**

Techniques d'Analyses Biochimiques

Dr. SAIT-DIB Sabrina



Préambule

Les différents procédés de séparation et spectrochimiques constituent la base de l'analyse instrumentale et leur application est largement répandue en industrie, en chimie, en biochimie et dans les domaines de l'environnement et de l'enseignement des sciences. Ces techniques sont basées sur les principes de chimie. Ainsi, tout au long de ce module, nous étudierons les principes sur lesquels ces techniques s'appuient et acquerrons les habiletés nécessaires à l'utilisation de ces techniques.

La séparation des mélanges permet d'isoler ou de séparer certains constituants des mélanges dans lesquels ils se trouvent.

Il est souvent nécessaire, pour obtenir une substance pure, de la séparer de toutes les autres substances qui l'accompagnent. On peut séparer les mélanges par des moyens physiques, qui seront traités dans le présent manuscrit. Le choix de la technique varie en fonction du mélange, de la substance que l'on doit séparer du reste du mélange et des phases qui constituent le mélange.

L'objectif de ce manuscrit est de fournir une large base de connaissance basée sur les méthodes les plus souvent rencontrées actuellement en analyse chimique, qualitative, quantitative et structurale, dans des secteurs aussi variés que constituent les industries chimiques, pharmaceutiques, agroalimentaires, ainsi que ceux de l'environnement et des réglementations diverses.

Les méthodes passées en revue dans Ce manuscrit sont classées en *méthodes de purification et séparatives*, *méthodes spectrales*. Chacune d'elles fait l'objet d'une étude qui s'appuie sur les idées de base pour se prolonger par les principales techniques instrumentales correspondantes. L'ensemble est illustré de photographies, de nombreux dessins et schémas de principe, dont beaucoup s'inspirent d'instruments réels et de documents obtenus auprès des constructeurs.

Table des matières

Chapitre I : Méthodes de dosage par spectrophotométrie

| | |
|--|----|
| I. Spectroscopie d'absorption dans l'uv-visible | 01 |
| I.1. Domaine spectral | 01 |
| I.2. Principe | 01 |
| I.3. Loi d'absorption de la lumière " Loi de beer-lambert" | 01 |
| I.4. Allure d'un spectre d'absorption | 02 |
| I.5. Règles de sélection | 03 |
| I.6. Types de transitions électroniques | 04 |
| I.7. Effet de l'environnement sur les transitions | 05 |
| I.7.1. Terminologie..... | 05 |
| I.7.2. Effet de la substitution | 06 |
| I.7.3. Effet de la conjugaison..... | 06 |
| I.7.4. Effet de solvant..... | 07 |
| I.8. Techniques expérimentales | 07 |
| I.8.1. Appareillage..... | 07 |
| I.9. Echantillonnage | 09 |
| I.9.1. Solvants..... | 09 |
| I.10. Cellules..... | 10 |
| I.11. Applications de la spectroscopie UV-Visible..... | 10 |
| I.11.1. Analyse qualitative..... | 10 |
| I.11.2. Analyse quantitative..... | 10 |
| I.11.3. Autres applications..... | 10 |

Chapitre II : Technique de purification et de séparation

| | |
|---|----|
| II. La chromatographie | 11 |
| II.1 Historique | 11 |
| II.2. Définition | 11 |
| II.3. Principe | 12 |
| II.4. Classification des méthodes chromatographiques..... | 12 |
| II.4.1. Classification selon la nature des phases | 13 |
| II.4.2. Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu..... | 13 |
| II.4.3. Classification selon la technique mise en jeu..... | 14 |

| | |
|--|----|
| II.5. Principe de séparation sur colonne..... | 14 |
| II.6 Théorie de base - Grandeurs fondamentales..... | 16 |
| II.6.1. Chromatogramme..... | 16 |
| II.6.2. Elution..... | 16 |
| II.6.3. Eluant | 16 |
| II.6.4. Eluat..... | 16 |
| II.6.5. Grandeurs de rétention..... | 16 |
| II.6.5.1. Le temps mort..... | 16 |
| II.6.5.2. Le temps de rétention..... | 16 |
| II.6.5.3. Le temps de rétention réduit..... | 16 |
| II.6.5.4. Le Volume d'élution ou volume de rétention V_R | 17 |
| II.6.5.5. Le volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort V_M)..... | 17 |
| II.6.5.6. Le volume de la phase stationnaire..... | 17 |
| II.7. Notion de concentration..... | 17 |
| II.7.1 Coefficient de partage..... | 17 |
| II.7.2 Facteur de rétention K' (ou de capacité)..... | 18 |
| II.7.3 Le facteur de sélectivité (Séparation)..... | 19 |
| II.8 Notion d'efficacité..... | 19 |
| II.8.1 Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)..... | 19 |
| II.8.2 Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)..... | 21 |
| II.8.3 Hauteur de plateau (Hauteur équivalent à un plateau théorique)..... | 21 |
| II.9. Résolution | 22 |
| II.10. Influence de la vitesse de la phase mobile..... | 23 |
| II.10.1. Équation de Van Deemter..... | 23 |
| III. Les différents types de chromatographie..... | 26 |
| III.1. Chromatographie échangeuse d'ions..... | 26 |
| III.1.1. Généralités..... | 26 |
| III.1.2. Principe de la Chromatographie échangeuse d'ions..... | 27 |
| III.1.3 Les différents types d'échangeurs..... | 28 |

| | |
|--|----|
| III.1.3.1 Groupements fonctionnels..... | 28 |
| III.1.3.2 Support..... | 30 |
| III.1.4 La phase mobile..... | 31 |
| III.1.5 Influence du type et de la concentration en contre-ion..... | 32 |
| III.1.6 Effet de la température et de solvants organiques..... | 32 |
| III.1.7 Choix du type d'échangeur d'ions en fonction du pHi de la protéine à séparer et du pH du tampon..... | 32 |
| III.1.8 Détecteurs à conductivité..... | 33 |
| III.1.9 Conduite d'une séparation en C.E.I..... | 33 |
| III.1.10 Applications..... | 34 |
| III.2 Chromatographie d'exclusion stérique..... | 34 |
| III.2.1 Principe de la Chromatographie d'exclusion stérique..... | 34 |
| III.2.2 Théorie de la chromatographie d'exclusion..... | 35 |
| III.2.3 Phase stationnaire..... | 37 |
| III.2.3.1 Les principaux gels de filtration..... | 38 |
| III.2.3.2 Les caractéristiques des gels de la chromatographie..... | 39 |
| III.2.4 Phase mobile..... | 40 |
| III.2.5 Détection..... | 40 |
| III.2.6 Les étapes de la chromatographie d'exclusion..... | 40 |
| III.2.7 La détermination de la masse moléculaire d'une molécule..... | 40 |
| III.2.8 Les applications de la chromatographie d'exclusion..... | 42 |
| III.3 La chromatographie en couche mince..... | 42 |
| III.3.1 Principe..... | 43 |
| III.3.2 Réalisation de la chromatographie..... | 43 |
| III.3.2.1 Préparation de la cuve..... | 43 |
| III.3.2.2 Dépôt de l'échantillon..... | 44 |
| III.3.2.3 Préparation de la plaque et l'élution..... | 44 |
| III.3.2.4 Révélation du chromatogramme..... | 44 |
| III.3.2.5 Quantification..... | 45 |
| III.3.3 Paramètre de séparation..... | 45 |
| III.3.3.1 Rapport frontal..... | 45 |
| III.3.3.2 Nombre de plateaux théoriques..... | 46 |

| | |
|---|----|
| III.3.3.3 Facteur de rétention..... | 46 |
| III.3.3.4 Résolution..... | 46 |
| III.3.4 Application de la chromatographie sur couche mince..... | 47 |
| III.4 Chromatographie en phase gazeuse..... | 47 |
| III.4.1Principe d'une installation de CPG..... | 48 |
| III.4.2 Quels sont les facteurs de séparation des analytes en CPG ?..... | 49 |
| III.4.3 Gaz vecteur..... | 50 |
| III.4.4 Échantillons..... | 50 |
| III.4.5 Injecteur..... | 51 |
| III.4.5.1 Injecteur à vaporisation directe..... | 51 |
| III.4.5.2 Injecteur avec ou sans division..... | 52 |
| III.4.6 Four..... | 52 |
| III.4.7 Colonnes..... | 52 |
| III.4.7.1 Les Colonne remplie..... | 52 |
| Les colonnes capillaires..... | 52 |
| III.4.8 Phases stationnaires..... | 53 |
| III.4.9 Les systèmes de détecteurs..... | 53 |
| III.4.9.1 Détecteur à conductibilité thermique (TCD) ou catharomètre..... | 53 |
| III.4.9.2 Détecteur à ionisation de flamme (DIF)..... | 54 |
| III.4.9.3 Détecteur thermoionique (NPD)..... | 54 |
| III.4.9.4 Détecteur à capture d'électrons (ECD)..... | 55 |
| III.4.9.5 Détecteur à photo-ionisation (PID)..... | 55 |
| III.4.9.6 Détecteur à émission atomique..... | 55 |
| III.4.9.7 Détecteur de masse..... | 55 |
| III.4.10 Applications..... | 56 |
| III.5 Chromatographie liquide à haute performance..... | 56 |
| III.5.1 Appareillage..... | 56 |
| III.5.2 Etude détaillée des éléments d'un appareil HPLC..... | 57 |
| III.5.2.1 Réservoir de solvant (éluant)..... | 57 |
| III.5.2.2 Dispositif de dégazage..... | 57 |
| III.5.2.3 Pompes pour éluants..... | 58 |
| III.5.2.4 Injecteurs..... | 59 |
| III.5.2.5 Colonne..... | 60 |

| | |
|---|----|
| III.5.2.6 Phase stationnaire..... | 60 |
| III.5.2.7 Phase mobile..... | 62 |
| III.5.2.8 Détecteurs..... | 63 |
| III.5.3 Applications..... | 64 |
| | |
| IV. Electrophorèse..... | 65 |
| IV.1. Electrophorèse capillaire | 66 |
| IV.1.1. Principe..... | 67 |
| IV.1.2. La mobilité..... | 67 |
| IV.1.2.1 Mobilité électrophorétique (μ_e)..... | 68 |
| IV.1.2.2 Mobilité électro-osmotique — électro-osmose (μ_{eos})..... | 68 |
| IV.1.2.3 Mobilité apparente (μ_{app})..... | 69 |
| IV.1.3. Facteurs affectant la mobilité des molécules..... | 70 |
| | |
| IV.2. Types de supports..... | 71 |
| IV.3. Les différents types d'électrophorèse..... | 71 |
| IV.3.1 Électrophorèse sur papier..... | 71 |
| IV.3.2 Électrophorèse sur gel..... | 73 |
| IV.3.2.1 Électrophorèse sur gel d'agarose..... | 73 |
| IV.3.2.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)..... | 74 |
| IV.3.2.2.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide native..... | 75 |
| IV.3.2.2.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide -SDS (SDS-PAGE)..... | 76 |
| IV.3.3 Isoélectrofocalisation..... | 80 |
| IV.3.4 Electrophorèse bidimensionnelle..... | 82 |

I. Spectroscopie d'absorption dans l'UV-visible

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

I.1 Domaine spectral

Le domaine UV-visible s'étend environ de 800 à 10 nm.

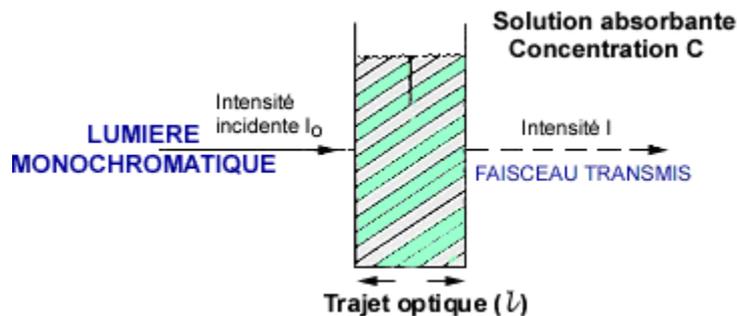
- visible : 800 nm (rouge) - 400 nm (indigo)
- proche-UV : 400 nm - 200 nm
- UV-lointain : 200 nm - 10 nm.

I.2 Principe

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à 665 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des **transitions électroniques** entre les différents niveaux d'énergie des molécules.

I.3 Loi d'absorption de la lumière " Loi de Beer-Lambert"

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l.



Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre I_0 et I : **l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle :**

$$I = I_0 e^{-klC}$$

* I_0 est l'intensité de la lumière incidente.

* I est l'intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise).

* l est la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)

* C est la concentration des espèces absorbantes

* k est une constante caractéristique de l'échantillon.

Cette équation peut se réécrire $\log(I_0/I) = klc/2.3 = e l C$.

* $\log(I_0/I)$ est appelé **absorbance (A)**

* $I/I_0 = T$ est la **transmission**

* **% T** est la **transmittance**

* e est le **coefficient d'extinction molaire** ; c'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C est la molarité, e est en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$. On obtient alors la relation connue sous le nom de **loi de Beer-Lambert** :

$$A = -\log T = e l C$$

✓ Validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert s'applique pour des radiations monochromatiques et sa validité est bonne lorsqu'on travaille avec des solutions suffisamment diluées pour ne pas modifier les propriétés des molécules (association, complexation ...).

I.4 Allure d'un spectre d'absorption

L'ordonnée peut être A , T , ϵ ou $\log \epsilon$. L'abscisse est la longueur d'onde ou moins souvent le nombre d'onde. Le spectre présente très peu de bandes comparativement au spectre IR mais leur allure est beaucoup plus large.

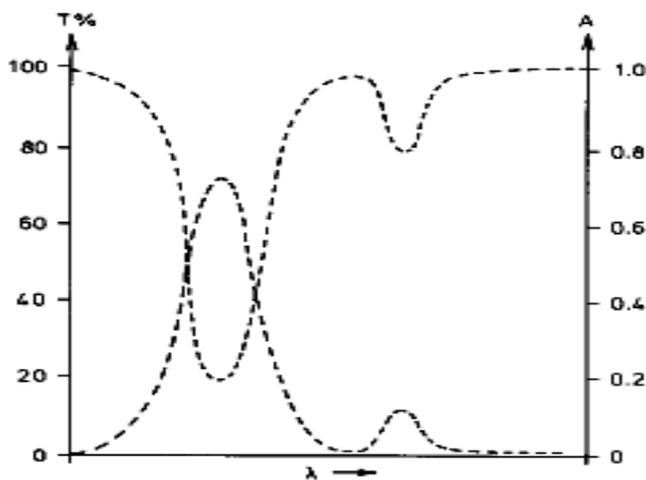


Figure 1: spectre de l'absorbance et de transmittance.

La bande d'absorption, observée dans le domaine de l'UV-visible, est caractérisée par sa position en longueur d'onde λ_{max} , nm (ou en nombre d'onde, cm^{-1}) et par son intensité reliée au coefficient d'extinction molaire ϵ_{max} .

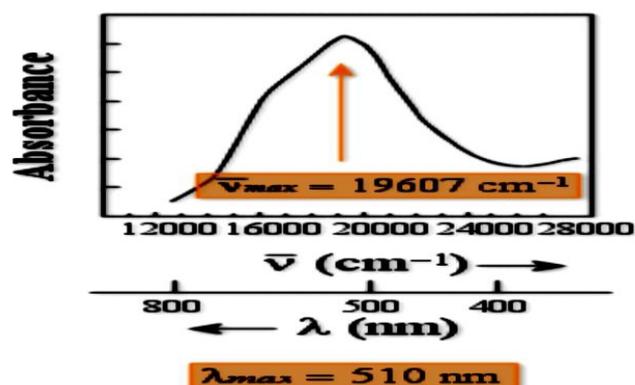


Figure 2: spectre montrant la longueur d'onde permettant le max d'absorption

La position du maximum d'absorption correspond à la longueur d'onde de la radiation qui provoque la transition électronique. Quant à l'intensité, on peut montrer qu'elle est liée au moment dipolaire. Sa valeur permet de savoir si la transition est permise ou interdite.

Remarque : Absorption et couleur

La couleur d'un composé est le complémentaire de ce qu'il absorbe (violet/jaune, bleu/orange, vert/rouge).

Exemple : Le complexe $\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ est rouge-violet et absorbe dans le vert.

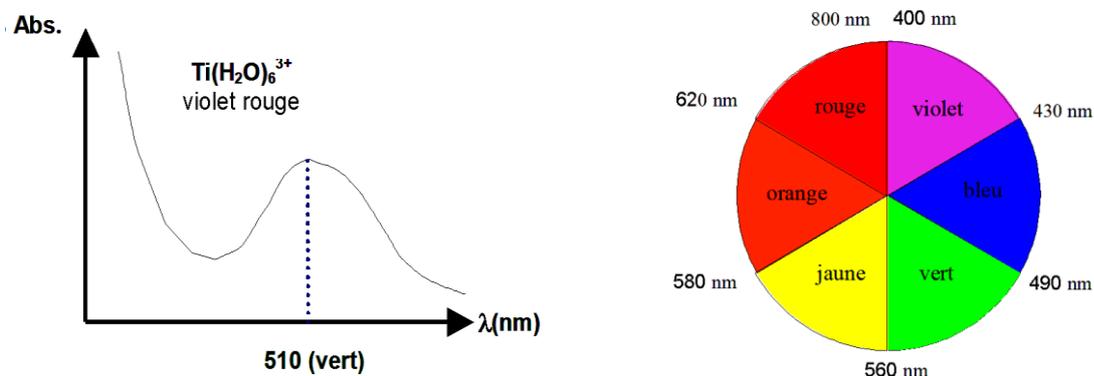


Figure 3: absorption et couleur

I.5 Règles de sélection

Une transition électronique est analysée comme un changement de population entre une orbitale moléculaire fondamentale occupée et une orbitale moléculaire excitée vacante. Lorsqu'elle a lieu, la matière absorbe un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre ces niveaux fondamental et excité. Mais toutes les transitions énergétiquement possibles ne sont pas permises.

Les règles de sélection déterminent si une transition est **permise (active)** ou **interdite (inactive)**. Les transitions permises sont celles qui provoquent une variation du moment dipolaire électrique. De plus, une transition permise a lieu si les orbitales impliquées au cours

de ce processus sont telles que $\Delta\ell = \pm 1$ et $\Delta S = 0$. En d'autres termes, le photon fait changer la symétrie de l'orbitale occupée par l'électron avant et après la transition mais ne fait pas changer le spin de cet électron.

I.6 Types de transitions électroniques

Les transitions électroniques correspondent au passage des électrons des orbitales moléculaires liantes et non liantes remplies, vers des orbitales moléculaires antiliantes non remplies. La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu. Le diagramme suivant illustre ceci pour des orbitales de type σ , π et n :

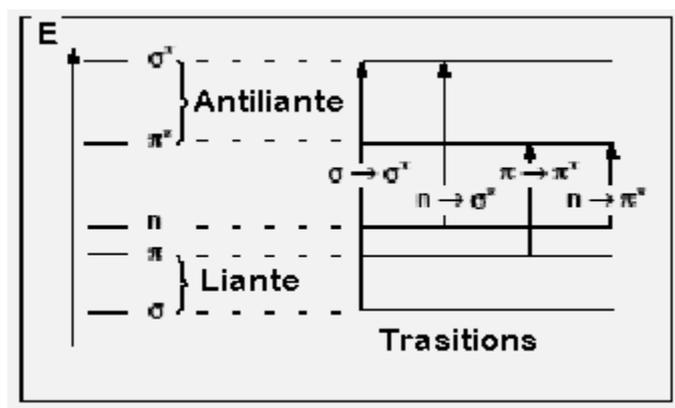


Figure 4: Transitions électroniques rencontrées en chimie organique.

L'absorption d'un photon dans le domaine UV-visible peut souvent être attribuée à des électrons appartenant à de petits groupes d'atomes appelés chromophores ($C=C$, $C=O$, $C=N$, $C\equiv C$, $C\equiv N$...).

La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu.

✚ Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Les OM σ sont des orbitales très stables. La différence d'énergie entre les OM est relativement élevée. La transition est $\sigma \rightarrow \sigma^*$, située dans le lointain UV vers 130 nm (éthane 135 nm). Ainsi, les hydrocarbures saturés qui ne renferment que les OM de ce type tels l'hexane ou le cyclohexane sont pratiquement transparents dès le proche UV.

✚ Transition $n \rightarrow \pi^*$

Ce type de transitions peu intense est rencontré dans le cas de molécules comportant un atome porteur de doublets électroniques libres (présence de niveaux n) appartenant à un système insaturé (présence de niveaux π^*). La plus connue est celle qui correspond à la bande carbonyle ; elle se situe entre 270 et 290 nm.

Le coefficient d'absorption est généralement compris entre 10 et 100 $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Exemple : 293 nm pour l'éthanal avec $\epsilon = 12 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dans l'éthanol.

✚ Transition $n \rightarrow \sigma^*$

Les composés constitués d'un ou plusieurs atomes (O, N, S, Cl) porteurs de doublets électroniques libres présentent ce type de transitions. Les énergies mises en jeu sont généralement inférieures à celles des transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Elles correspondent à des longueurs d'onde comprises entre 150 et 250 nm.

Le nombre de groupes fonctionnels présentant de telles transitions dans le domaine visible du spectre est très réduit. Le coefficient d'absorption varie de 100 à 5000 L mol⁻¹ cm⁻¹.

✚ Transition $\pi \rightarrow \pi^*$

Les composés qui possèdent une double liaison éthylénique isolée conduisent à une forte bande d'absorption vers 170 nm avec un coefficient d'absorption allant de 1000 à plus de 10 000 L mol⁻¹ cm⁻¹.

Exemple : 165 nm pour l'éthylène avec $\epsilon = 16\,000$ L mol⁻¹ cm⁻¹.

I.7 Effet de l'environnement sur les transitions

I.7.1 Terminologie

1. **Groupe chromophore** : groupement insaturé covalent responsable de l'absorption. Exemples : C=C, C=O, C=N, C≡C, C≡N...

2. **Effet bathochrome** : déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde.

3. **Effet hypsochrome** : déplacement des bandes d'absorption vers les courtes longueurs d'onde.

4. **Effet hyperchrome** : augmentation de l'intensité d'absorption.

5. **Effet hypochrome** : diminution de l'intensité d'absorption.

Ces effets sont illustrés sur la figure suivante :

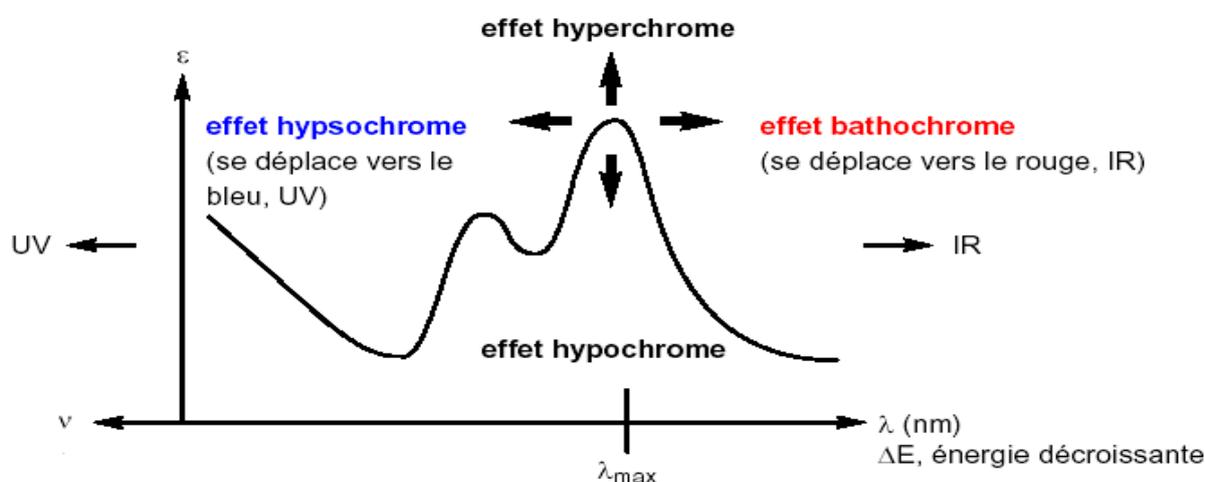


Figure 5: différentes possibilités de variation sur l'absorbance

I.7.2 Effet de la substitution

La position de la bande d'absorption dépend de la présence ou non de substituants sur le groupement chromophore. Par exemple, plus le groupe éthylénique est substitué, plus la bande d'absorption due à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ est déplacée vers le visible : **effet bathochrome**.

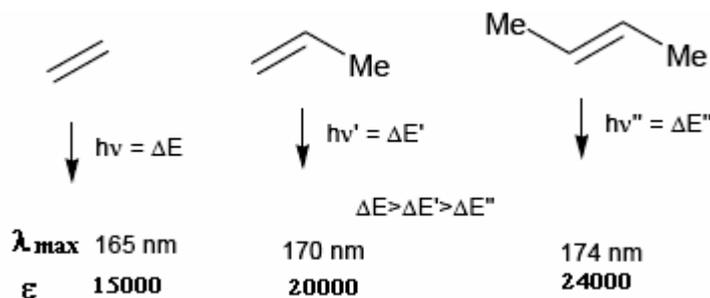


Figure 6: Effet de substitution des chromophores

Pour les substituants à effet mésomère (auxochromes) portés par un chromophore C=C ou C=O, les paires d'électrons non-appariées peuvent participer à la résonance, augmentant la conjugaison d'une molécule : -OH, -OR, -X, -NH₂, ... d'où des effets bathochrome et hyperchrome.

I.7.3 Effet de la conjugaison

L'enchaînement d'insaturations entraîne la délocalisation des électrons π . Cette délocalisation qui traduit la facilité des électrons à se mouvoir le long de la molécule est accompagnée d'un rapprochement des niveaux d'énergies.

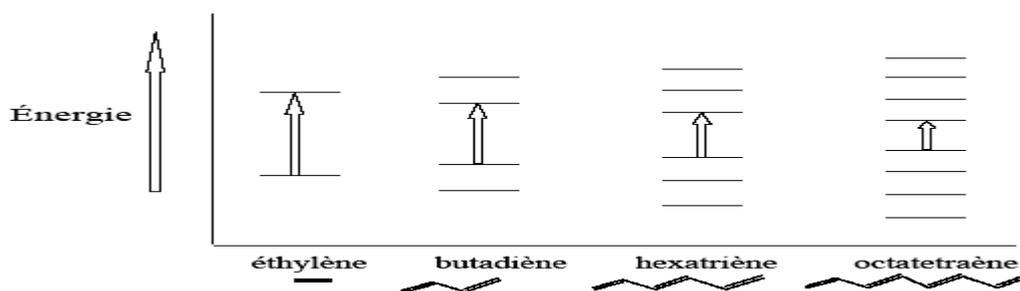


Figure 7: Effet de la conjugaison des chromophores

Pour les substituants à effet mésomère (auxochromes) portés par un chromophore C=C ou C=O, les paires d'électrons non-appariées peuvent participer à la résonance, augmentant la conjugaison d'une molécule : -OH, -OR, -X, -NH₂, ... d'où des effets bathochrome et hyperchrome.

I.7.4 Effet de solvant

La position, l'intensité et la forme des bandes d'absorption des composés en solution dépendent du solvant. Ces changements traduisent les interactions physiques soluté-solvant qui modifient la différence d'énergie entre état fondamental et état excité.

✚ **Cas de la transition $n \rightarrow \pi^*$:** Ex. du groupement carbonyle des fonctions cétones.

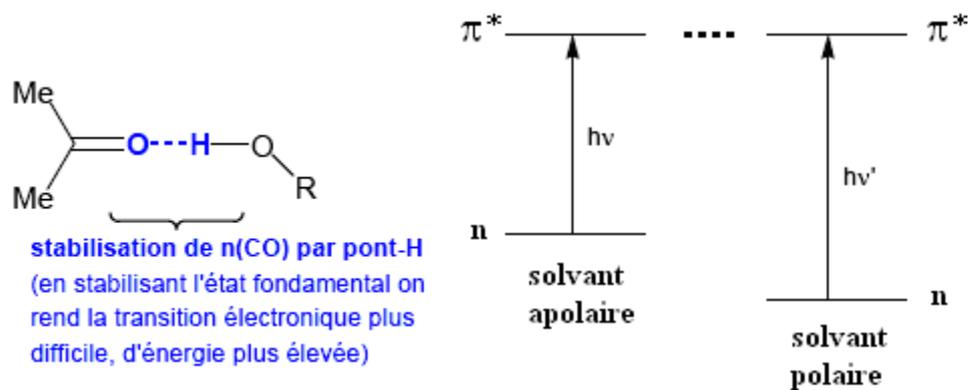


Figure 8: effet de solvants sur l'absorbance

Avant l'absorption, la liaison $\delta^+C=O^{\delta-}$ est stabilisée par un solvant polaire. Il faut plus d'énergie pour provoquer la transition $\Rightarrow \lambda$ **diminue** par augmentation de la polarité du solvant.

✚ **Cas de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$:** Si l'état excité est plus polaire que l'état fondamental, c'est la forme excitée qui est stabilisée par un solvant polaire. E diminue $\Rightarrow \lambda$ augmente par augmentation de la polarité du solvant.

Par augmentation de la polarité du solvant:

Transition $n \rightarrow \pi^*$: effet hypsochrome

Transition $\pi \rightarrow \pi^*$: effet bathochrome

I.8 Techniques expérimentales

I.8.1 Appareillage

L'étude des absorptions nécessite l'utilisation d'un appareil appelé spectromètre. Un spectrophotomètre est conçu autour de trois modules : ceux de la *source* et du *système dispersif* (souvent conçu comme un monochromateur), qui constituent la partie optique et celui qui est responsable de la détection. L'ensemble est réuni dans un bâti unique. Un compartiment échantillon est inséré sur le trajet optique après ou avant le système dispersif selon la conception du montage.

La figure suivante représente le schéma de principe d'un *spectromètre d'absorption UV-visible double faisceau*.

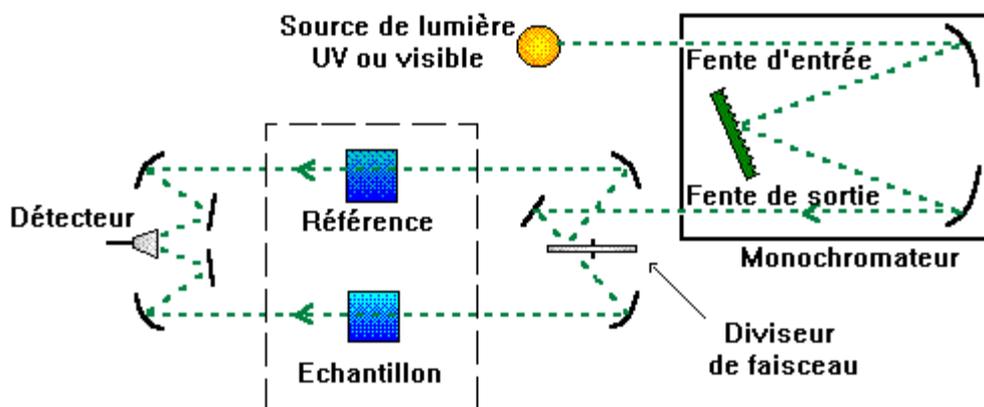


Figure 9: schéma de principe d'un spectrophotomètre à double faisceau

Il est constitué des éléments suivants :

1. Source

Le rôle de la source est de fournir la radiation lumineuse.

✚ Dans la région de l'UV (190 à 400 nm), la source est une lampe à décharge au deutérium.



Figure 10: lampe UV au deutérium

✚ Une lampe à filament de tungstène est utilisée pour la région allant de 350 à 800 nm.



Figure 11: Lampe à incandescence à filament de tungstène

✚ Une lampe à décharge au xénon utilisée dans le domaine UV et visible. Ce type de lampe est très énergétique. Elle fonctionne sous forme de flash, juste au moment de faire une mesure.

2. Monochromateur

Le monochromateur a pour rôle de disperser le rayonnement polychromatique provenant de la source et d'obtenir des radiations monochromatiques.

Les monochromateurs les plus utilisés sont composés en général d'une fente d'entrée, d'un dispositif de dispersion comme un prisme ou un réseau et d'une fente de sortie.

L'échantillon et le détecteur, placés juste derrière le monochromateur, ne seront donc traversés que par un domaine étroit de longueurs d'onde.

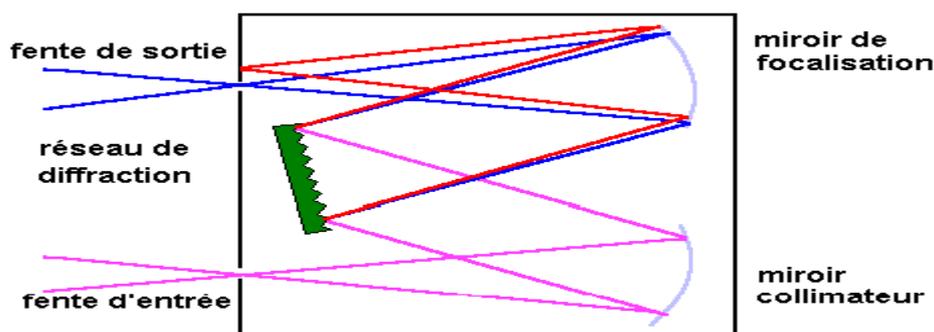


Figure 11: monochromateur à réseau.

3. Diviseur de faisceau ou photomètre

La lumière monochromatique qui émerge du monochromateur est séparée en deux faisceaux qui traversent les compartiments de l'échantillon et de la référence.

4. Détecteur

Le détecteur est un tube photomultiplicateur qui convertit la lumière reçue en courant. Ce type de détecteurs est de plus en plus remplacé par des photodiodes (semi-conducteurs) plus sensibles.

Le détecteur est relié à un enregistreur qui permet de tracer un spectre d'absorption de l'échantillon analysé.

I.9 Echantillonnage

Les composés peuvent être étudiés dans divers états physiques (gazeux, liquide, solide ...). La plupart du temps, l'étude se fait en solution.

I.9.1 Solvants

Pour l'étude en solution, le composé doit être dissous dans un solvant convenablement choisi : il doit dissoudre le produit et être transparent (n'absorbe pas) dans la région examinée. La figure suivante donne la zone d'absorption de certains solvants et matériaux.

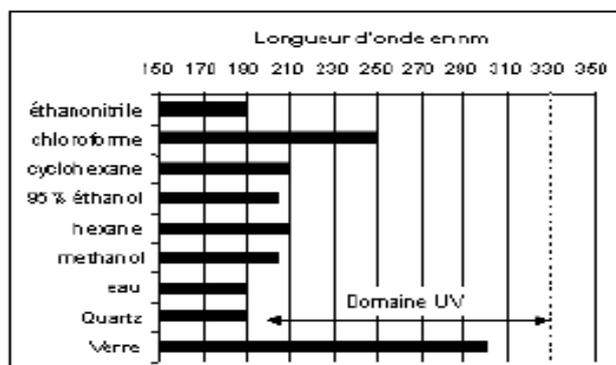


Figure 12: la zone d'absorption de certains solvants et matériaux.

Exemple : L'hexane peut être utilisé comme solvant pour des échantillons qui absorbent à des longueurs d'onde supérieures à 210 nm.

I.10 Cellules

La solution à étudier doit être placée dans une cellule ou cuve. Les cellules de mesure sont généralement des tubes parallélépipédiques de 1x1 cm de côté et 4 à 5 cm de hauteur. Elles sont en quartz pour le domaine UV-visible. Le verre est réservé aux mesures dans le domaine visible uniquement.



Figure 13: la cuve en quartz.

I.11 Applications de la spectroscopie UV-Visible**I.11.1 Analyse qualitative**

Les spectres UV fournissent généralement peu de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres IR. Néanmoins, on les utilise soit pour une confirmation soit pour une identification grâce aux règles empiriques.

I.11.2 Analyse quantitative

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert.

Comme applications, on peut citer:

- ✓ Dosage du fer dans l'eau ou dans un médicament
- ✓ Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique
- ✓ Dosage du benzène dans le cyclohexane

I.11.3 Autres applications

D'autres applications sont connues pour le Contrôle Qualité ou le suivi de la cinétique d'une réaction, la détermination des constantes de dissociation des acides ou des constantes de complexation, la détermination des masses molaires...

Introduction

Après extraction des molécules biologiques (protéines), il est nécessaire de les purifier et de les analyser à fin de déterminer leurs structures et par la suite caractériser leurs fonctions. Les différentes étapes de la purification consistent en des processus successifs de simplification du mélange complexe initial, retrait des déchets cellulaires (membranes, organites), élimination du matériel génétique, élimination ou conservation de certaines protéines en fonction de leurs caractéristiques chimiques (taille, charge électrique, affinité), isolation par affinité spécifique de la protéine d'intérêt.

Nous allons pouvoir étudier dans ce chapitre deux techniques instrumentales, très utilisées en biologie pour la séparation, purification, l'analyse et la caractérisation des molécules, il s'agit de l'électrophorèse et de la chromatographie.

II. La chromatographie**II.1. Historique**

La chromatographie a été inventée par le botaniste Mikhail Tswett dans les années 1900. La première chromatographie mise au point est la chromatographie d'adsorption. Elle fut inventée en 1903 par un botaniste russe, Mikhail Tswett, pour séparer les pigments végétaux d'une feuille d'épinard. Tswett avait observé la séparation des colorants végétaux, dont les chlorophylles, lorsqu'il filtrait leur solution 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».

Le prix Nobel de chimie est attribué en 1952 aux biochimistes Martin et Synge pour leur contribution au développement de la chromatographie moderne.

II.2. Définition

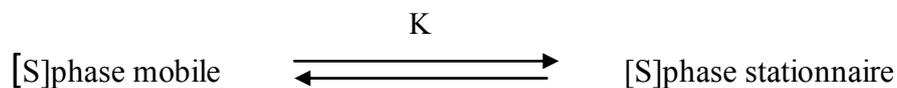
La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers.

Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation.

Ce procédé hydrodynamique a donné naissance à une méthode analytique instrumentale qui a un grand domaine d'application et par suite se trouve très répandue. Aucun laboratoire analysant des composés moléculaires ne peut ignorer la chromatographie.

II.3. Principe

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un (des) composé(s) à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). Selon le principe de cette technique mise en jeu, la séparation est basée sur l'entraînement différentiel par la phase mobile des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...). Cette vitesse de séparation est fortement indépendante de la nature des phases mobile et stationnaire.



L'éluion d'un soluté **S** en chromatographie est donc caractérisé par la constante d'équilibre **K**, on définit alors un coefficient de partition **K** ou de partage K_d appelée constante de Nernst. C'est le paramètre physico-chimique de base en chromatographie qui quantifie le rapport de concentration de chaque composé entre les deux phases en présence.

$$K_d = \frac{C_S}{C_M} \quad (\text{eq.1})$$

K_d : Coefficient de distribution

C_S : Concentration de l'analyte A dans la phase stationnaire

C_M : Concentration de l'analyte A dans la phase mobile

ou bien
$$K_d = \frac{\text{masse de soluté dans la phase stationnaire} / \text{unité de volume}}{\text{masse de soluté dans la phase mobile} / \text{unité de volume}}$$

Si $K_d > 1$: le soluté se trouve essentiellement dans la phase stationnaire. Après une addition importante d'éluant, le soluté est localisé dans la première moitié de la colonne.

Si $K_d < 1$: le soluté se distribue de préférence dans la phase mobile et se situe dans la seconde moitié de la colonne.

II.4. Classification des méthodes chromatographiques

On peut classer les méthodes chromatographiques de trois manières:

- selon la nature des phases
- selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation
- selon la technologie mise en oeuvre.

II.4. 1. Classification selon la nature des phases

✚ Phase stationnaire (fixe)

La phase fixe peut être solide ou bien liquide. Les solides; silice ou alumine traités permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leur propriétés absorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium (chromatographie sur couche mince ou CCM).

La phase stationnaire peut aussi être liquide imprégnant un support solide ou par une chaîne carbonée fixée sur un support(phase greffée). En chromatographie en phase gazeuse, elle est constituée d'un liquide peu volatile et thermiquement stable imprégnant un granulé poreux. On définit alors:

La chromatographie gaz / solide CGS

La chromatographie gaz / liquide CGL

La chromatographie liquide / solide CLS

La chromatographie liquide / liquide CLL

✚ Phase mobile

Soit un gaz, exemple chromatographie en phase gazeuse: la phase mobile est appelée gaz vecteur.

Soit un liquide, exemple chromatographie sur couche mince: la phase mobile est appelée éluant.

On distingue alors:

La chromatographie en phase liquide CPL

La chromatographie en phase gazeuse CPG

La chromatographie en phase supercritique CPS

II.4. 2. Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu

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

La séparation entre les molécules est fondée sur le processus répété d'adsorption et désorption par la phase stationnaire. Il s'agit d'une chromatographie liquide-solide.

La chromatographie de partage

La séparation est fondée sur les différences de solubilité des molécules à séparer entre phase mobile et phase stationnaire liquide (phase qui imprègne ou qui est greffée sur un solide). Il s'agit alors de chromatographie liquide-liquide (CLL).

La chromatographie d'échange d'ions

La phase stationnaire est un solide à la surface duquel se trouvent des groupements ionisés. La rétention des solutés ce fait grâce à des interactions de type ioniques.

La chromatographie d'exclusion

Elle est encore appelée chromatographie d'exclusion moléculaire, tamisage moléculaire, gel-filtration, perméabilité sur gel. La phase stationnaire est un solide poreux (gel): les molécules sont séparé selon leur forme et leur masse moléculaire.

La chromatographie d'affinité

La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

II.4. 3. Classification selon la technique mise en jeu

Selon le support de la chromatographie on distingue:

1. la chromatographie sur colonne
2. la chromatographie planaire (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

II.5 Principe de séparation sur colonne

C'est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases:

- La phase stationnaire: support solide.
- La phase mobile: le solvant.

La vitesse de déplacement des composés dans la colonne dépend de:

- L'affinité à la phase stationnaire: plus que l'affinité à la phase stationnaire est grande, plus que le déplacement des composés dans la colonne est très lent.
- La solubilité dans la phase mobile (plus que le composé est très soluble dans la phase mobile, plus que son déplacement dans la colonne est très vite).

Le choix du type de chromatographie et du support dépend de la nature des composés à séparer (Tableau I).

Les éléments de la chromatographie sont: L'échantillon, la phase stationnaire, la phase mobile, la colonne, la pompe, le détecteur, le collecteur de fractions et l'enregistreur.

1. **Echantillon:** C'est la solution qui contient les composés à analyser.

2. **Phase stationnaire:** C'est un gel constitué de granules qui se trouve dans une colonne. Les granules peuvent: être poreuses, porter une charge ionique ou un site d'affinité.
3. **Phase mobile:** C'est un liquide qui se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant avec lui les composés de l'échantillon. Elle doit être soluble et interagir avec les composés de l'échantillon et non pas avec la phase stationnaire.
4. **Colonne:** C'est le support de la phase stationnaire (gel ou résine). A travers lequel, la phase mobile passe. Elle peut être en verre, en plastique ou en inox et de différentes dimensions.
5. **Pompe:** Elle permet de régler le débit de la phase mobile à travers la colonne.
6. **Détecteur:** Il évalue la quantité de chacun des composés séparés et envoie un signal électronique vers l'enregistreur.
7. **L'enregistreur:** Il dessine les pics en fonction de leur intensité.
8. **Le collecteur de fractions:** permet de collecter les fractions de l'échantillon.

Chaque séparation effectuée donne lieu à un enregistrement particulier appelé **chromatogramme** qui est un diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur (par rapport à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution).

Tableau I: Choix du type de chromatographie et du support.

| Type de chromatographie | Nature de l'adsorbant | Nature des composés à Séparer |
|--------------------------|--|---|
| Adsorption | Gel de silice | Molécules organiques simples, Molécules contenant plusieurs groupements polaires, substances électrophiles, substances à haut poids moléculaires . |
| | Oxyde d'aluminium | Vitamines, alcaloïdes, colorants, substances à caractère nucléophile. |
| Partage | Gel de silice Oxyde d'aluminium Kieselguhr | Substances très polaires Substances très polaires Sucres et composés amphotères, acides aminés. |
| Partage en phase inverse | Film E.C.S 511 V | Composés hydrophiles de series homologues. |
| | Polyamide | Phénols et dérivés nitrés aromatiques. |
| | Cellulose | Acides gras et leurs esters méthyliques. |
| Echange d'ion | DEAE | Composés dont la charge électrique dépend du pH. |
| | Sephadex | (Nucléotide et acides carboxyliques) |

II.6 Théorie de base - Grandeurs fondamentales

II.6.1 Chromatogramme

Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne. Le temps (ou très rarement le volume d'élution) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. La ligne de base correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. Ce graphique est utilisé à la fois en analyse qualitative (identification / position du pic) et quantitative (aire des pics).

II.6.2 Elution : L'élution est l'entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile. En chromatographie liquide solide, la phase mobile peut être appelée éluant.

II.6.3 Eluant: solvant permettant d'éluer le composé, ou bien une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui déplace les solutés dans la phase stationnaire, jusqu'à ce qu'ils sortent de celle-ci

II.6.4 Eluat: solution recueillie au bas de la colonne.

II.6.5 Grandeurs de rétention

II.6.5.1 Le temps mort

Le temps mort (t_M) est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire de la colonne, pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne (ou temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne), désigné également par t_0 (Figure 14).

II.6.5.2 Le temps de rétention

Le temps de rétention (t_R) est le temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne. Le temps de rétention est caractéristique d'une espèce pour des conditions d'analyse données et peuvent servir à l'analyse qualitative. La surface et la hauteur d'un pic est fonction de la quantité du constituant. Le temps de rétention est indépendant de la quantité d'échantillon injectée. Il est fonction de la nature et la vitesse de la phase mobile (Fig. 14).

II.6.5.3 Le temps de rétention réduit

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé t'_R . En d'autres termes c'est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit : $t'_R = t_R - t_M$ (eq.2)

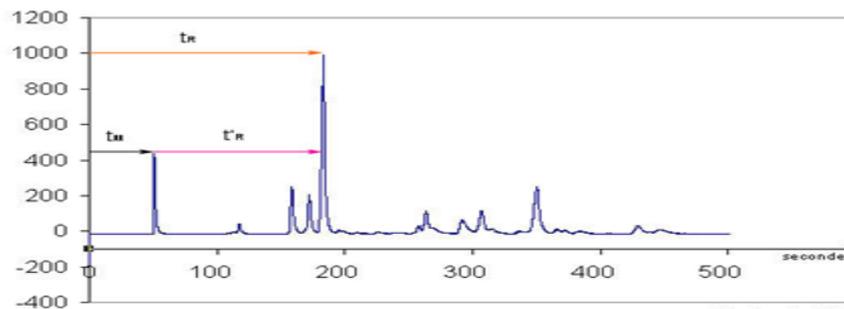


figure 14: Temps de rétention.

II.6.5.4 Le Volume d'élution ou volume de rétention V_R

Le volume d'élution (de rétention) V_R de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si le débit D est stationnaire,

$$V_R = t_R \times D \text{ (eq.3)}$$

✚ Volume d'un pic V_{pic}

Il correspond au volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne. Il vaut par définition : $V_{pic} = \omega \times D$ (eq.4)

ω : correspond à la largeur du pic à la base.

II.6.5.5 Le volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort V_M)

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) V_M correspond au volume interstitiel accessible. Il peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. On peut l'exprimer en fonction de t_M et du débit D :

$$V_M = t_M \times D \text{ (eq.5)}$$

II.6.5.6 Le Volume de la phase stationnaire

Ce volume désigné par V_S n'apparaît pas sur le chromatogramme. Dans les cas simples on le calcule en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

II.7 Notion de concentration

II.7.1 Coefficient de partage

C'est le paramètre physicochimique de base en chromatographie qui qualifie le rapport de concentration de chaque composé entre les deux phases en présence.

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{\text{Concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{Concentration du soluté dans la phase mobile}} \quad (\text{eq.6})$$

Les valeurs de K sont très variables. Elles sont grandes (1 000, par exemple) lorsque la phase mobile est un gaz, et petites lorsque les deux phases sont à l'état condensé. Chaque composé n'occupant qu'un espace limité de la colonne et de plus avec une concentration variable, les valeurs vraies de C_M et de C_S ne sont pas accessibles mais leur rapport est constant.

II.7.2 Facteur de rétention K' (ou de capacité)

Quand un composé de masse totale m_T est introduit dans la colonne, il se répartit en deux quantités : m_M dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire. Si on ne change pas les conditions opératoires, ces deux quantités demeurent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Leur rapport, appelé **facteur de rétention**, est indépendant de m_T .

$$K' = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S \times V_S \times M_S}{C_M \times V_M \times M_S} \quad (\text{eq.7})$$

Donc le **facteur de rétention** est égale :

$$K' = K \frac{V_S}{V_M} \quad (\text{eq.8})$$

Le facteur de rétention, encore appelé **facteur de capacité k** , est un paramètre très important de la chromatographie. Il est défini en régime isocratique. Ce n'est pas une constante, bien qu'il ne varie pas avec le débit ou la longueur de la colonne, car il dépend des conditions opératoires.

Ce paramètre rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque composé (*capacité*). Dans la mise au point des séparations on fait en sorte que K' ne dépasse pas 10, afin de ne pas trop allonger le temps de passage des composés.

Ce facteur sans dimension, peut être relié au temps de rétention par l'expression:

$$K' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M} \quad (\text{eq.9})$$

Le facteur de rétention K' est aussi le rapport du temps passé par une espèce dans la phase stationnaire au temps passé par cette même espèce dans la phase mobile.

De faibles valeurs de k' indiquent des composés peu retenus. Des valeurs élevées de k' indiquent des composés fortement retenus, en pratique $1 < K' < 10$.

Le temps et le volume de rétention sont liés au facteur de capacité par les relations :

$$t_R = t_M(1 + K') \quad (\text{eq.10})$$

Compte tenu des équations 3 et 5 le volume de rétention V_R d'un soluté pourra s'écrire :

$$V_R = V_M(1 + K') \quad (\text{eq.11})$$

Ou :

$$V_R = V_M + KV_S \quad (\text{eq.12})$$

Cette dernière expression qui relie les paramètres expérimentaux au coefficient thermodynamique de distribution K est valable pour une chromatographie idéale.

II.7.3 Le facteur de sélectivité (Séparation)

Le facteur de sélectivité, parfois appelé facteur de séparation, mesure l'efficacité de la séparation entre deux composés adjacents 1 et 2 sur le chromatogramme (Figure 15). En général il est défini par la relation suivante:

$$\alpha = \frac{t'_R(2)}{t'_R(1)} = \frac{t_{R(2)} - t_M}{t_{R(1)} - t_M} \quad (\text{eq.13})$$

Il s'agit du rapport des **temps de rétention réduits**, d'après les équations 8 et 9:

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{K'_2}{K'_1} \quad (\text{eq.14})$$

Où K_1 et K_2 sont les facteurs de rétention respectivement des composés 1 et 2. Par définition le composé 2 est le plus retenu, en conséquence, le facteur de séparation α est toujours supérieur à l'unité (>1).

Pour des pics non adjacents, on définit le **facteur de rétention relative** r , qui, calculé comme α , ne peut être inférieur à 1.

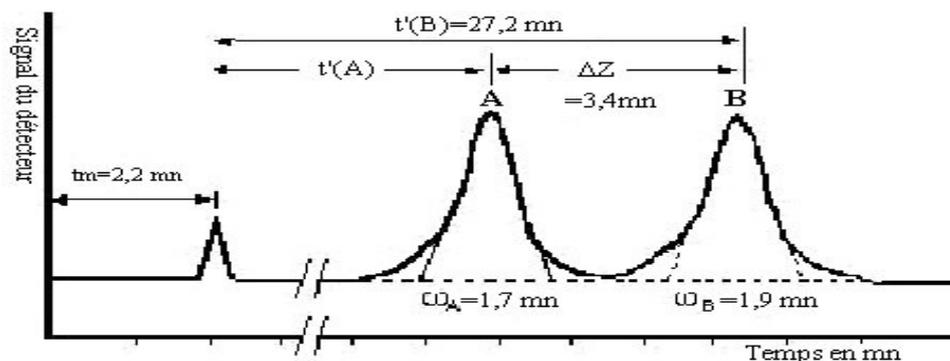


Figure 15: Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents.

II.8 Notion d'efficacité

II.8.1 Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

L'efficacité d'une colonne chromatographique est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne et la hauteur équivalente à un plateau théorique H . Cette théorie est née de la recherche d'un modèle statique permettant de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique comme celui d'une colonne à distiller.

Au lieu de considérer le déplacement réel, continu de la phase mobile, on admet que celle-ci progresse par sauts successifs et se met en équilibre avec la phase stationnaire entre deux transferts, ce qui permet de découper fictivement la colonne en un certain nombre de zones dans lesquelles les équilibres sont réalisés et que l'on appelle plateaux théoriques (Figure 16).

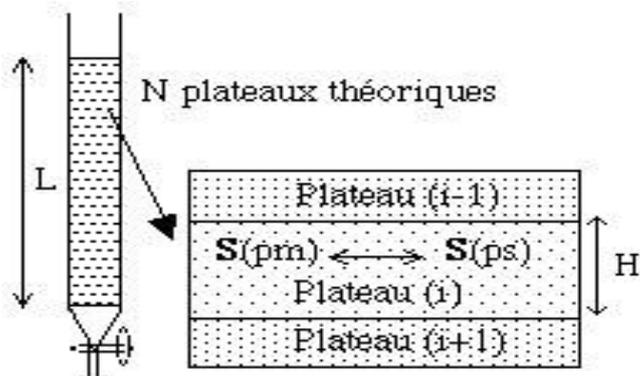


Figure 16: Model des plateaux théoriques.

Les pics d'éluion peuvent être assimilés à des courbes de Gauss. Les caractéristiques géométriques de la courbe de Gauss (Figure 17) permettent de calculer, pour un soluté donné, N (nombre de plateaux théoriques) à partir du chromatogramme.

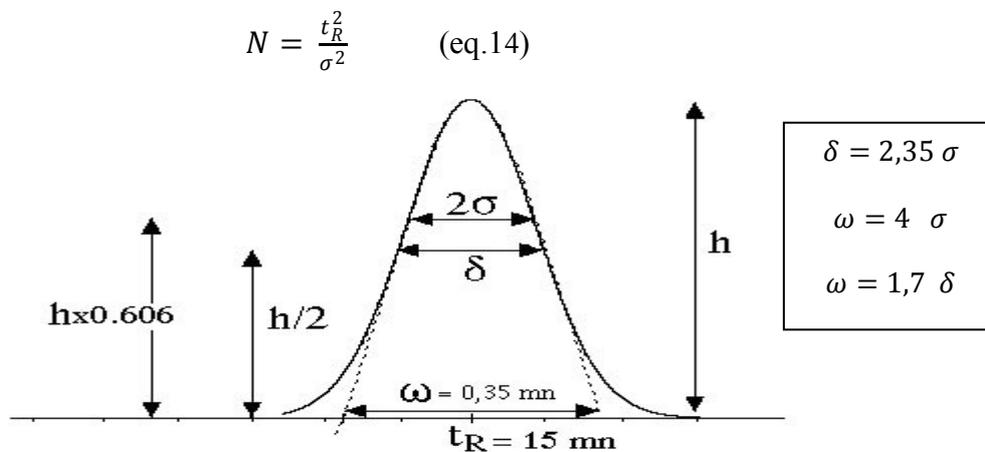


Figure n°17: Caractéristiques d'un pic chromatographique idéal.

Sur le chromatogramme (figure 17), σ représente la demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur et t_R le temps de rétention du composé. t_R et σ doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant). Si on exprime σ en unités de volume (en faisant intervenir le débit), 4σ correspond au « volume du pic » soit 95 % du composé injecté. Par suite des propriétés de la courbe de Gauss ($\omega = 4\sigma$), il en résulte l'équation 15.

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2} \quad (\text{eq.15})$$

Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée : on utilise de préférence l'équation 16.

$$N = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2} \quad (\text{eq.16})$$

ω largeur du pic à la base: distance entre les points d'intersection des tangentes au point d'inflexion avec la ligne de base et δ largeur du pic à mi-hauteur.

II.8.2 Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

Afin de comparer les performances de colonnes de conceptions différentes, vis-à-vis d'un même composé, on remplace le temps total t_R qui figure dans les expressions 14 à 16 par le temps de rétention réduit t'_R qui ne tient pas compte du temps mort t_M passé par le composé dans la phase mobile. Les trois précédentes expressions deviennent :

$$N_{eff} = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \quad (\text{eq.17})$$

$$N_{eff} = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2} \quad (\text{eq.18})$$

$$N_{eff} = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2} \quad (\text{eq.19})$$

II.8.3 Hauteur de plateau (Hauteur équivalent à un plateau théorique)

Ce paramètre est calculé pour des composés de référence car il permet de comparer des colonnes de longueurs différentes, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique. bien qu'il ne s'agisse en aucune façon d'une constante. Sa valeur dépend du composé choisi et des conditions de l'expérience.

$$HEPT = \frac{L}{N} \quad (\text{eq.20})$$

L: longueur de la colonne

N: Nombre de plateaux théorique

L'efficacité des colonnes chromatographiques augmente si le nombre de plateaux théoriques augmente ou si la hauteur équivalente à un plateau théorique diminue à longueur constante. Lorsqu'on double la longueur de la colonne ou la vitesse de la phase mobile, le temps de rétention est multiplié. Il y'a des facteurs extra-colonne qui peuvent influencer sur l'efficacité de celle-ci est d'utiliser des tubes trop larges ou trop long (tube de liaison qui influe sur la largeur du pic mais pas sur le temps de rétention).

En chromatographie gazeuse, on a longtemps utilisé une valeur corrigée appelée hauteur de plateau effectif H_{eff} faisant intervenir l'efficacité réelle à la place de l'efficacité théorique. Le calcul de H_{eff} à partir de l'efficacité réelle utilise l'équation 21.

$$H_{eff} = \frac{L}{N_{eff}} \quad (\text{eq.21})$$

▪ **Hauteur de plateau réduite.** En chromatographie dont la phase mobile est un liquide et pour les colonnes dont le remplissage est formé de particules sphériques, on rencontre assez souvent la hauteur de plateau réduite, h , qui tient compte du diamètre moyen d_m des particules. On élimine en quelque sorte l'effet de la taille des particules. Des colonnes présentant le même rapport (longueur de la colonne)/(diamètre des particules) conduisent à des performances semblables.

$$h = \frac{H}{d_m} = \frac{L}{N d_m} \quad (\text{eq.22})$$

II.9 Résolution

Pour traduire numériquement la plus ou moins bonne séparation entre deux composés, on utilise le facteur de résolution R qui est calculé à partir du chromatogramme.

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_2 + \omega_1} \quad (\text{eq.23})$$

Plus la résolution est grande, meilleure est la séparation

$R = 0,75$: mauvaise résolution, les pics sont chevauchants

$R = 1$: résolution acceptable, les pics sont légèrement chevauchants

$R > 1,5$: résolution optimale, les pics sont bien séparés

Donc, on considère que les pics sont résolus à partir de $R = 1,5$.

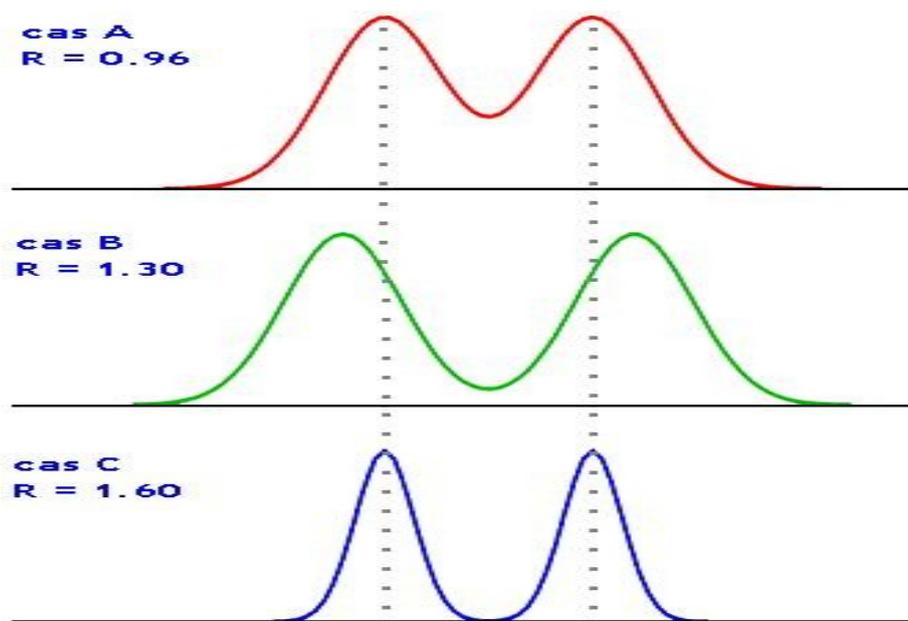


Figure 18: Influence du résolution sur la séparation de deux pics d'intensité égale.

Il existe, pour exprimer la résolution, d'autres relations dérivées des précédentes, établies en vue de remplacer un paramètre par un autre, ou admettant des hypothèses simplificatrices.

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha-1}{\alpha} \frac{K_2'}{1+K_2'} \quad (\text{eq.23})$$

II.10 Influence de la vitesse de la phase mobile

Dans tout ce qui précède, en particulier dans les différentes expressions caractérisant les séparations, la vitesse de la phase mobile dans la colonne n'est pas prise en compte. Or, de toute évidence, cette vitesse doit avoir une incidence sur la progression des analytes dans la colonne, donc sur leur dispersion, en bref sur la qualité de l'analyse en cours. L'influence de la vitesse de la phase mobile a été mise en évidence par Van Deemter qui a proposé la première équation cinétique, dans le cas des colonnes remplies en chromatographie en phase gazeuse.

II.10.1 Équation de Van Deemter

La forme simplifiée, proposée par cet auteur en 1956, est très connue en chromatographie en phase gazeuse, pour les colonnes remplies (eq.24). Elle relie H (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile u dans la colonne (figure 19) :

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (\text{eq.24})$$

Cette équation montre qu'il existe un *débit optimal* pour chaque colonne, correspondant au minimum de H , tel que le prévoit la courbe représentant l'équation eq.24. La diminution de l'efficacité, quand le débit croît, correspond à un résultat que chacun a pu découvrir à ses dépens en voulant accélérer une séparation chromatographique par augmentation du débit de la phase mobile. Ce qui est moins intuitif par contre, est la perte d'efficacité due à un débit trop lent. Pour expliquer ce phénomène, il faut revenir sur l'origine des termes A , B et C dont chacun a un domaine d'influence qui peut être repéré sur le graphe.

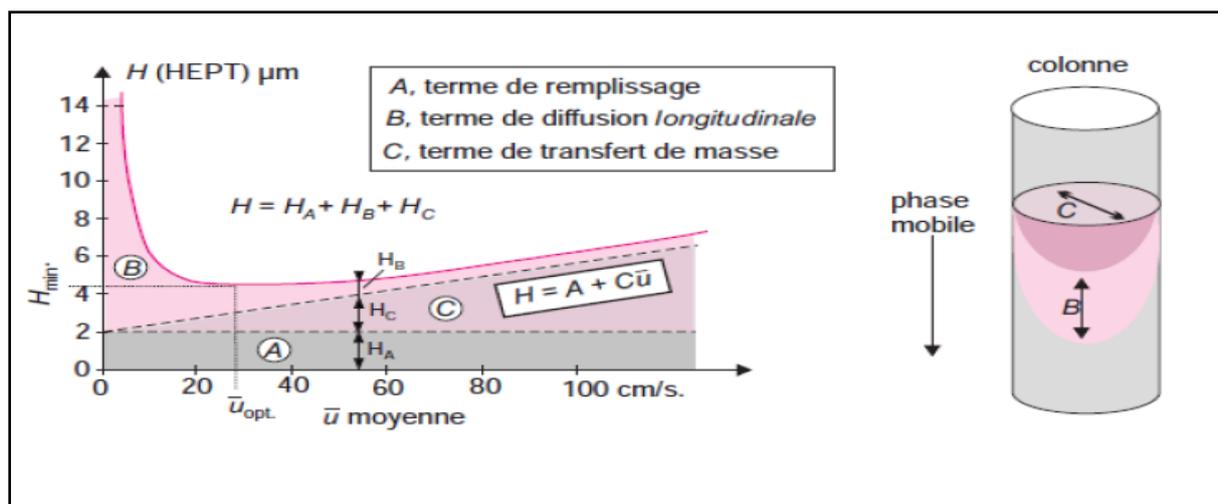


Figure 19: Equation de Van Deemter en chromatographie gazeuse

avec indication des domaines propres à A, B et C. Il existe également une équation semblable à celle de Van Deemter qui fait intervenir cette fois la température : $H = A + B/T + C \cdot T$.

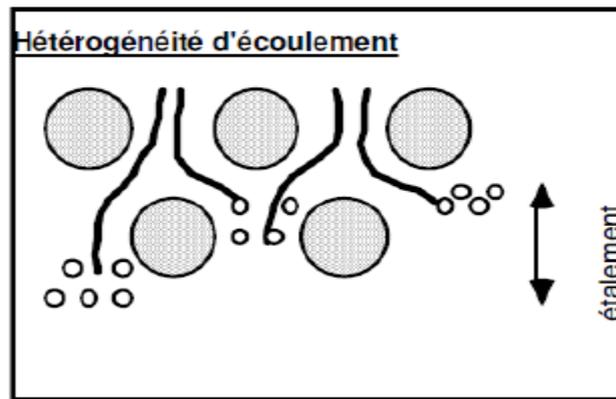
Les trois coefficients numériques expérimentaux A , B et C sont reliés à divers paramètres physico-chimiques, à la colonne et aux conditions opératoires. Si on choisit d'exprimer H en cm, A sera en cm, B en cm^2/s et C en s (la vitesse étant en cm/s) (équation 25). La courbe représentative de cette fonction est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum (H_{min}) pour :

$$u_{\text{opt.}} = \sqrt{\frac{B}{C}} \quad (\text{eq.25})$$

Trois facteurs, représentés par les 3 termes de l'équation 23, contribuent à l'élargissement des pics:

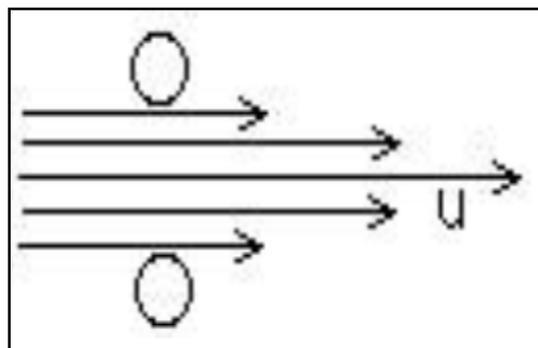
Diffusion turbulente ou de remplissage (Terme A)

Le terme A est en relation avec le profil d'écoulement de la phase mobile à travers la phase stationnaire. Suivant la taille et la forme des particules, ils existent pour la phase mobile, plusieurs trajets possibles, cette particularité contribue à l'élargissement des pics d'où $A = 2 l dp$. l est une constante voisine de 1. dp est le diamètre moyen des particules. Donc, plus les particules sont petites et plus le remplissage est homogène, plus l'efficacité de la colonne augmente. La contribution de A est nulle pour une colonne capillaire de chromatographie en phase gazeuse.



Diffusion longitudinale (Terme B)

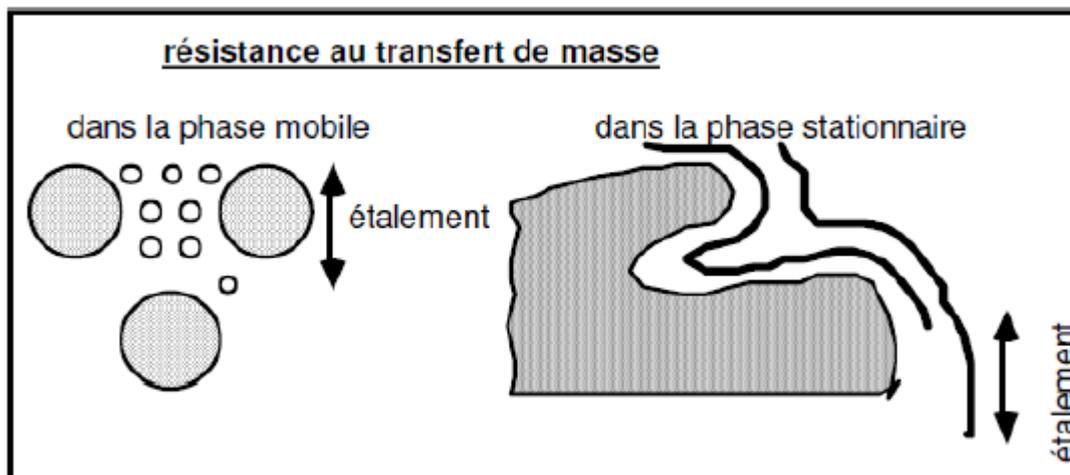
Le terme B/u traduit la dispersion du soluté à cause de la diffusion du soluté dans la colonne. Par exemple, dans un flux liquide, les molécules au centre du flux progressent plus vite que celles qui sont sur les bords au contact des particules; on a $B = 2g D_m$ où g est une constante ($g < 1$), et D_m est le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile. Le terme B/u est évidemment inversement proportionnel à u . L'efficacité d'une colonne augmente avec la vitesse de la phase mobile. Ceci peut expliquer les bonnes séparations obtenues en HPLC; de plus, comme le terme D_m est environ 5 fois plus grand en CPG qu'en CPL, il en résulte que la contribution de la diffusion longitudinale est presque négligeable en HPLC.



Résistance au transfert de masse (Terme C)

Ce terme $C \cdot u$ représente la résistance au transfert du soluté entre les phases mobiles et stationnaires, cette résistance empêche l'établissement de l'équilibre entre $S_{(pm)}$ et $S_{(ps)}$. Ce phénomène est dû par exemple au fait que certaines molécules stagnent dans les pores de la phase stationnaire. Plus la vitesse (u) de la phase mobile diminue, plus les molécules de soluté peuvent pénétrer dans la phase stationnaire, plus l'équilibre entre les 2 phases est favorisé et plus la colonne est performante. Le terme C est proportionnel à (d_p^2/D_m) , les colonnes les plus efficaces seront celles régulièrement remplies et bien tassées où le diamètre des

particules est le plus faible possible. Il faut également utiliser des solvants de faible viscosité pour minimiser ce terme.



II.11 Les différents types de chromatographie

II.11.1 Chromatographie échangeuse d'ions

II.11.1.1 Généralités

De nombreuses substances biologiques (amino-acides, protéines) possèdent des groupes ionisables et peuvent ainsi avoir une charge nette positive ou négative. Les substances ainsi chargées peuvent être séparées des mélanges grâce à l'utilisation d'échangeurs d'ions. La charge nette est dépendante du pK_a de la substance et du pH de la solution.



$$\text{avec } \text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{base}^-]}{[\text{acide}]} \quad (\text{eq.26})$$

La chromatographie ionique (CI) est une technique qui s'apparente à la CLHP mais qui présente cependant suffisamment de particularités, tant au niveau du principe de la séparation que de certaines méthodes de détection, pour en faire l'objet d'une étude à part. Elle est adaptée à la séparation des ions minéraux et de toutes sortes de molécules organiques à la condition qu'elles soient polaires. La phase mobile est constituée par un milieu aqueux ionique et la phase stationnaire par un solide qui se comporte comme un échangeur d'ions. Les modes de détection classiques par absorbance ou fluorescence étant souvent mal adaptés à ces analytes, on utilise des détecteurs mettant à profit la conductance des solutions.

Les applications actuelles de la CI débordent largement les analyses des cations ou des anions qui ont fait ses premiers succès.

II.11.1.2 Principe de la Chromatographie échangeuse d'ions

La chromatographie à échange d'ions (ou chromatographie à ions ou chromatographie échangeuse d'ions) est un type de chromatographie en phase liquide permettant d'isoler une substance chargée électriquement d'un mélange de molécules chargées (liquide). Pour cela, on fait passer le mélange sur une phase stationnaire (solide) chargée, déjà associée à des ions connus et on remplace ces ions par les ions/molécules chargées du mélange à séparer.

Ce processus d'échange est lent, comparé à ceux qui régissent les autres types de chromatographie.

Les parties au contact de la phase mobile doivent être en matériaux inertes compte tenu de l'agressivité des solutions aqueuses acides ou basiques qui servent d'éluants.

La progression et la séparation des composés de l'échantillon reposent sur des phénomènes d'échanges ioniques. On distingue deux situations :

➤ Si on cherche à séparer des espèces cationiques (type M^+), on choisit une colonne, appelée *cationique*, dont la phase stationnaire comporte des sites aptes à échanger les cations.

Une telle phase est constituée par exemple par un polymère greffé avec des groupements $-SO_3H$ (c'est par conséquent l'équivalent d'un polyanion).

En revanche, si on cherche à séparer des anions (type A^-) on choisit une colonne dite *anionique*. Celle-ci est obtenue par exemple à partir d'un polymère comportant des groupements ammonium).

On retrouve l'architecture modulaire classique de la chromatographie liquide, avec pour différence de pouvoir utiliser un mode de détection original basé sur la conductance des solutions. Cependant la nature et la concentration ionique de certaines phases mobiles sont à l'origine de difficultés avec ce mode de détection. On fait alors appel à un montage particulier comportant un « suppresseur », dispositif intercalé entre la colonne et le détecteur, qui a pour rôle d'éliminer les ions de l'éluant par réaction de type acido-basique.

C'est une technique chromatographique couramment utilisée en chimie analytique, notamment pour le contrôle de la qualité de l'eau. La chromatographie ionique est devenue depuis quelques années une des méthodes analytiques de références en analyse des eaux.

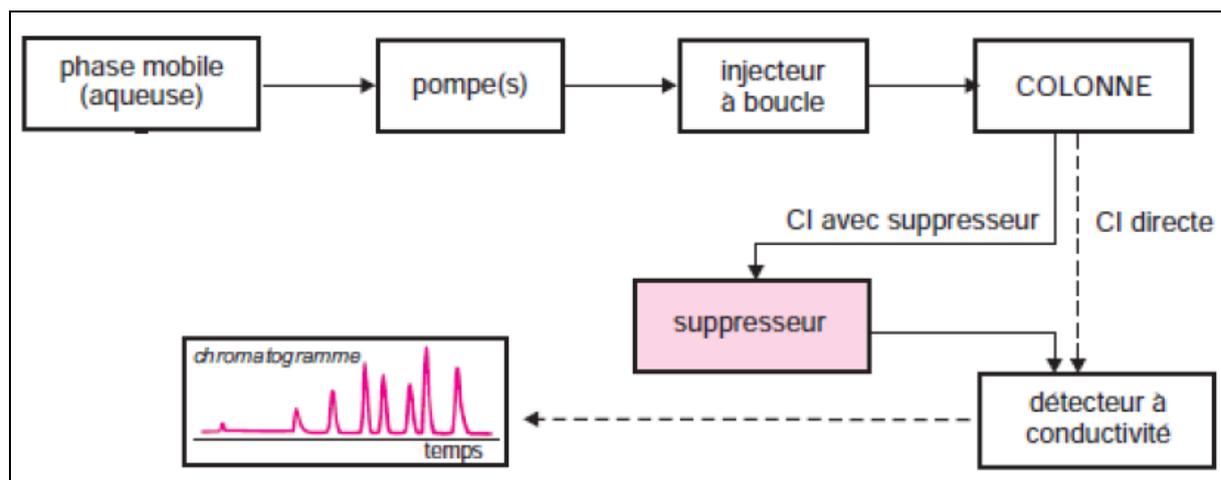


Figure 20: Schéma de principe d'une installation de chromatographie ionique.

II.11.1.3 Les différents types d'échangeurs

Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant de groupements ionisés négativement ou positivement ayant la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution. Ce sont des solides plus au moins poreux, gélifiables le plus souvent, se présentant sous forme granulée.

II.11.1.3.1 Groupements fonctionnels

On les classe selon leur charge en deux catégories :

✚ **Les résines échangeuses de cations** dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature anionique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

1. Résines cationiques fortes: Résines sulfoniques (très fortement ionisées quelque soit le pH).
2. Résines cationiques intermédiaires: Résines phosphoriques.
3. Résines cationiques faibles: Résines carboxyliques (non ionisées en milieu acide fort).
4. Résines cationiques très faibles: Résines phénoliques (ionisées en milieu basique uniquement).



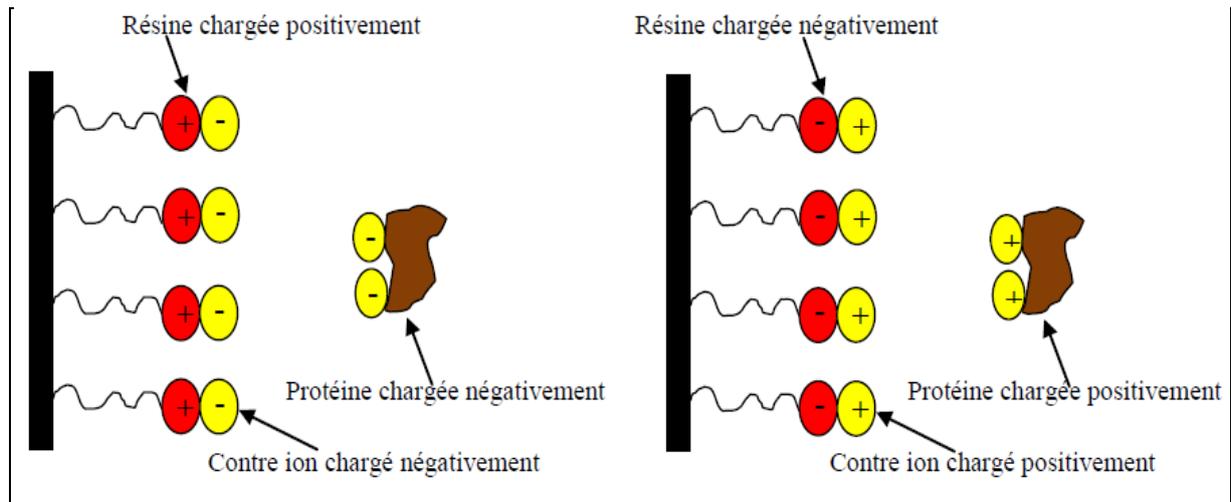
✚ **Les résines échangeuses d'anions** dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature cationique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

1. Résines anioniques fortes (résines à amine quaternaire).
2. Résines anioniques faibles (résine à amine secondaire).



A) Echangeurs anionique

B) Echangeur cationique



Les groupements sont dit **forts** car leur capacité d'échange est constante et indépendante du pH, les groupements **faibles** ne sont pas ionisés à un certain pH.

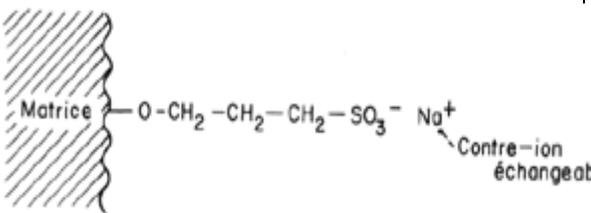
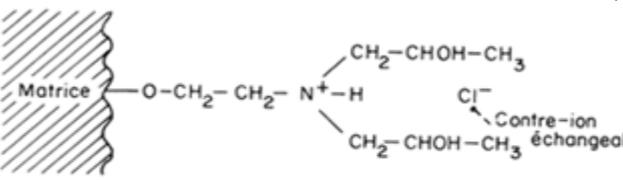
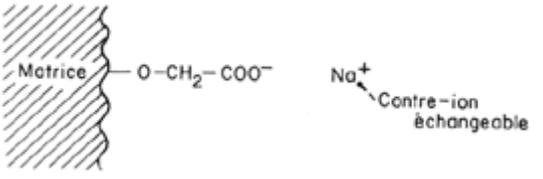
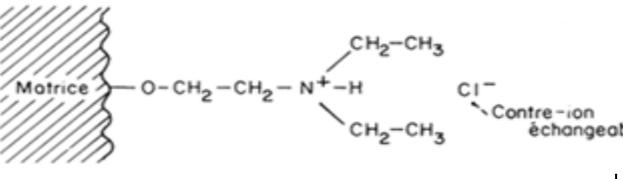
| Echangeur de cations | Echangeur d'anions |
|--|--|
| Forts | |
| <p>Résine- SO₃⁻ <i>Acide sulfonique</i> <i>Exemple:</i> Le SP-polyoside (sulfopropyle):</p>  | <p>Résine-N⁺(CH₃)₃ <i>Ammonium quaternaire</i> <i>Exemple</i> Le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle):</p>  |
| Faibles | |
| <p>Résine-COO- <i>Groupement carboxylique</i> <i>Exemple:</i> CM-polyoside (carboxyméthyle):</p>  | <p>Résine-NH₃⁺ <i>Amine primaire</i> <i>Exemple:</i></p>  |

Figure 21: Les différents types d'échangeurs ioniques.

II.11.1.3.2 Support

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

Les résines de type polystyrène (BARNES N., Internat. Lab., oct 1993, **16**, P4-P8) résultent de la polymérisation de vinylbenzène avec comme agent de pontage du divinylbenzène (4 à 8 %). Ces matrices sont synthétisées dans une phase apolaire solvante des monomères dispersée sous forme d'émulsion dont la taille des particules dispersées est parfaitement contrôlée (figure 22) .

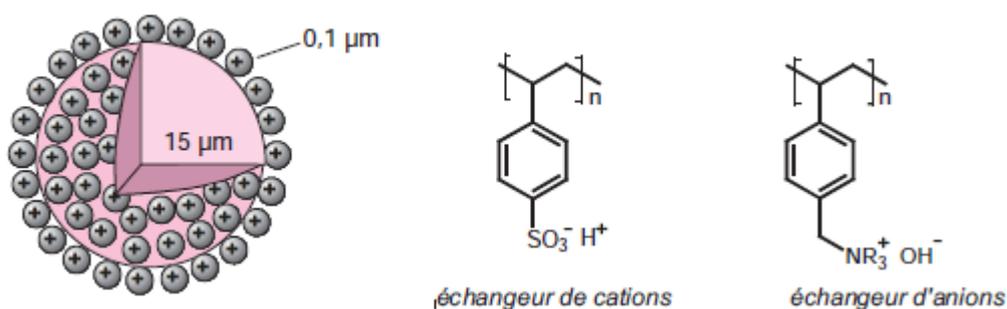


Figure 22: Résine échangeuse d'ions en polystyrène réticulé.

Les caractéristiques des supports sont :

1. **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.

Les échangeurs d'ions Sephadex préparés à partir du gel G50 sont plus poreux que ceux préparés à partir du gel G25.

2. **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.

3. **Capacité de rétention** : c'est la quantité maximale d'ions que peut fixer l'échangeur d'ions, exprimée en mEq/g (milliéquivalent par gramme) de résine sèche ou en mEq/mL de poids de résine humide.

Elle dépend de la densité du support en groupements fonctionnels et il faut en tenir compte pour ne pas trop charger une colonne. L'affinité d'un échangeur pour un ion donné dépend de plusieurs facteurs:

✚ de la charge des groupements fonctionnels, qui elle-même dépend :
de leur nature (pKa) du pH de la solution : un tampon maintient le pH constant tout au long de l'analyse. Il maintient une charge identique sur la résine. L'ion du tampon utilisé, ayant le signe contraire à la charge de la résine, est présent au moment du dépôt de l'échantillon (conditionnement) de la densité de charge de l'ion considéré, qui dépend: de la nature de l'ion (pKa, pHi) de la taille de l'ion (l'ion est d'autant plus fixé qu'il est chargé, ou/et qu'il est petit) de la concentration des ions : Les concentrations agissent sur la position de l'équilibre. Une concentration élevée en ions, même de faible affinité, pourra éluer l'ion fortement retenu.

✚ de l'accessibilité des groupements fonctionnels (porosité et granulométrie).

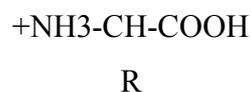
Les échangeurs d'ions Sephadex présentes des capacités supérieurs a tout autre échangeur d'ions.

II.11.1.4 La phase mobile

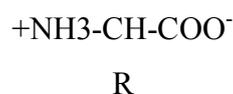
La phase mobile est une solution aqueuse de force ionique donnée (généralement un tampon de pH). On peut éluer avec une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou avec un gradient de pH et (ou) de force ionique, pour décrocher successivement les différents ions fixés sur l'échangeur.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



par un déplacement de l'équilibre vers la gauche, l'acide AH étant peu (ou pas) retenu. Avec les acides aminés, on utilise une colonne échangeuse de cations (polystyrène sulfoné). On se place initialement dans des conditions de pH (≈ 2) pour lesquelles tous les acides aminés sont sous la forme



Si on injecte sur la colonne des solutions tampon de pH croissant, les acides aminés seront élués en fonction de leur pHi. En effet, quand le pH de la phase mobile est égal au pHi l'acide aminé se trouve sous forme de switterion non chargé, donc non retenu.



Avec les **composés polyhydroxylés** (oses, diholosides etc...) on réalise un complexe avec l'acide borique, complexe chargé négativement.

Ces complexes peuvent être séparés sur résines échangeuses d'anions (tampon borate avec gradient de pH de 7 à 10).

III.1.5 Influence du type et de la concentration en contre-ion

La constante d'équilibre de l'échange reflète l'affinité du soluté ionique ou du contre-ion pour l'échangeur. En général les échangeurs d'ions ont une grande affinité pour :

- les ions possédant une forte charge
- les ions avec un petit volume d'hydratation.

Il est possible de classer les ions en fonctions de leur affinité pour l'échangeur, donc de leur "force d'élution".

Ainsi avec un **échangeur d'anions** du type ammonium quaternaire on a :

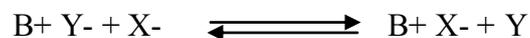
citrate > ClO₄⁻ > SO₄²⁻ > oxalate > I⁻ > NO₃⁻ > Br⁻ > SCN⁻ > Cl⁻ > formiate > acétate > OH⁻ > F⁻

Avec les **résines échangeuses de cations de type sulfonate** on a :

Ce³⁺ > Ba²⁺ > Pb²⁺ > Sr²⁺ > Ca²⁺ > Ni²⁺ > Ca²⁺ > Cu²⁺ > Co²⁺ > Zn²⁺ > Mn²⁺ > Ti⁺ > Ag⁺ > Cs⁺ > Rb⁺ > K⁺ > NH₄⁺ > Na⁺ > H⁺ > Li⁺.

Quand le soluté et le contre ion sont complètement chargés, la pente de la droite log D(N ou X) en fonction de la concentration en contre-ion est en général égale à a/b, avec a valence du soluté, b valence du contre ion.

Quand la concentration en contre-ion augmente (X⁻)



on déplace l'équilibre vers la droite.

III.1.6 Effet de la température et de solvants organiques

Si on augmente la température de la colonne, la rétention du soluté diminue. De plus la viscosité de la phase mobile diminue ce qui permet d'augmenter le débit.

L'addition de solvants organiques à la phase aqueuse mobile affecte la rétention. En effet, les effets secondaires de la matrice (adsorption hydrophobe dans le cas de polystyrène et perméation) jouent un rôle prépondérant dans la distribution des ions et plus particulièrement des ions organiques.

III.1.7 Choix du type d'échangeur d'ions en fonction du pHi de la protéine à séparer et du pH du tampon

Considérons une protéine pHi=5:

- ✓ Si le pH du tampon utilisé pour la chromatographie est inférieur au pHi de la protéine, celle-ci est chargée positivement (car elle joue le rôle d'une base: capte les ions H⁺), il faut utiliser un échangeur de cations.

- ✓ Si le pH du tampon utilisé pour la chromatographie est supérieur au pHi de la protéine, celle-ci est chargée négativement (car elle joue le rôle d'un acide: libère des ions H⁺), il faut utiliser un échangeur d'anions.

III.1.8 Détecteurs à conductivité

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.

On mesure, en sortie de colonne, la conductance (inverse de la résistance) de la phase mobile entre deux micro-électrodes. Pour pouvoir faire une mesure directe, il faut utiliser un éluant peu chargé en ions, possédant une faible conductance et disposer d'une cellule de mesure thermostatée à 0,01 °C près, étant donné l'effet prononcé de la température sur la conductance (~5 %/ °C !). La cellule de mesure, disposée en aval de la colonne, est d'un volume très réduit (environ 2 mL). On peut prévoir la sensibilité de la détection d'un ion X (valence z et conc. mol. C) à condition de connaître sa conductance équivalente (Λ_X) et celle de l'ion éluant E (Λ_E). On calcule la valeur de ΔK selon l'expression suivante, sachant que, suivant le signe trouvé, le pic sera dit positif ou négatif :

$$\Delta K = C \cdot z \cdot (\Lambda_X - \Lambda_E) \text{ (eq.27)}$$

III.1.9 Conduite d'une séparation en C.E.I

La chromatographie d'échange d'ions se réalise en 4 étapes :

Première étape: L'échangeur d'ions est équilibré dans un tampon dont le pH est tel que le groupement porté par l'échangeur d'ions soit ionisé.

L'échangeur d'ions est en équilibre avec ses contre ions. Les produits de l'échantillon vont pénétrer dans le gel échangeur d'ions.

Deuxième étape: dépôt des molécules à séparer sur la colonne. La solution est dans le même tampon de pH qui a permis d'ioniser l'échangeur d'ions.

Troisième étape: élution des molécules fixées sur la résine soit **en modifiant le pH** de la phase mobile de telle sorte que les molécules qui sont chargées ne le soient plus (ou qu'elles portent une charge de même signe que l'échangeur d'ions). Il n'y a plus alors d'interaction électrostatique entre les molécules et le groupement chargé porté par la résine. Soit, **en**

ajoutant un sel (à une concentration croissante) qui apporte forcément un ion de même charge que les molécules fixées à la résine: cet ion s'appelle un **contre-ion**.

Quatrième étape: régénération de l'échangeur d'ions (par lavage extensif avec une solution de pH permettant de remettre les charges dans leur valeur initiale).

III.1.10 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.

II.11.2 Chromatographie d'exclusion stérique

Chromatographie d'exclusion stérique est encore appelée : perméation de gel ou tamisage moléculaire ou gel de filtration (filtration sur gel). On emploie surtout les deux derniers termes quand le solvant est aqueux et que la chromatographie se fait sous pression atmosphérique. On désigne la CES par *perméation de gel* quand elle est hydrophobe (la phase mobile est un solvant organique).

II.11.2.1 Principe de la Chromatographie d'exclusion stérique

C'est une méthode chromatographique qui permet de séparer des molécules de taille différentes par des composés organiques polymériques capables de s'hydrater de manière importante et de donner grâce à un réseau tridimensionnel particulier une matrice poreuse appelée gel. Ce gel, commercialisé sous forme de billes ou de grains, constitue la phase stationnaire.

Dans ce type de chromatographique, les particules les plus larges sont complètement exclues, c'est à dire qu'elles ne peuvent pas pénétrer dans la phase stationnaire, elles passent entre les grains de polymère($K_d=0$). Au contraire, les petites molécules sont distribuées entre la phase mobile et la phase stationnaire puisqu'elles peuvent diffuser dans les pores du gel. Dans ce cas, K_d pourra avoir une valeur comprise entre 0 et 1. Toutefois, un K_d largement supérieur à 1 indique que la molécule réagit avec le gel en s'adsorbant, ce comportement ne fait pas partie de l'exclusion moléculaire (figure 23).

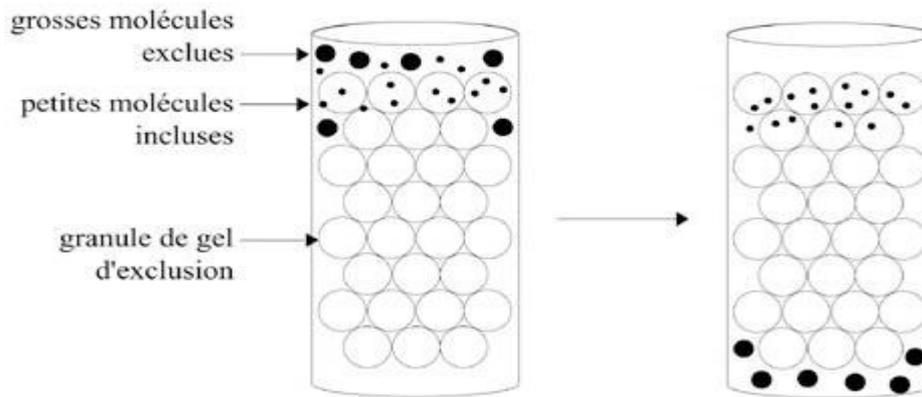


Figure 23: Schéma Tamisage moléculaire.

Cette technique permet donc la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores du gel) sont exclues et sont éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0). Les petites et les moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car elles sont incluses dans le gel , leur migration est freinée. Les solutés sont donc 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

La chromatographie d'exclusion stérique est généralement utilisée pour déterminer le poids moléculaire des composés d'un échantillon par l'utilisation de substances standards.

II.11.2.2 Théorie de la chromatographie d'exclusion

Le volume total V_t de la phase mobile dans la colonne peut être décomposé en deux parties : le volume interstitiel V_i ou V_0 (extérieur aux pores) et le volume des pores V_p .

V_i représente le volume de phase mobile nécessaire pour transporter, d'une extrémité à l'autre de la colonne, une grosse molécule supposée exclue des pores (Figure 24).

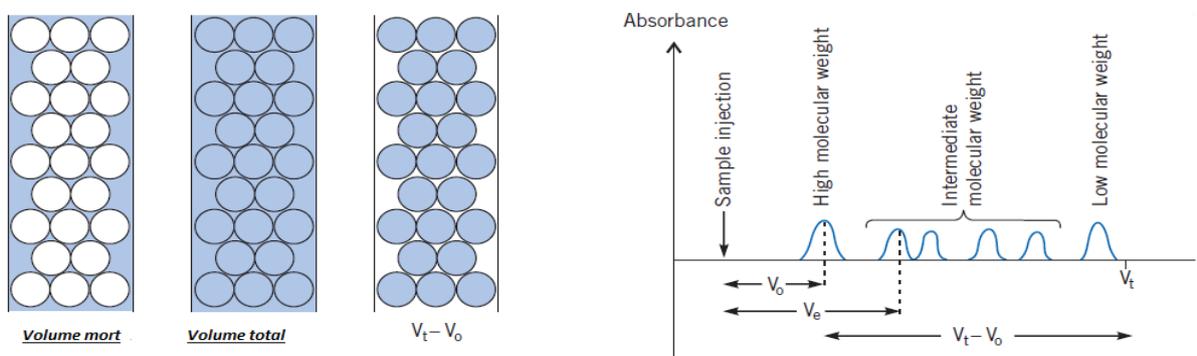


Figure 24: Les volumes caractéristiques de la CES

$$V_t = V_i + V_p \quad (\text{eq.28})$$

V_t le volume correspondant pour une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores.

Les volumes d'éluion V_e sont donc compris entre V_i et V_t On a :

$$V_e = V_i + K_D V_p \quad (\text{eq.29})$$

$$K_D = \frac{V_e - V_i}{V_t - V_i} \quad (\text{eq.30})$$

K_D coefficient de diffusion, représente le degré de pénétration d'une espèce dissoute dans le volume V_p ($0 < K < 1$). Pour la plupart des remplissages modernes, V_p et V_i sont tous les deux de l'ordre de 40% du volume de la colonne vide.

Lorsque $K > 1$, le comportement du composé dans la colonne ne suit plus seulement le mécanisme d'exclusion stérique, mais il s'y ajoute des interactions physicochimiques avec le support.

Le raisonnement ci-dessus est vérifié dans la pratique : les molécules dont le diamètre est plus grand que celui des plus larges pores ($K = 0$) sont exclues de la phase stationnaire (d'où vient l'expression d'*exclusion stérique*). Elles traversent la colonne sans être retenues et forment un seul pic sur le chromatogramme à la position V_i (figure 25).

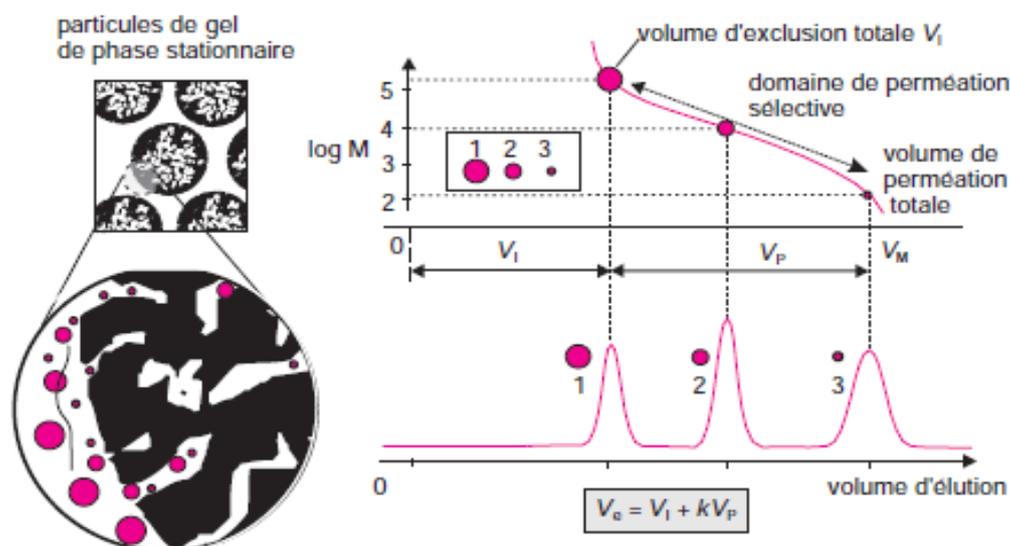


Figure 25: Principe de la migration dans la CES

Chromatogramme figurant une séparation de trois espèces (1,2,3) de tailles différentes en solution. Les molécules les plus grosses **1** arrivent en tête, suivies des molécules moyennes **2** et enfin des petites molécules **3**. Les volumes d'éluion sont compris entre V_i et $V_t = V_p + V_i$. Image d'un gel poreux pour illustrer la notion de séparation selon la taille des pores.

L'efficacité est optimale avec les solvants de faible viscosité et lorsque les séparations sont effectuées à chaud. Les coefficients de diffusion K sont indépendants de la température.

II.11.2.3 Phase stationnaire

Les phases stationnaires sont constituées par des polymères réticulés organiques ou minéraux (silices greffées de substituants hydroxylés), qui se présentent sous forme de grains sphériques de 3 à 10 μm de diamètre avec des pores compris entre 4 nm et 200 nm. Ces matériaux, communément appelés *gels*, doivent résister à l'effet d'écrasement dû à la pression en tête de colonne et à une température de plus de 100 °C pour la technologie actuelle.

Remarques

1. Les colonnes standards ont une longueur de 30 cm (diamètre interne de 7,5 mm). Leur efficacité N peut atteindre 105 plateaux/m.
2. La nature des phases en présence dépend du type de Chromatographie d'exclusion:
 - pour la **perméation de gel**, la phase stationnaire la plus courante est un polymère *styrène-divinylbenzène* et la phase mobile un solvant organique. Le tétrahydrofurane, le benzène, le trichlorométhane ainsi que le trichlorobenzène (réservé aux polymères de synthèse difficiles à solubiliser) sont utilisés.
 - pour la **filtration sur gel**, on utilise des phases stationnaires polyhydroxylées à base d'*alcools polyvinyliques* purs ou copolymérisés avec des *polyacétates de vinyle*.
3. Ces phases portent le nom de gels car elles gonflent en présence des phases mobiles aqueuses. On fait également appel à des gels de silice poreuse dont la surface est hydrophile (présence du groupement glycéropropyle [$\equiv\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$])). Les phénomènes d'adsorption sont faibles, même pour les petites molécules. Elles servent pour séparer les bio-polymères (ex. polysaccharides) ou les macromolécules biologiques (les protéines par exemple), qui exigent une phase mobile aqueuse.
4. Un gel donné a un domaine de fractionnement spécifique (exprimé en termes de masse moléculaire) à l'intérieur duquel les protéines vont prendre, pour sortir du gel, un temps proportionnel à leur taille, donc à leur poids. À l'intérieur de cette marge, les molécules peuvent être séparées les unes des autres. Les molécules plus grosses que la limite supérieure de fractionnement, la limite d'exclusion, vont donc sortir ensemble, assez rapidement. Les molécules plus petites que la limite inférieure sortiront ensemble beaucoup plus tard. Dans ces

deux cas il est évidemment impossible de séparer les molécules selon leur masse. Les molécules ayant une masse entre ces deux limites pourront donc être séparées les unes des autres. Ces limites sont appelées domaine de fractionnement.

II.11.2.3.1 Les principaux gels de filtration

Il existe de très nombreuses marques de gels de filtration différents par leur stabilité, résistance à la pression et au débit, etc. On doit aussi comprendre que pour un gel ayant un domaine de fractionnement donné, on peut obtenir des préparations ayant une résolution plus ou moins fine. Les microbilles de faibles diamètres, de l'ordre de 20 μm , permettent d'obtenir une résolution très fine, alors qu'une préparation de billes plus de l'ordre de 200 μm ne permet qu'une résolution grossière.

Les résines ayant une résolution supérieure ont l'inconvénient d'avoir un débit beaucoup plus lent et d'être beaucoup plus fragiles. De plus, elles sont beaucoup plus dispendieuses. Ces deux caractéristiques limitent évidemment leur emploi à des applications requérant une plus grande précision.

1. Le Sephadex™ G

De la compagnie Pharmacia, est probablement la plus connue des résines de filtration sur gel. Il est constitué de dextran (un polymère linéaire de glucose reliées entre elles par des liaisons α -1,6 glucosidiques) dont les fibres sont réticulées à l'épichlorohydrine pour former les microbilles poreuses. Les différentes variantes (G-25, G-100, G-200, etc.) sont obtenues en contrôlant la réaction de réticulation. Les variantes ont différentes capacités de rétention d'eau, porosités, domaines de fractionnement, limites d'exclusion, etc. Ces gels permettent d'obtenir des séparations de molécules dont les masses vont de 700 à 800000.

La limite d'exclusion du G-25 est 5000 Da. Elles sont utilisés surtout pour le dessalage. Celles ayant des pores beaucoup plus petits ont un domaine de fractionnement plus élevé. Ainsi, le G-200 a une limite de résolution de 800000 Da. Comme le dextran est très hydrophile, ce gel est utilisé pour les séparations en milieu aqueux.

Les variétés de Sephadex ayant une relativement haute limite de résolution sont cependant très fragile et ne supporte pas des débits ou des pressions hydrostatiques trop élevées.

2. Le Sephadex LH, toujours de Pharmacia, est un dérivé hydroxypropylé du Sephadex G. Il est stable en présence de solvant organiques purs ou mélangés avec de l'eau.

3. Le Bio-Gel P est produit par Bio-Rad. C'est un polymère d'acrylamide réticulé avec du bisacrylamide. Les différents de Bio-Gel P, ont des domaines de fractionnement du même

ordre que ceux des différents variétés du Sephadex G. Cette matrice résiste mieux aux pressions hydrostatiques et aux débits élevés. Ces gels permettent d'obtenir des séparations de molécules dont les masses vont de 200 à 400000.

4. **Le Sepharyl**, de Pharmacia, il est plus ou moins l'équivalent du Bio-Gel P, sauf que c'est un mélange composite de dextran et d'acrylamide.

5. **Le Sepharose**, de Pharmacia, est une préparation d'agarose gélifiée en microbilles et débarrassée de la grande majorité de ses contaminants chargés. La stabilité de cette matrice est due aux liens hydrogène qui lient les polymères d'agarose entre eux. Il est possible de contrôler le domaine de fractionnement en modulant la quantité d'agarose qu'on fait gélifier. Les limites d'exclusion sont extrêmement élevées, souvent de l'ordre du million de Da. Il est cependant fragile (pas de liens covalents). Ces gels permettent d'obtenir des séparations de molécules dont les masses vont de 2 000000 à 15000000.

6. **Le Bio-Gel A:** plus au moins l'équivalent au sepharose, Ces gels permettent d'obtenir des séparations de molécules dont les masses vont de 30000 à 15000000.

7. **Fractogel TSk:** c'est un polymère de vinyle.

II.11.2.3.2 Les caractéristiques des gels de la chromatographie d'exclusion

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

- **Le diamètre des pores (la porosité):** Il est fixé par le degré de réticulation du gel qui correspond à la proportion de substrat dans l'ensemble de la phase stationnaire. Il détermine le pouvoir de séparation.
- **L'inertie chimique:** Le gel ne doit pas réagir avec la phase dispersante. Il se dégrade si le pH est inférieur à 2 et supérieur à 8. Donc il doit être inerte chimiquement vis-à-vis des composés de l'échantillon et de la phase mobile.
- **La stabilité physico-chimique:** Le gel doit être résistant à la température et à la pression de l'expérience.
- **La taille et la forme des particules (la granulométrie):** Les particules du gel sont petites de granulométrie de 40 à 300 μm en chromatographie classique et de 20 à 80 μm en haute performance.
- **La forme:** La forme sphérique assure un écoulement uniforme de la phase mobile.
- **La nature:** Les gels peuvent être en dextran, en polyacrylamide ou en agarose.
- **La consistance:** Elle varie selon la nature et le degré de réticulation des gels. On distingue:

- **Les xérogels:** Sont des gels semi-rigides qui ne gardent pas leur forme initiale lorsque la phase dispersante est éliminée.

- **Les aerogels:** Sont des gels rigides intéressants lorsqu'on travaille avec des débits élevés ou sous forte pression.

II.11.2.4 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.

II.11.2.5 Détection

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

II.11.2.6 Les étapes de la chromatographie d'exclusion

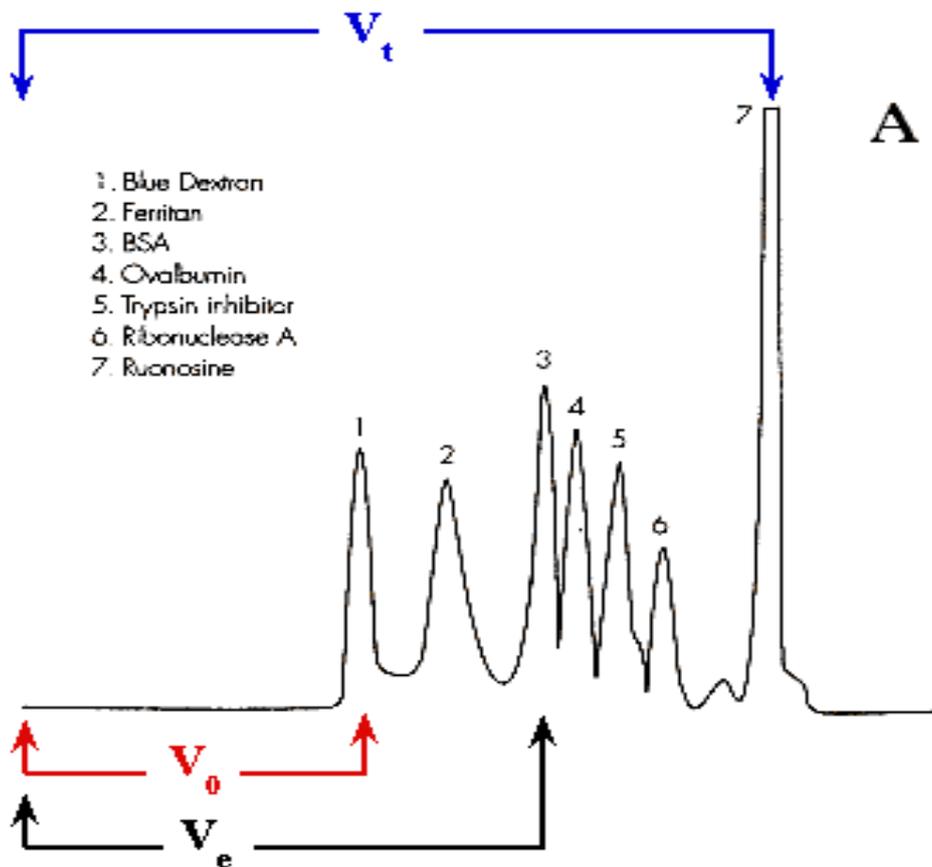
Les différentes étapes de la chromatographie d'exclusion stérique regroupent:

1. Le choix du gel: Il dépend du poids moléculaire des composés à séparer.
2. Le choix de la phase mobile: Le pH et la force ionique de la phase mobile dépendent de la nature des composés de l'échantillon. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire.
3. La préparation du gel: Il existe des gels prêts à l'emploi et des gels qui nécessitent un gonflement par l'eau.
4. Le remplissage de la colonne avec la phase stationnaire.
5. L'équilibration de la colonne: C'est le lavage de la colonne avec la phase mobile (3 fois).
6. L'injection de l'échantillon.
7. L'éluion: Elle se fait avec la phase mobile qui se déplace le long de la phase stationnaire avec un débit bien déterminé selon le poids moléculaire des composés de l'échantillon.
8. La collection des fractions et l'analyse du chromatogramme.
9. La régénération du gel: Pour éliminer les contaminants, le gel est lavé par une solution saline. Le gel est conservé à 2-4°C après addition d'un agent antimicrobien et de conservation (azide de sodium).

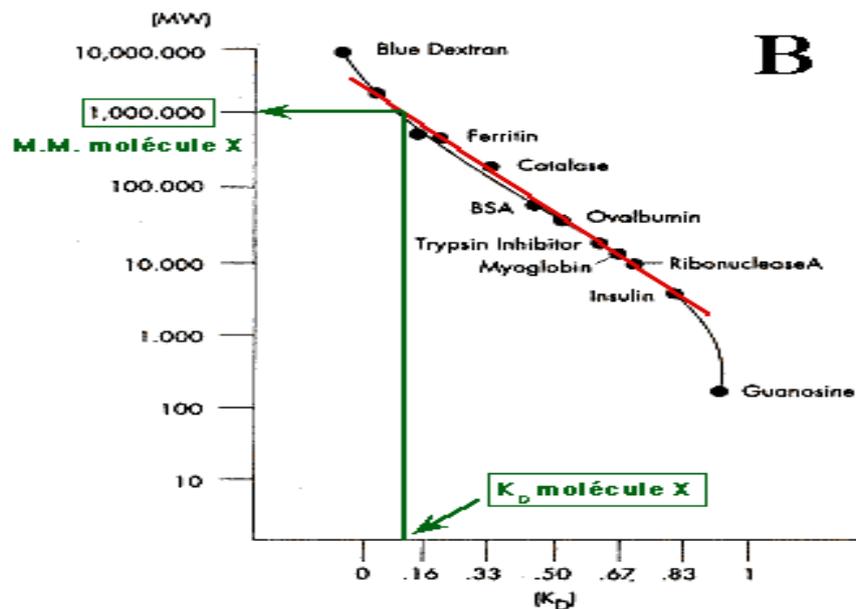
II.11.2.7 La détermination de la masse moléculaire d'une molécule

Un mélange de molécules que l'on appelle standards, est séparé par chromatographie de filtration sur gel (pics d'éluion 1 à 7).

Chaque molécule (caractérisée par un pic d'absorbance, par exemple) est éluée avec un volume d'éluion V_e . Par ailleurs, le volume d'exclusion du gel V_0 est le volume d'éluion d'une molécule non retardée par le gel et qui n'y diffuse pas. On utilise le bleu de dextran de masse moléculaire supérieure à $2 \cdot 10^6$ Da. Le volume total du gel V_t est la somme du volume des billes et du volume externe aux billes. Il est donné par le volume d'éluion d'une molécule qui diffuse totalement dans les billes (donc totalement retardée), ici la ruonosine.



On définit le coefficient de partition : $K_D = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$. On trace la droite étalon : $\log(\text{masse molaire}) = f(K_D)$ (ou $\text{masse molaire} = f(K_D)$) sur une échelle semi-logarithmique, comme représenté ici. Dans les mêmes conditions de chromatographie que pour le mélange des standards, on détermine le volume d'éluion d'une molécule inconnue. La partie linéaire de cette droite (en rouge) permet de déterminer la masse molaire d'une molécule X dont le volume d'éluion a été mesuré dans les mêmes conditions, en reportant son K_D .



II.11.2.8 Les applications de la chromatographie d'exclusion

Il existe deux grands types d'application des filtrations sur gel couramment utilisé en biochimie: les séparations de groupe, pour obtenir une séparation grossière, et le fractionnement moléculaire pour une séparation fine.

La séparation de groupe consiste à séparer les petites molécules des grosses, en deux groupes distincts: les grosses molécules qui sortent dans le volume mort et les autres qui sortent plus tard. Ainsi, la filtration sur gel peut servir au "dessalage" de solutions: séparation brute des protéines d'une solution des molécules de petit poids moléculaire comme les sels (d'où le terme "dessalage"), sucres, acides aminés, etc. Dans ce cas on utilise une résine ayant un petit domaine de fractionnement où toutes les protéines iront dans le volume mort tandis que les sels et autres petites molécules pourront entrer dans les pores du gel. Il est alors facile de recueillir le volume mort contenant les protéines débarrassées des petites molécules.

Dans le fractionnement moléculaire, on sépare un mélange complexe (généralement de protéines) en plusieurs fractions de poids moléculaire spécifique. Le principal usage de ce type de procédure est la détermination de la masse moléculaire des protéines, ce qui est une application "analytique".

II.11.3 La chromatographie en couche mince

La chromatographie planaire, également connue sous le nom de chromatographie sur couche mince (CCM), est une technique complémentaire de la CLHP, ayant sa propre spécificité. Bien que la mise en œuvre de ces deux techniques soit différente, le principe de la séparation et la nature des phases restent les mêmes. Méthode sensible, de faible coût,

pouvant être automatisée, elle est devenue désormais indispensable sachant aussi qu'il est possible de mener plusieurs séparations en parallèle. L'appareillage actuel permet de maîtriser les trois étapes essentielles : le dépôt de l'échantillon, la migration sur la plaque et la mesure de concentration. Appareils et densitomètres automatiques ont ainsi conduit à la nano-CCM, une technique très sensible qui peut être couplée à la spectrométrie de masse.

La chromatographie sur couche mince est essentiellement une technique qualitative, dans quelques cas elle peut être semi-quantitative. Elle utilise une phase stationnaire de papier, d'acétate de cellulose ou de silice. C'est ce dernier type qui est le plus répandu et le plus employé. Pour permettre son utilisation, cette phase stationnaire est fixée à un support souple (polymère, aluminium) ou rigide (verre). Des améliorations de la fabrication et de la qualité de la phase stationnaire ont permis l'émergence de la chromatographie sur couche mince à haute performance ou HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography).

II.11.3.1 Principe

Chromatographie vient du grec « Khrôma » (couleur) et « Graphein » (écrire). La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, **l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile**. La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue **d'une analyse** d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée **éluant**, est un solvant ou un mélange de solvants. On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile.

La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le **phénomène d'élution**, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle **rapport frontal**.

II.11.3.2 Réalisation de la chromatographie

II.11.3.2.1 Préparation de la cuve

un récipient habituellement en verre de forme variable ; fermé par un couvercle étanche afin d'éviter l'évaporation des solvants. Si besoin, préparer le mélange de solvants qui constituera l'éluant, puis en verser dans la cuve à chromatographie afin d'obtenir une hauteur de liquide d'environ 1 cm.

II.11.3.2.2 Dépôt de l'échantillon

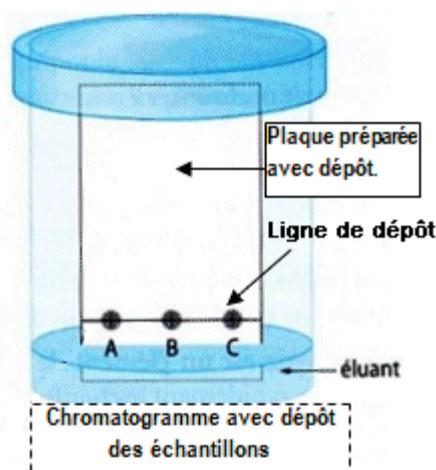
La possibilité de chromatographier simultanément un grand nombre d'analytes constitue l'un des avantages de la chromatographie CCM. L'analyte est déposé au bas de la plaque. On peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte au même endroit. Cette pratique permet de concentrer l'analyte puisque chaque dépôt est séché avant l'application d'un autre. Le bas de la plaque est placée dans la phase mobile.

Pour une meilleure séparation la tache doit avoir un diamètre minimum, environ 5mm pour une analyse qualitative et moins pour une analyse quantitative.

II.11.3.2.3 Préparation de la plaque et l'élution

Marquer avec un crayon l'endroit où est placée la goutte de l'échantillon. Après évaporation du solvant de l'échantillon, la plaque est placée dans un récipient clos (cuve) que l'on sature par de la vapeur du solvant du développement. On immerge une extrémité de la plaque dans ce solvant, en prenant soin d'éviter tout contact direct entre l'échantillon et le solvant. Le solvant grimpe le long de la plaque par capillarité en emportant l'échantillon. Attendre que l'éluant arrive à environ 1 cm du haut de la plaque, puis retirer la plaque et repérer par un trait la hauteur maximale atteinte par l'éluant (c'est la ligne de dépôt). Sécher la plaque (à l'aide d'un sèche-cheveux par exemple).

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.



II.11.3.2.4 Révélation du chromatogramme

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 :

- ✚ l'oeil 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 : l'iode 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 quelque cristaux d'iode dans un récipient; fermé ensuite pour saturé de vapeur.
- ✚ Atomisation : elle consiste à pulvériser un réactif sur la plaque ; ce qui entraîne une destruction ou une altération permanente des composés.

II.11.3.2.5 Quantification

La quantification peut être réalisé en grattant les spots des analytes. L'analyte ainsi récupéré est solubilisé par un milieu organique et est ensuite dosé. Le grattage des spots conduisant à d'éventuelles erreurs, peut être évité par des techniques de mesure de traite, par rapport à un standard de calibration , le signal optique renvoyé par l'analyte à doser. La chromatographie CCM peut être combinée à des techniques diverses comme les spectrométries de masse, infrarouge.

II.11.3.3 Paramètre de séparation

II.11.3.3.1 Rapport frontal

Chaque substance est caractérisée par sa mobilité appelée rapport frontal (Figure 26). Le rapport frontal ou rétention frontale (R_f) de chaque composé est défini par le rapport :

$$R_f = \frac{x}{y} = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté}}{\text{Distance parcourue par le solvant}} \quad (\text{eq.31})$$

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_f avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques; même R_f).

Le schéma ci-dessous montre comment calculer le RF dans le cas d'une chromatographie liquide-liquide ascendante :

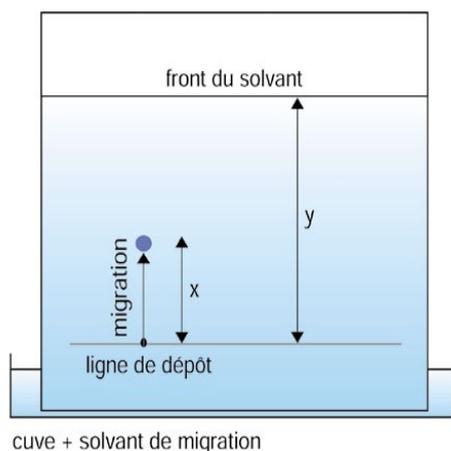


Figure 26: Plaque CCM : calcul du rapport frontal.

II.11.3.3.2 Nombre de plateaux théoriques

On définit l'efficacité N de la plaque pour un composé dont la distance de migration est x et le diamètre du spot w par l'équation 32 et H (HEPT) par l'équation 33:

$$N = 16 \frac{x^2}{\omega^2} \quad (\text{eq.32})$$

La hauteur équivalente à un plateau théorique est donc égale à

$$H = \frac{x}{N} \quad (\text{eq.33})$$

II.11.3.3.3 Facteur de rétention

Pour calculer le **facteur de rétention** k d'un composé ou la sélectivité entre deux composés on fait généralement correspondre les distances de migration sur la plaque aux temps de migration lus sur un chromatogramme. En admettant que le rapport des vitesses u et u_0 de migration sont les mêmes sur la plaque et la colonne (ce qui n'est qu'une approximation), on pourra relier R_f et k :

$$R_f = \frac{x}{y} = \frac{\bar{\mu}}{\bar{\mu}_0} = \frac{t_m}{t_r} = \frac{1}{K+1} \quad (\text{eq.34})$$

$$\text{soit } K = \frac{1}{R_f} - 1 \quad (\text{eq.35})$$

II.11.3.3.4 Résolution

La résolution entre deux spot successive est défini par la relation :

$$R = 2 \frac{x_2 - x_1}{\omega_2 + \omega_1} \quad (\text{eq.36})$$

II.11.3.4 Application de la chromatographie sur couche mince

La chromatographie CCM est employée dans les domaines les plus divers: chimie, biochimie, biologie, agroalimentaire, environnement, pharmaceutique, clinique, toxicologique, médecine légale... Elle permet la séparation et l'analyse de nombreuses substances comme les lipides, les acides organiques, les carbohydrates, les peptides, les phénols, les colorants naturels et synthétiques, les vitamines, les composés inorganiques.....

on peut faire deux types d'applique :

✚ **Application qualitative** : L'identification d'une substance inconnue peut être présumée en comparant son R_f avec celle de composés connus, déposés sur le même chromatogramme. Cependant, une confirmation s'avère toutefois toujours nécessaire.

✚ **Application quantitative** : Il existe différentes méthodes qui permettent une analyse quantitative d'un soluté en chromatographie planaire.

Une estimation semi-quantitative de la quantité d'un composant présent peut être obtenue par comparaison de l'aire de la tache avec celle d'un étalon. La mise en solution la tache et détermination de sa concentration par une méthode appropriée (spectrophotométrie, spectrofluorimétrie...).

Mesure des propriétés de réflexion ou de fluorescence de la tache à l'aide d'un densimètre.

✚ **Etude préliminaire à la chromatographie liquide haute performance (CCM)** : La CCM permet la mise au point de système chromatographique pouvant être ensuite transposés et adaptés sous certaines conditions à la chromatographie sur colonne.

II.11.4 Chromatographie en phase gazeuse

Cette technique, appelée aussi GLC (gaz liquide chromatography), est basée sur la répartition des analytes entre un liquide et une phase gazeuse. Elle est largement utilisée aussi bien comme une méthode qualitative et quantitative d'un grand nombre d'analytes, du fait de sa haute sensibilité, de sa reproductibilité et de sa rapidité. C'est la technique appropriée pour la séparation d'analytes à faible polarité.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation applicable aux composés gazeux ou susceptible d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition (dont la masse moléculaire $MM < 300$) ; les constituants peuvent différer par leur nature et leur volatilité. La séparation exige des quantités de l'ordre de mg seulement; parfois même de μg .

On distingue selon la phase stationnaire:

✚ **La chromatographie gaz-liquide:** c'est une chromatographie de partage, la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage. Elle est basée sur le partage des constituants à séparer (les solutés) entre une phase gazeuse mobile inerte appelé gaz vecteur et une phase liquide fixée sur la surface d'un support poreux inactif. Cette dernière est très utilisée dans de nombreux domaines, son nom est parfois abrégé en **chromatographie en phase gazeuse**.

✚ **La chromatographie gaz-solide:** c'est une chromatographie d'adsorption la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition. Peu utilisée en raison des trainées dans les pics d'élutions provoquées par la non linéarité du processus d'absorption.

II.11.4.1 Principe d'une installation de CPG

Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée (figure 27). La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé *gaz vecteur*. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande répétabilité des temps de rétention.

La phase stationnaire est constituée d'un liquide à base de silicone qui imprègne une matrice solide, inerte et granuleuse. L'essentiel est contenu dans une colonne d'acier ou de verre de 1 à 3 m de long et de 2 à 4 mm de diamètre. La phase mobile est constitué d'un vecteur inerte. La colonne est maintenue à une température élevée par l'intermédiaire d'un four. Sous l'effet de la température les analyses sont volatilisés et peuvent être séparés. La base de cette séparation correspond à la différence des coefficients de partage des analytes volatilisés entre la phase liquide et la phase gazeuse.

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire. Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre. Certains modèles de chromatographes ont une alimentation autonome ainsi qu'une taille réduite pour faciliter l'emploi en milieu extérieur, sur le terrain.

En CPG il y a quatre paramètres opérationnels pour une phase stationnaire donnée : L , longueur de la colonne et u , vitesse de la phase mobile (qui conditionnent N), T température de la colonne et b rapport de phase (qui conditionnent k). Les réglages du chromatographe permettent d'agir sur T et sur u , donc sur l'efficacité et sur les facteurs de rétention.

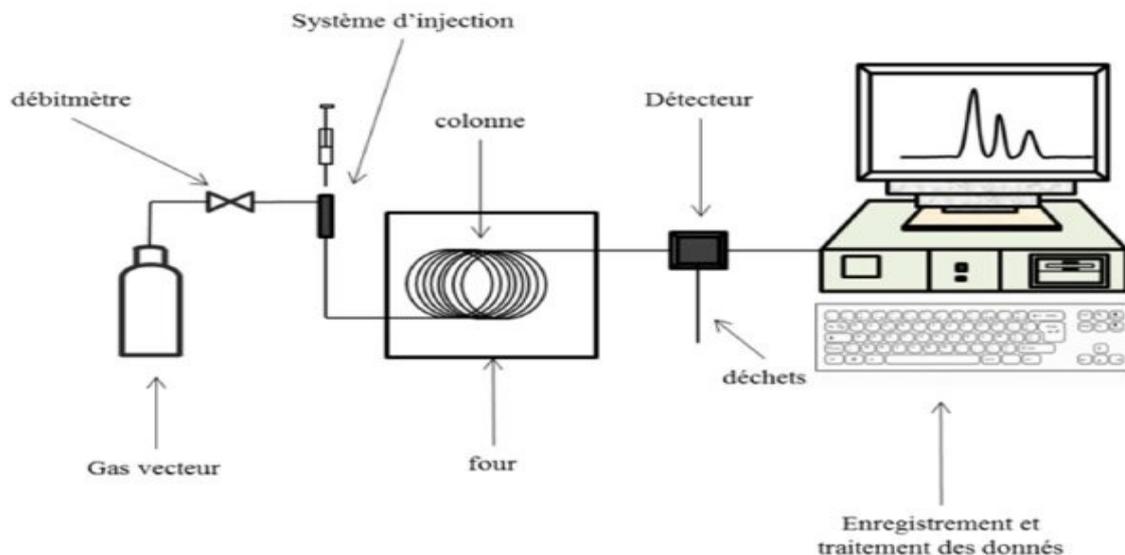


Figure 27: (a) et (b) schéma et photo d'une installation de CPG

II.11.4.2 Quels sont les facteurs de séparation des analytes en CPG ? Ils sont de deux ordres :

a) la volatilité (il suffira de comparer les valeurs de point d'ébullition des différents analytes à séparer) différente des analytes. La phase mobile est un gaz, elle ne permet donc l'avancement que des analytes qui sont à l'état gazeux à un instant donné. Ainsi, plus un analyte est volatil, plus son élution sera rapide toutes choses étant égales par ailleurs.

b) les interactions (faibles) plus ou moins importantes entre les analytes et la phase stationnaire :

- interactions faibles de surface de type **adsorption** en CPG gaz-solide
- **solubilisations différentielles** dans la phase stationnaire liquide en CPG gaz-liquide

On retiendra donc le couple (volatilité de l'analyte, interactions analyte-phase stationnaire) comme étant le couple permettant de caractériser le comportement d'un analyte.

II.11.4.3 Gaz vecteur

L'élution est assurée par un flux de gaz inerte appelé gaz vecteur ou porteur (phase mobile). Le gaz vecteur doit être pur, inerte (il ne doit pas réagir avec les constituants du mélange à séparer) et le moins miscible possible avec la phase stationnaire. L'hélium est le gaz porteur le plus courant, bien que l'on utilise aussi l'argon, l'azote et l'hydrogène.

Ils proviennent soit d'un cylindre sous pression soit d'un générateur (électrolyse de l'eau pour H₂ et séparation de l'air pour N₂), ce qui a l'avantage de fournir sur place un gaz très pur. Ce gaz vecteur doit être exempt de traces d'hydrocarbures, de vapeur d'eau et de dioxygène qui se comportent comme des impuretés préjudiciables pour certaines phases stationnaires polaires et qui réduisent la sensibilité des détecteurs. C'est la raison pour laquelle on place un double filtre, desséchant et réducteur, juste en amont du chromatographe.

La nature du gaz vecteur ne modifie pas de manière significative les valeurs des coefficients de distribution K des composés par suite de l'absence d'interaction entre gaz et solutés, la température étant le seul facteur de modification important. En revanche, la viscosité et la vitesse du gaz dans la colonne ont une influence sur la dispersion des composés dans la phase stationnaire et sur la diffusion dans la phase mobile (*cf.* équation de Van Deemter), donc sur le paramètre d'efficacité N et sur la sensibilité de la détection.

Catharomètre : N₂, H₂, He

Capture d'électron : N₂ ou H₂

ionisation de flamme : N₂

Il n'y a pas d'interaction entre le soluté et la phase mobile en CPG.

II.11.4.4 Échantillons

Les limites de sensibilité sont, selon les appareils, de l'ordre du nanogramme et même du picogramme. Le traitement de l'échantillon varie selon les substances analysées :

- Lorsque les *solutés sont directement volatilisables*, les substances sont *solubilisées dans un solvant et chromatographiées*.
- Lorsque les solutés ne sont *pas volatils* à la température du chromatographe ou bien sont décomposés à cette température, *il faut les transformer en dérivés volatils stables* : les acides

aminés sont ainsi estérifiées par le butanol, les acides gras estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés.

II.11.4.5 Injecteur

L'injecteur est la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe par l'intermédiaire d'une **micro-seringue** dont la capacité varie habituellement de 1 à 10 μL pour les liquides et les solutions. ou bien l'aide d'une **vanne à boucles** pour les mélanges gazeux. Il a deux autres fonctions : *vaporiser* et *entraîner* en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur. Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes auxquels ils sont réunis. La qualité des séparations dépend de cette phase de l'analyse.

Le choix de l'injecteur est dicté par le type de colonne utilisée (remplie ou capillaire) et par la nature des produits à séparer (leur résistance à la décomposition lorsqu'ils sont soumis à de hautes températures).

II.11.4.5.1 Injecteur à vaporisation directe

Il consiste en un tube métallique doublé d'un chemisage de verre (appelé *insert*), balayé par le gaz vecteur et chauffé à la température moyenne d'ébullition des composés à chromatographier. L'aiguille de la microseringue contenant l'échantillon traverse l'une des extrémités de l'injecteur obturée par une pastille d'élastomère siliconé (le *septum*). L'autre extrémité est raccordée à la colonne également chauffée (figure 28). La totalité de l'échantillon introduit, immédiatement vaporisé, part dans la colonne en quelques secondes. Cette méthode convient pour les colonnes remplies et les grosses colonnes capillaires, quand le débit de gaz vecteur atteint au moins 8 mL/min.

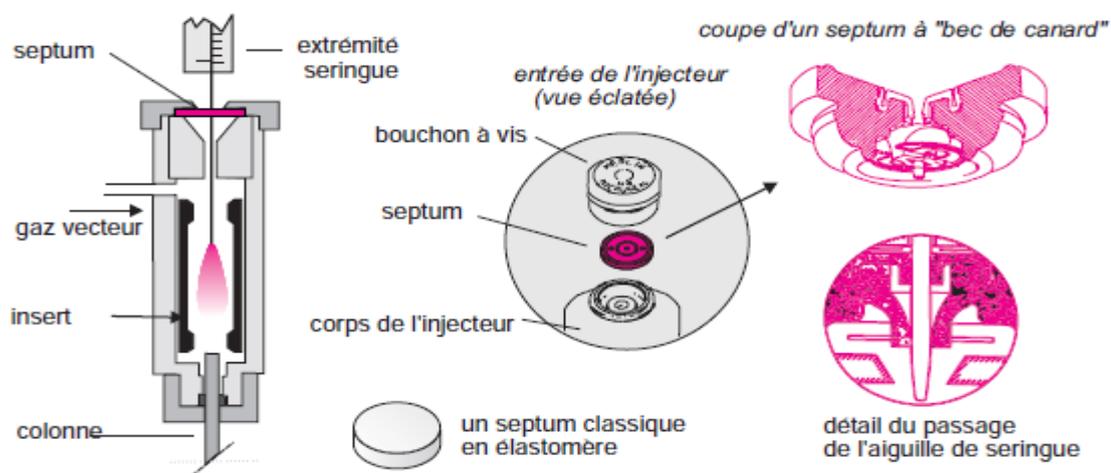


Figure 28: Injecteur à vaporisation directe utilisé pour colonnes remplies. Schéma de base d'un modèle classique à septum. A droite une variante de septum.

II.11.4.5.2 Injecteur avec ou sans division

Pour les *colonnes capillaires*, à faible capacité d'échantillon, les plus petits volumes qu'il est possible de prélever avec une microsiringue (0,1 ml) peuvent saturer la colonne. On utilise alors des injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, *avec* ou *sans division* (encore appelés *split* ou *splitless*).

En mode split, le gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation ; une vanne de fuite sépare le courant gazeux en deux parties dont la plus petite est la seule à pénétrer dans la colonne. Seulement 1% de l'échantillon injecté passe réellement sur la colonne. L'autre partie (99%) s'échappe par un système de fuite. Ce mode est utilisé dans le cas des colonnes capillaires à faible débit.

L'inconvénient de ce mode d'injection est l'évaporation sélective des composés les plus volatils avec modification de la composition réelle de l'échantillon injecté.

Le mode splitless, la solution injectée est volatilisé puis entraîné dans les premières spires de la colonne capillaire où elle se condense. L'injecteur est ensuite balayé par le gaz vecteur qui élimine l'excès de solvant. Ce procédé est réservé aux échantillons très dilués.

II.11.4.6 Four

Le chromatographe comporte une enceinte thermostatée qui permet de chauffer la colonne jusqu'à plus de 400 °C. Elle doit avoir une faible inertie thermique pour permettre une montée contrôlée et rapide en température (rampe pouvant aller jusqu'à 100 °C/min) et une excellente stabilisation (au 1/10 de °C). En adjoignant une vanne cryogénique alimentée par N₂ ou CO₂ liquides, l'enceinte peut être réglée à basse température.

II.11.4.7 Colonnes

Il existe deux types de colonnes, les colonnes *remplies* (ou colonnes à *garnissage*) et les colonnes *capillaires* (figure 29). Elles n'offrent pas les mêmes performances.

II.11.4.7.1 Les Colonnes remplies (à garnissage)

Elles sont faites avec des tubes spiralés le plus souvent en acier ou plus rarement en verre, de diamètre intérieur de 2 à 6 mm, ont une longueur comprise entre 1 et 3 m et sont enroulées sous forme hélicoïdale. Elles sont remplies d'un support poreux, inerte et stable à température élevée, imprégné de 5 à 20% de phase stationnaire. Le support le plus utilisé est la terre de diatomées (silicates fossiles).

II.11.4.7.2 Les colonnes capillaires

Elles ont un diamètre interne variant entre 0,05 et 0,35 mm et une longueur comprise entre 10 et 50 m enroulés en spirale. Elles sont revêtues d'une couche de polymère ou d'un

film d'aluminium et sont enroulées sur un support métallique cylindrique léger, en forme de cage. Il n'y a alors pas de remplissage: la phase stationnaire ou l'adsorbant est déposée ou greffée sur la paroi interne de la colonne.

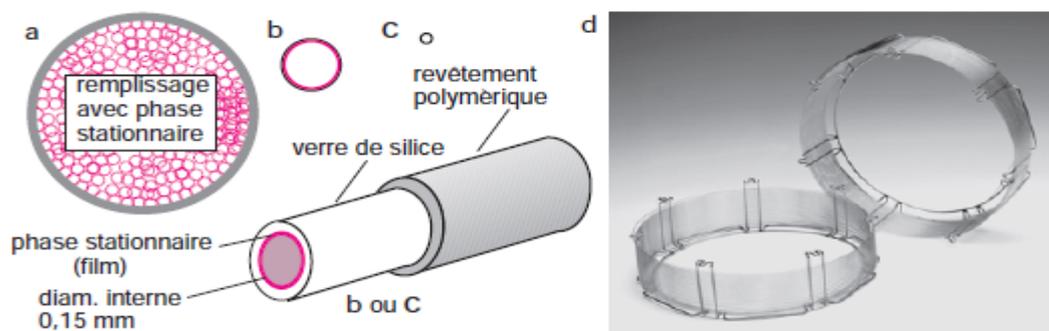


Figure 29: Colonnes en CPG.

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

II.11.4.8 Phases stationnaires

Il est nécessaire que toute phase stationnaire doit être non volatile et thermiquement stable. En effet, une élévation de la température peut occasionner une perte de phase stationnaire par volatilisation, occasionnant ainsi la contamination du détecteur et une instabilité de la ligne de base.

Les phases stationnaires les plus utilisées sont des polyéthylène glycols, des méthylphényles ou des méthylvinylsilicones (sorte de gommes). Pour la séparation chirale, les esters des acides adipique, succinique ou phtalique ainsi que des phases à base de β -cyclodextrines sont généralement employés.

II.11.4.9 Les systèmes de détecteurs

On peut répartir les détecteurs en deux groupes, ceux qui conduisent aux seuls temps de rétention, et ceux qui donnent, en outre, des informations structurales sur les composés détectés. Tous les détecteurs donnent une réponse qui dépend de la concentration molaire ou massique du soluté dans le gaz vecteur. Plusieurs détecteurs peuvent être associés en série.

II.11.4.9.1 Détecteur à conductibilité thermique (TCD) ou catharomètre

Ce détecteur universel, mis au point dès les débuts de la CPG, est longtemps resté incontournable. Sa miniaturisation permet de l'utiliser aussi bien pour les colonnes remplies que pour les colonnes capillaires.

Son principe repose sur la mesure des variations de conductibilité thermique des mélanges gazeux en fonction de leur composition. Il s'agit d'un *catharomètre* comportant deux thermistors identiques, placés dans deux minuscules cavités d'un bloc métallique thermostaté à une température supérieure à celle de la colonne (figure 30). L'un d'eux est baigné par le gaz vecteur prélevé en amont de l'injecteur et l'autre par le gaz vecteur en aval de la colonne.

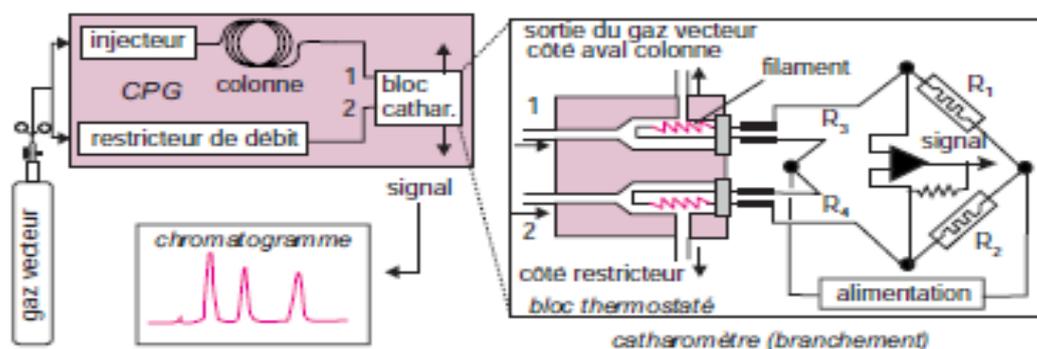


figure 30: Détecteur à conductibilité thermique.

II.11.4.9.2 Détecteur à ionisation de flamme (DIF)

Considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques, c'est le détecteur par excellence de la CPG actuelle. Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans la flamme d'un petit brûleur alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées, responsables du passage d'un courant ionique extrêmement faible (10^{-12} A) entre deux électrodes (d_{dp} de 100 à 300 V). L'extrémité du brûleur sert d'électrode de polarisation (masse). La seconde électrode, de forme annulaire, entoure la flamme. Le signal est amplifié par un électromètre en une tension mesurable. L'avantage de ce détecteur est que les variations de débit de la phase mobile ont peu d'influence sur la réponse.

II.11.4.9.3 Détecteur thermoionique (NPD)

Ce détecteur est très sensible aux composés azotés (N) ou phosphorés (P). Il comporte un petit cylindre en céramique dopée avec un sel alcalin (ex. sulfate de rubidium) auquel on applique une tension électrique pour entretenir un petit plasma ($800\text{ }^{\circ}\text{C}$) alimenté par combustion d'un mélange air/hydrogène. À la différence du FID la flamme est plus petite. Les composés contenant N ou P donnent, assez spécifiquement, des fragments de décomposition transformés en ions négatifs. Ces ions sont recueillis sur une électrode collectrice. Le diazote de l'air est inactif. La sensibilité est typiquement de $0,1\text{ pg/s}$ pour N ou P. Il est très employé pour l'analyse de pesticides organophosphorés.

II.11.4.9.4 Détecteur à capture d'électrons (ECD)

Un détecteur de capture d'électrons (ECD) est un dispositif destiné à détecter des atomes et des molécules dans un gaz à travers la fixation d' électrons par ionisation de capture d'électrons . Il est d'une très grande sensibilité pour les composés électronégatifs (dérivés halogénés, nitrés, cyanés...).

Le gaz vecteur entrant dans le détecteur est ionisé par des particules β émises par une source radioactive composée de ^{63}Ni . Les électrons produits sont freinés par le gaz vecteur et recueillis par une électrode centrale. Lorsque passe un produit ionisable, il capte une partie des électrons et s'ionise en anion diminuant d'autant le courant reçu par l'électrode. C'est ce courant qui est mesuré et amplifié.

II.11.4.9.5 Détecteur à photo-ionisation (PID)

Ce détecteur assez sélectif mais peu répandu, convient aux hydrocarbures ainsi qu'aux dérivés contenant S ou P. Le principe consiste à irradier le composé élué avec une lampe UV émettant des photons très énergétiques. La photo-ionisation se produit quand l'énergie du photon est supérieure à l'énergie de 1re ionisation du composé. Il s'agit d'un détecteur qui peut fonctionner à plus de 400 °C et qui n'est pas destructif, l'ionisation étant réversible et ne touchant qu'une faible fraction des molécules de chaque composé.

II.11.4.9.6 Détecteur à émission atomique

Les composés en sortie de colonne débouchent dans un plasma à micro-ondes dont la température est suffisante pour créer les conditions rencontrées dans un appareil à émission atomique. Chaque atome présent dans les solutés élués donne des radiations caractéristiques qui permettent de l'identifier

II.11.4.9.7 Détecteur de masse

Le spectromètre de masse est un des détecteurs les plus puissants pour la chromatographie gazeuse. On appelle GC-MS (Gaz Chromatography-Mass Spectroscopy) la combinaison de la chromatographie gazeuse et de la spectrométrie de masse. Un spectromètre de masse mesure le rapport masse sur charge (m/z) des ions qui ont été produits à partir de l'échantillon par une source d'ionisation qui est assez énergétique pour briser des liaisons chimiques dans les molécules de l'échantillon et forme beaucoup de fragments ; qui sont très utiles pour identifier l'espèce moléculaire qui entre dans le spectromètre de masse à partir du spectre de fragmentation ou par comparaison avec bibliothèque de spectre.

II.11.4.10 Applications

La chromatographie en phase gazeuse sert surtout pour l'analyse de liquide thermiquement stables et assez volatils (point d'ébullition < 250°C) et pour séparer les petites molécules avec des quantités de l'ordre de quelque picogrammes.

II.11.5 Chromatographie liquide à haute performance

Parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide, la chromatographie Liquide haute performance est la plus connue. Son champ d'application Recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire.

La *chromatographie liquide haute performance*, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées. Ces phases, constituées de la réunion de micro-particules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 micromètres ou de matériaux monolithiques poreux conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable. Pour marquer cette particularité de la technique, la lettre P du sigle CLHP a pendant longtemps correspondu au mot *pression*. Le «P» du sigle, à l'origine signifiait Pression mais lorsque la méthode a été améliorée (réduction des particules et régulation de la phase stationnaire) le «P» a donc été attribué à Performance afin de marquer cette innovation

II.11.5.1 Appareillage

Un appareil CLHP (Figure 31) comporte différents modules: un réservoir contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur à travers lesquels un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer et un système d'acquisition de données. Il nécessite également un dispositif de dégazage. Les différents modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm).

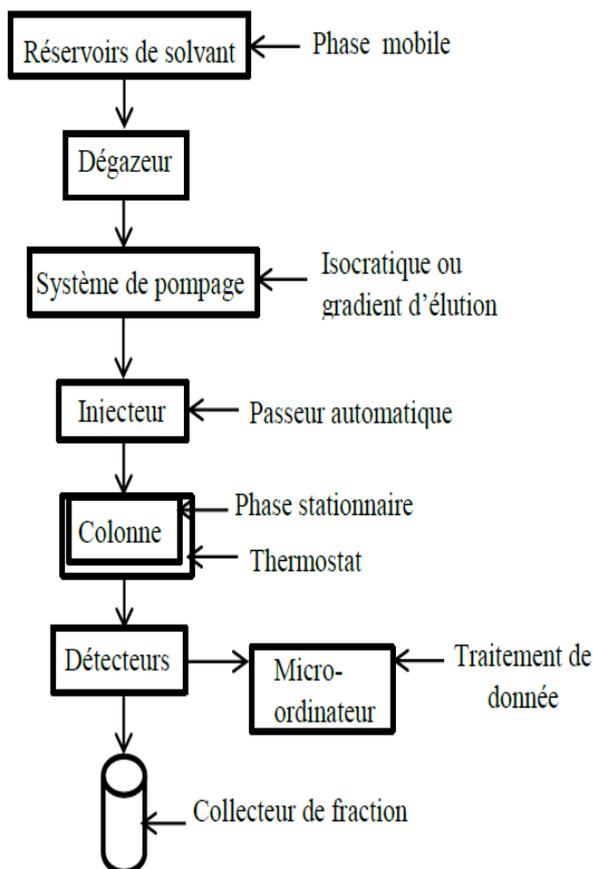


Figure 31: Schéma d'un système de chromatographie en phase liquide haute performance.

II.11.5.2 Etude détaillée des éléments d'un appareil HPLC

II.11.5.2.1 Réservoir de solvant (éluant)

Le Réservoir est en verre ou bien en inox (Volume = 0,5 à 2L). Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

Il est recommandé de toujours employer des solvants traité spécifiquement pour CLHP. Ils doivent être dégazé et filtré avant usage sur filtre spécial (0,45 μm). Le choix du solvant constitue habituellement la partie la plus difficile de ce type de chromatographie.

II.11.5.2.2 Dispositif de dégazage

Durant le pompage, dans la chambre de mélange ou dans la colonne elle-même, si les solvants ne sont pas dégazés, l'air dissout dans le liquide soumis à de forte pression, forme des bulles à l'intérieur du système, c'est là un inconvénient majeur pour le fonctionnement de la plupart des détecteurs en particulier ceux qui utilisent des propriétés optiques. En règle générale, plus le liquide est polaire, plus la tendance de l'air à se dissoudre est forte. Il

convient donc d'éliminer au maximum l'azote et l'oxygène qui peuvent être présents. Le dégazage de la phase mobile se fait par barbotage d'hélium, par ultrasons ou par un dégazeur.

II.11.5.2.3 Pompes pour éluants

La pompe d'un chromatographe a pour rôle d'assurer l'écoulement de la phase mobile dans la colonne. Tout appareil CLHP comporte au moins une pompe en **mode isocratique** (éluant de composition fixe tout au long de l'analyse donc la phase mobile peut être préalablement préparée et disposée dans un seul réservoir) ou en **gradient d'éluion** (éluant de composition variable) (figure 32). L'éluion gradué lors de la séparation de mélanges complexes permet, en modifiant la composition de l'éluant, d'optimiser les facteurs de capacité et de réduire les temps d'analyse. Les pompes les plus utilisées sont les pompes de types piston avec lesquelles les débits sont constants, la pression peut atteindre environ 500 bars (figure 33).

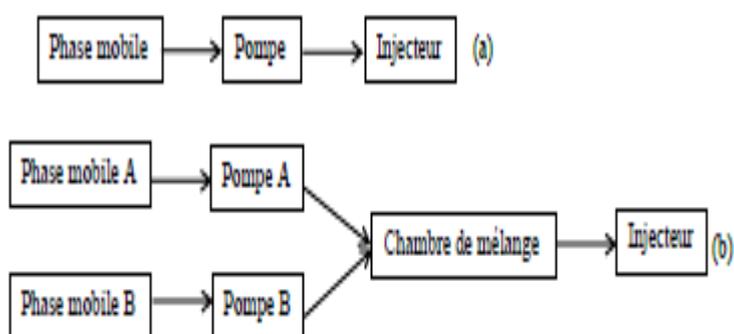


Figure 32: Représentation schématique d'un système de pompage
(a) mode isocratique (b) mode gradient d'éluion.

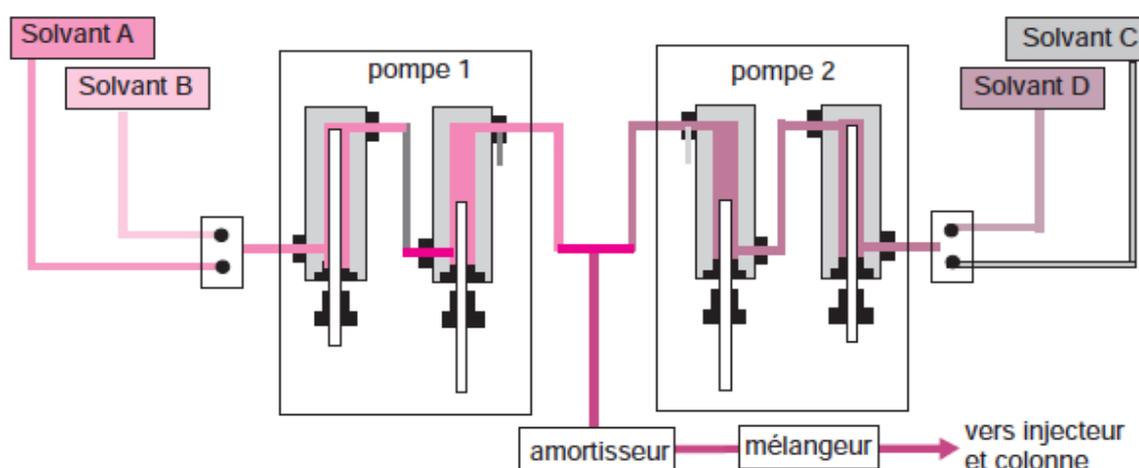


Figure 33: Exemple de configuration pour gradient haute pression.

Les pompes sont appelées binaires, ternaires, quaternaires suivant le nombre de solvants qu'elles peuvent mélanger (ici binaires).

II.11.5.2.4 Injecteurs

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne (figure 34). Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 30 000 kPa.



Figure 34: Vanne d'injection pour CLHP et boucles assorties.

Vanne vue de l'arrière (vanne à 6 entrées/sorties avec une boucle raccordée) et assortiment de boucles de différents volumes.

Elle fonctionne en deux temps:

- Dans la position *chargement*, où seule la communication entre pompe et colonne est assurée (figure 35), l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé *boucle*. Celle-ci, dont il existe tout un choix de volumes, est soit extérieure, soit intégrée dans le corps de la vanne.
- Dans la position *injection*, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60 ° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle.

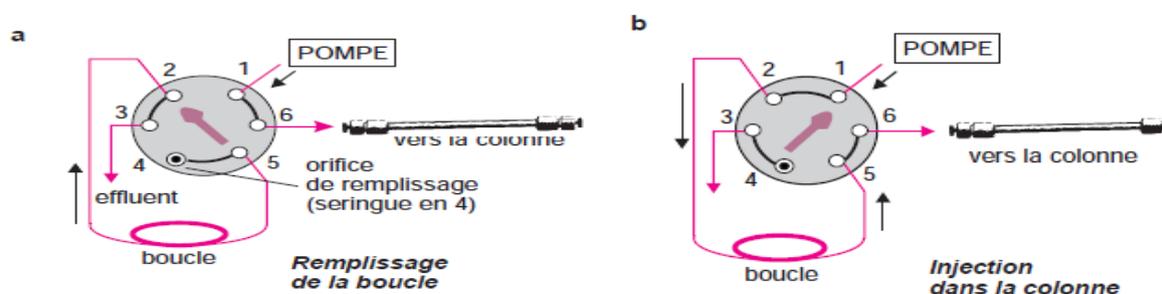


Figure 35: Injection avec une boucle.

- a) Remplissage de la boucle. Dans cette étape, la seringue est introduite à la position n° 4 ; b) injection dans la colonne (noter la nouvelle position de la manette).

II.11.5.2.5 Colonne

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Les colonnes « standard » dont le diamètre interne (DI) est d'environ 4,5 mm et la longueur de 10 cm, sont de plus en plus supplantées par des colonnes de plus faibles diamètres. La colonne est souvent précédée d'une précolonne, dite *colonne de garde*, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés (figure 36). On augmente ainsi la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances.

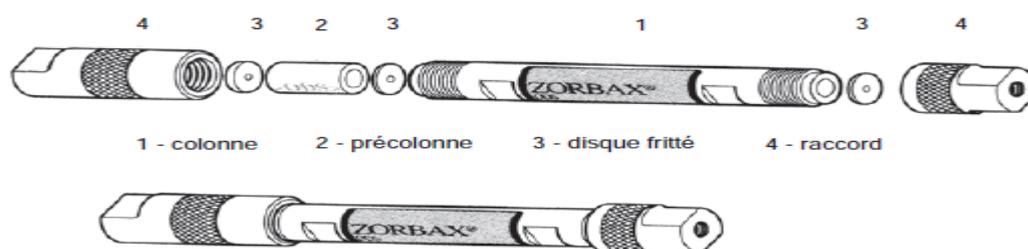


Figure 36: Colonne standard et précolonne de CLHP.

Les écarts de température modifiant les temps de rétention, les appareils actuels permettent de thermostatier la colonne (figure 37) et l'éluant, à la fois pour assurer la répétitivité des analyses et pour faire intervenir éventuellement la température comme paramètre de séparation.

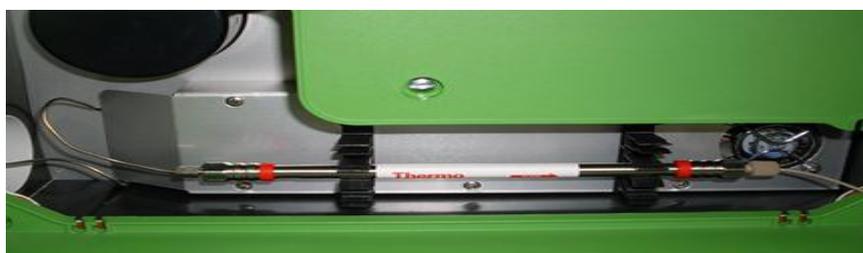


Figure 37: Colonne dans un thermostat.

III.5.2.6 Phase stationnaire

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par voie de conséquence d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées.

✚ Phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

Ce matériau de base est un solide amorphe ayant pour formule de composition

$\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$. Le gel de silice n'a pas la structure ordonnée de la silice cristalline, mais il reste néanmoins bâti autour de l'agencement tétraédrique des quatre liaisons issues de l'atome de silicium. C'est un polymère inorganique réticulé. Il comporte des *groupements silanols*, Si-OH en nombre variable, qui ont résisté à la phase finale de déshydratation thermique (figure 38).

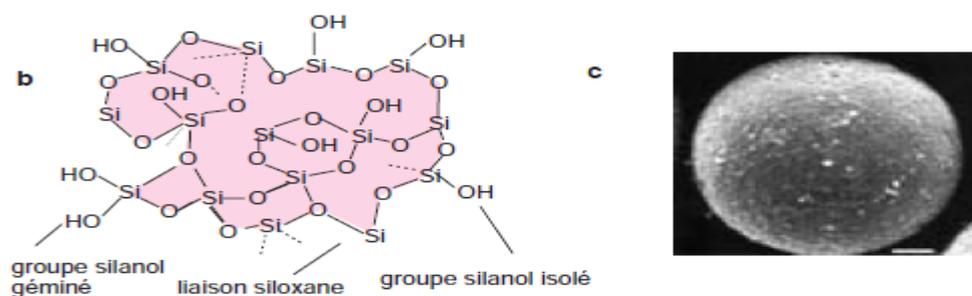


Figure 38: Le gel de silice pour chromatographie.

Ces groupements sont responsables des propriétés catalytiques acides de ce matériau très polaire car Si-OH a un pK de 10, comparable à celui du phénol.

Le gel de silice comporte des pores de tailles différentes. Pour remplir la colonne d'une manière homogène, il est préparé sous forme, soit de microparticules sphériques, soit d'un monolithe poreux. Il est nécessaire en effet d'éviter la formation de chemins préférentiels pour la phase mobile et par suite pour les composés qui y sont dissous.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

✚ Phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18)(figure 39). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

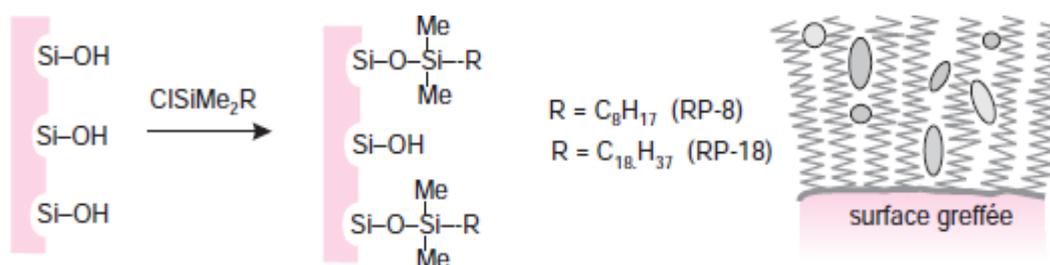


Figure 39: Gel de silice greffé.

II.11.5.2.7 Phase mobile

Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire et vice-versa. La chromatographie est dite *en phase normale* dans le premier cas et à *polarité de phase inversée* (« R – HPLC »). dans le second.

Sachant que la plupart des applications actuelles font appel à des gels de silice transformés, peu polaires, de nature plutôt hydrophobe, on choisit comme phases mobiles des mélanges d'eau et d'un modifiant tel le méthanol ou l'acétonitrile. En changeant la composition de la phase mobile, donc sa polarité, on agit par l'intermédiaire des coefficients de distribution K (CS/CM) sur les facteurs de rétention k des composés (figure 40). La difficulté pour le chromatographe est de faire le bon choix en fonction des composés à séparer (figure 41).

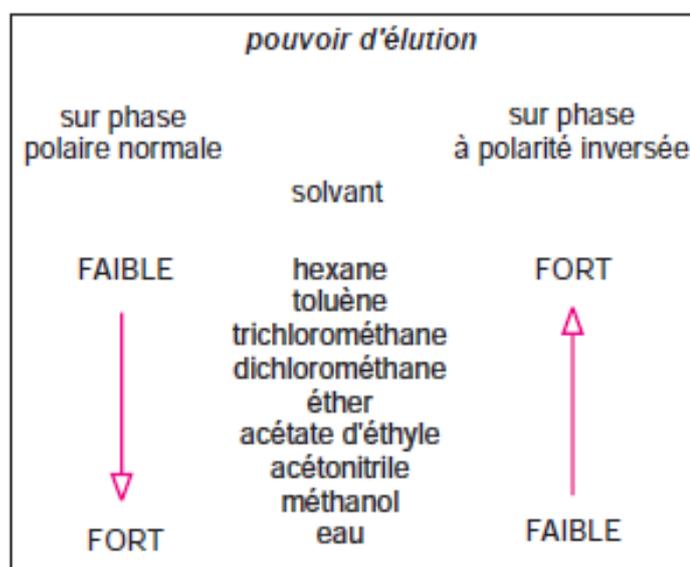


Figure 40: « Force » des solvants utilisés comme phases mobiles.

- **Chromatographie "normale"** : Les composés les plus polaires sont davantage retenus.
- **Chromatographie "inverse"** : Les composés les plus polaires sont élués en premier.

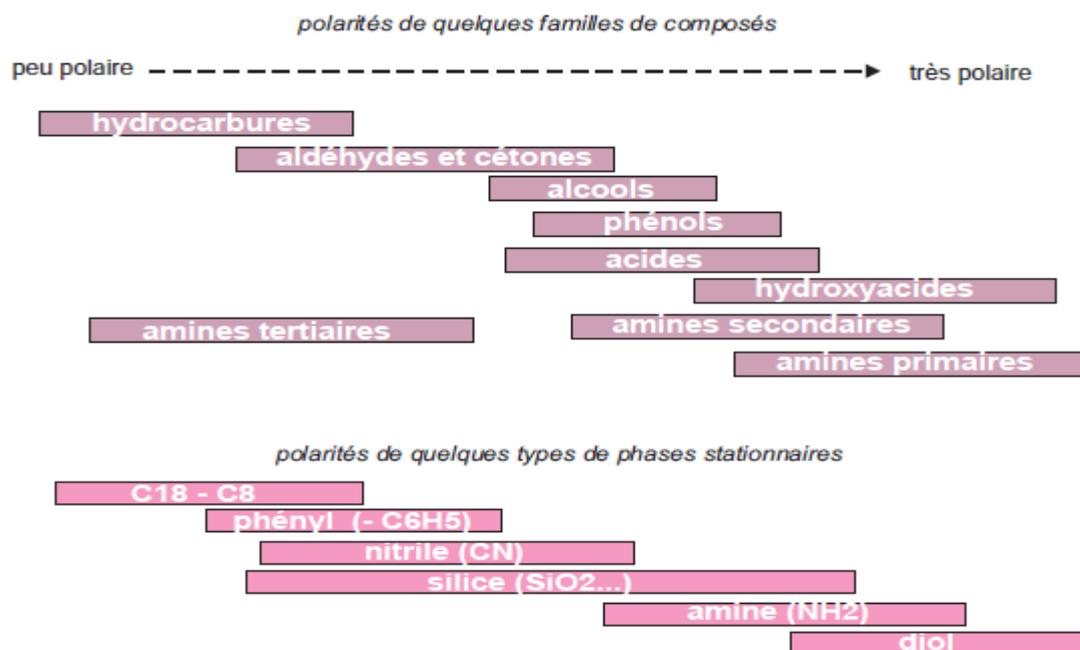


Figure 41: Polarités de quelques familles de composés organiques ainsi que des principaux types de greffons des phases stationnaires actuelles.

Avec une phase stationnaire dont la partie active ressemble à une couche paraffinique, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. En revanche, les composés polaires sont assez difficiles à séparer entre eux. Il faut réaliser des gradients d'élution en diminuant progressivement au cours du temps la concentration en eau (polaire) au profit du modifiant choisi (moins polaire). On commencera par exemple avec un mélange 80/20 % eau/acétonitrile pour terminer à la composition de 40/60 %. C'est le domaine de la chromatographie d'interaction hydrophile.

II.11.5.2.8 Détecteurs

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule.

Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés: absorption, fluorescence et indice de réfraction.

Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

1. réfractomètre différentiel
2. UV à barrette de diodes
3. électrochimique
4. fluorimétrie...

ainsi que différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse
- Résonance Magnétique Nucléaire...

II.11.5.3 Applications

Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse:

- ✓ Des composés thermosensibles.
- ✓ Des composés très polaires.
- ✓ Ainsi que des composés de masses molaires élevées.

III. Electrophorèse

L'origine de cette technique a été imaginée par S.E. Linder et H. Picton en 1892. Ils se sont inspirés des études de Hermann Von Helmholtz menées sur l'électro-osmose. Celui-ci constate qu'il est possible, sous un champ électrique, de déplacer des particules chargées vers le pôle de signe opposé à leur charge.

En 1937, Ame Wilhelm Kaurin Tiselius, met au point la première électrophorèse: l'électrophorèse libre. Cette technique lui a permis de séparer les protéines du sérum sanguin en appliquant un champ électrique. La solution est placée dans un tube en U de section carrée afin de réaliser des mesures optiques au travers du tube. Il a pu obtenir sur le pôle positif des protéines de charge très négative comme l'albumine et sur le pôle négatif des protéines de charge plus positive comme les globulines.

En 1939, P. König et D Von Klobusitzky ont séparé avec succès les composants du venin de serpent en élaborant la technique d'électrophorèse sur papier.

En 1952, Pierre Grabar élabore, en collaboration avec C.A. Williams, une méthode d'analyse immuno-électrophorétique, qui permet d'analyser des mélanges très complexes d'antigènes. Dès la première application de cette méthode à l'analyse du sérum sanguin humain, il parvient à déceler dans le sérum plus de 30 constituants indépendants, alors que l'électrophorèse en veine liquide ou sur papier ne permettait d'isoler que 5 ou 6 groupes de protéines.

En 1955, O. Smithies met au point l'électrophorèse en gel d'amidon.

En 1957, Joachim Kohn sépare les phénotypes de l'hémoglobine en élaborant la technique d'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose.

En 1969, Beber et Osborn introduisent l'agent dénaturant SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pour séparer les différentes sous-unités protéiques.

L'électrophorèse est une technique permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective: Les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode. Pour les molécules non chargées, il n'existe pas de migration. Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions diffèrent, ce qui permet leur séparation.

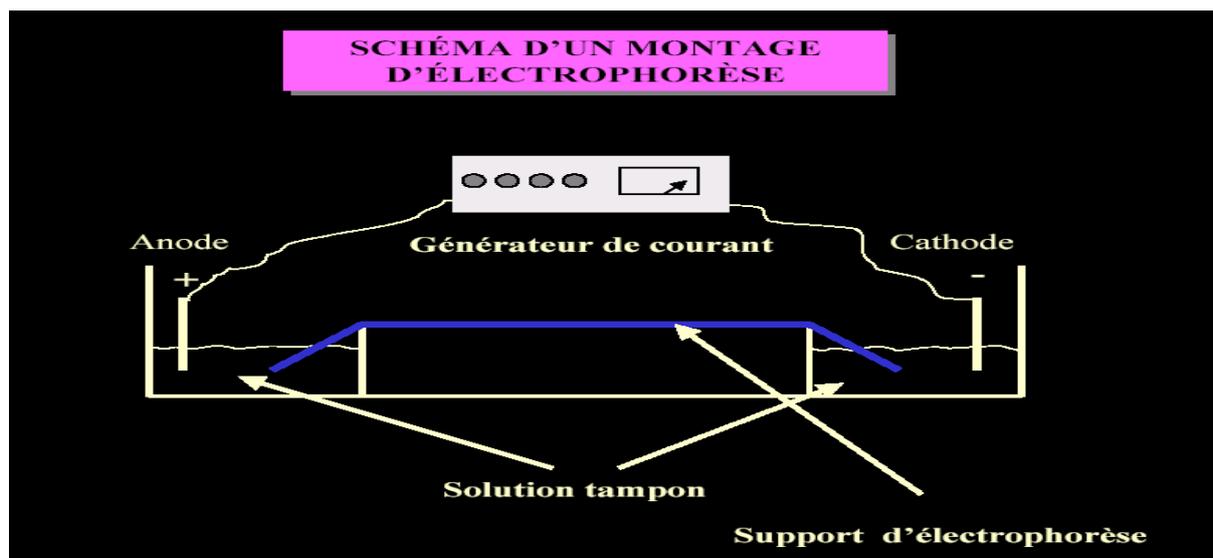


Figure 42: Schéma d'un montage d'électrophorèse.

III.1. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative plus récente que la chromatographie. Elle se caractérise par un grand pouvoir de séparation, et par la possibilité de quantifier aussi bien les petites molécules que les biomolécules (protéines) difficilement séparées par la HPLC. Elle repose sur la migration dans un champ électrique et au contact d'un support approprié, des espèces présentes dans l'échantillon en solution, porteuses ou non d'une charge électrique globale. Le capillaire est en verre de silice de très faible diamètre (10 à 100 μm), ouvert à ses extrémités, sa paroi interne est chargée négativement, principalement par l'ionisation des groupes silanol. Ce capillaire, d'une longueur L variant entre 40 et 100 cm, est rempli d'un électrolyte tampon et soumis à un champ électrique continu. La différence de potentiel appliquée peut atteindre 600 V/cm, mais l'intensité ne doit pas dépasser une centaine de microampères, pour que la puissance dissipée reste inférieure à 3W. Afin de limiter l'échauffement du capillaire celui-ci doit néanmoins être placé dans une enceinte thermostatée. L'électrolyte est un mélange soigneusement filtré et dégazé. Un détecteur est placé à la distance de l'extrémité amont du capillaire près du compartiment cathodique. Le signal obtenu est à la base de l'obtention de l'électrophorégramme qui donne des renseignements sur la composition de l'échantillon, ne sont détectées que les espèces qui se dirigent vers la cathode (Figure 43).

L'électrophorégramme : ressemble à un chromatogramme mais avec des pics plus étroits

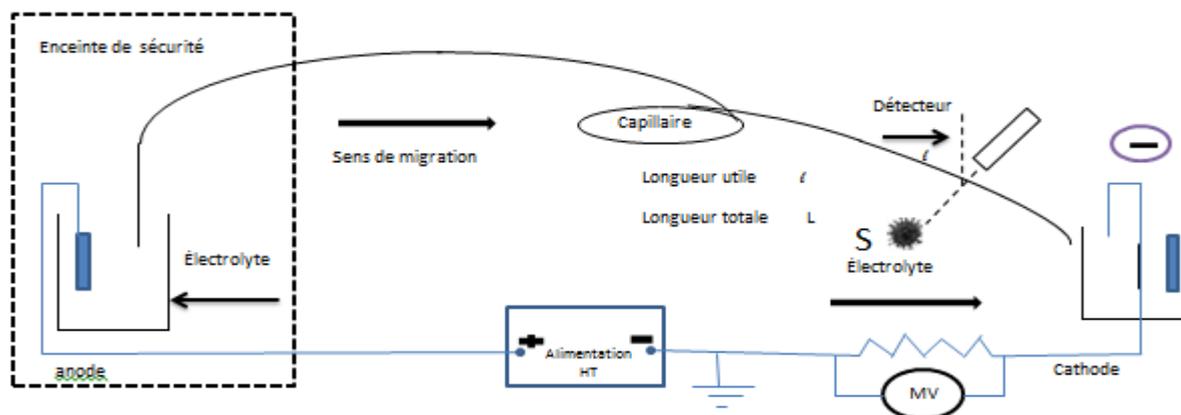


Figure 43: Une installation d'électrophorèse capillaire.

III.1.1. Principe

L'électrophorèse permet la séparation de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Technique principalement analytique mais qui peut être également utilisée comme technique préparative.

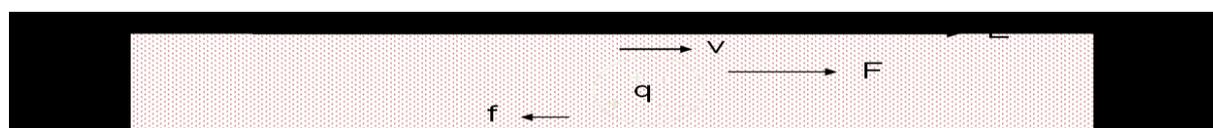
La vitesse de migration, appelée mobilité électrophorétique, dépend de la nature, de la charge ainsi que du ratio charge/masse des molécules. L'application de l'électrophorèse capillaire à l'étude des complexes est possible lorsque les charges nettes portées par la protéine, le polysaccharide et le complexe ont des valeurs suffisamment différentes.

III.1.2. La mobilité

Les molécules sont séparées sous l'effet du champs électrique, selon les lois de l'électrostatique, la force électrique, $F_{\text{électrique}}$, sur un ion avec une charge q dans un champ électrique d'intensité, E , est:

$$F_{\text{électrique}} = qE \quad q: \text{charge nette, } E: \text{intensité du champs électrique (eq.1)}$$

$$qE = fV \quad f: \text{force de friction (frottement), } V: \text{vitesse (eq.2)}$$



Le coefficient de friction donne une mesure de la résistance exercée par la solution sur l'ion pendant sa migration; ceci dépend de la taille, la forme, et l'état de solvation de l'ion ainsi que de la viscosité de la solution. **La force de frottement** : $f = 6\pi r\eta v$ (loi de Stokes) qui s'applique en sens inverse de F .

Dans un champ électrique constant, les forces sur l'ion vont s'égaliser et: $qE = 6\pi r\eta v$ (eq.3), soit $v = qE / 6\pi r\eta$ (eq.4).

où η est la viscosité du milieu, r est le rayon de la molécule sphérique.

Les espèces présentes dans l'échantillon sont soumises à deux effets principaux qui se manifestent pour les ions comme pour les molécules ou les micelles. Il s'agit d'une part de leur *mobilité électrophorétique* propre et d'autre part du *flux* ou *écoulement électroosmotique*.

III.1.2.1 Mobilité électrophorétique (μ_e)

La mobilité électrophorétique égale à la distance parcourue par la particule dans l'unité de temps sous l'influence d'un champ électrique. Donc, chaque ion se déplace avec une vitesse caractérisée par une **mobilité électrophorétique**, μ , définie par :

$$\mu = v / E = q / f = q / 6\pi r \eta \quad (\text{eq.5})$$

$$r = K_B T / 6\pi \eta D_m \quad (\text{eq.6})$$

r : rayon de Stock

K_B : constante de Boltzman

D_m : coefficient de diffusion de l'analyte

La charge q de la molécule est fonction du pH isoélectrique de la particule et du pH du solvant, on appelle pH isoélectrique d'une particule, le pH pour lequel cette particule ne migre pas dans un champ électrique. La différence $\text{pH} - \text{pH}_i$ détermine le signe de la charge q d'une particule :

si $\text{pH} > \text{pH}_i$ charge nette négative (anion) migration vers l'anode;

si $\text{pH} < \text{pH}_i$ charge nette positive (cation) migration vers la cathode;

si $\text{pH} = \text{pH}_i$ charge nette nulle pas de migration.

On affecte à la mobilité μ_e ($\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) le signe (+) ou (-) selon la nature de la charge portée; elle est nulle pour une espèce sans charge nette.

III.1.2.2 Mobilité électro-osmotique — électro-osmose (μ_{eos})

La mobilité électro-osmotique μ_{eos} est due à l'ionisation de la paroi interne du capillaire à partir du pH 2,5, les groupements silanols de la silice du capillaire vont s'ioniser et se charger (-), d'autant plus que le pH sera élevé. Pour respecter l'électroneutralité, les cations de l'électrolyte vont s'amasser vers la paroi et les anions seront repoussés. On va assister à la formation d'une double couche (figure 44):

- 1 Statique (+) solidement fixée à la paroi : c'est la couche de Stern.
- 1 Diffuse : c'est la couche de Gouy-Chapman

Entre ces deux couches on a un potentiel ξ (zêta) qui caractérise la densité de charge de la surface du capillaire. Quand on applique une tension, les cations de la couche diffuse vont être entraînés vers la cathode et entraîner avec eux tout l'échantillon. Ces ions étant

solvatés par des molécules d'eau, il apparaît un flux d'électrolyte qui se dirige dans le même sens. Plus au coeur de la solution, le champ électrique provoque la migration des cations vers la cathode. Les anions sont aussi entraînés : ils progressent « contre-électro-osmotiquement ». Ce flux de cations s'appelle le flux électroosmotique μ_{eos} . Il est caractéristique de l'électrolyte (nature, pH, force ionique) mais indépendant de la tension appliquée. Plus le pH sera élevé, plus la paroi sera ionisée et plus ξ sera élevé ainsi que la mobilité.

- A pH alcalin ont aura une mobilité maximum.
- Au contraire, à un pH de 2,5-3, la mobilité sera faible.

NB : En fait, plus la force ionique est élevée, et plus la couche diffuse a une épaisseur réduite et plus le mouvement sera faible. On définit μ_{eos} par la relation : $\mu_{eos} = v_{eos} / E = v_{eos} L/V$ (eq.7).

Pour calculer μ_{eos} on doit déterminer v_{eos} . Celle-ci correspond à la vitesse d'écoulement dans l'électrolyte des espèces sans charge globale. On y accède à partir du temps de migration t_{mn} que met un *marqueur neutre* à usage de traceur pour parcourir la distance effective l du capillaire, $v_{eos} = l/t_{mn}$ (eq.8). On choisit comme marqueur une molécule organique, non polaire au pH de l'électrolyte utilisé, et facilement détectable par absorption dans le proche UV (ex. acétone, oxyde de mésityle ou alcool benzylique).

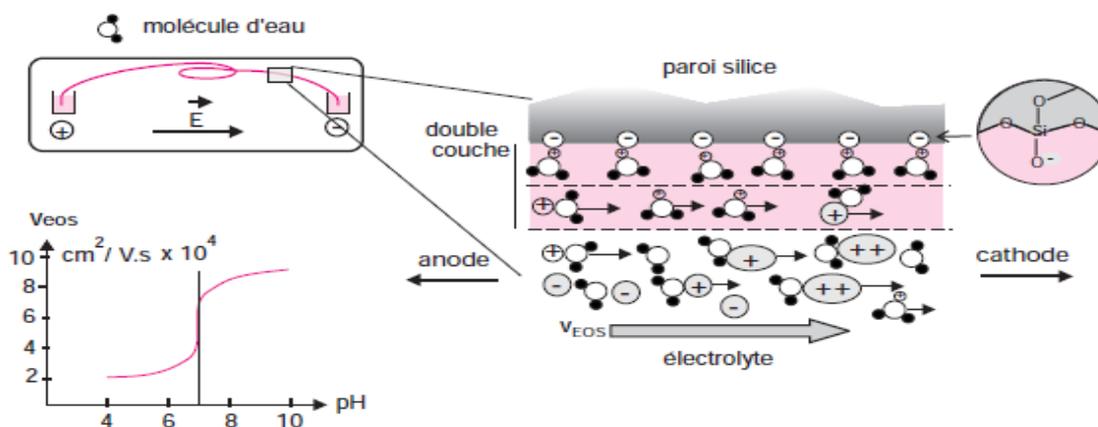


Figure 44: Effet de la double couche sur l'apparition d'un flux électro-osmotique dans un capillaire rempli par un électrolyte.

III.1.2.3 Mobilité apparente (μ_{app})

La mobilité apparente correspond à la vitesse réelle de migration des molécules au sein du capillaire et correspond à la somme de la mobilité électrophorétique et de la mobilité électroosmotique. En électrophorèse capillaire, le temps de migration d'un analyte dépend donc de sa mobilité électrophorétique et de la mobilité du flux.

$$v_{app} = v_e + v_{eos} \text{ (eq.9)}$$

v_{app} est aisément calculable à partir de l'électrophorégramme à partir de l , longueur utile du capillaire entre les points d'injection et de détection et de t_m , son temps de migration.

v_{app} est donnée par la relation : $v_{app} = l/t_m$ (eq.10)

La mobilité électrophorétique apparente μ_{app} , est définie par l'eq. 11, est telle que :

$$\mu_{app} = v_{app}E = v_{app}LV \text{ par conséquent on a : } \mu_{app} = lL/t_mV \text{ (eq.11)}$$

En combinant le flux électro-osmotique de l'électrolyte et la mobilité apparente il est donc possible de calculer la mobilité électrophorétique vraie des espèces porteuses de charges.

À partir de l'eq. 9, on écrira :

$$\mu_e = \mu_{app} - \mu_{eos} \text{ (eq.12)}$$

$$\text{soit : } \mu_e = L \cdot l/V (1/t_m - 1/t_{mn}) \text{ (eq.13)}$$

III.1.3. Facteurs affectant la mobilité des molécules

A. Facteurs moléculaires

- Charge,
- Taille,
- Forme.

La taille et la charge de la molécule influencent le processus électrophorétique. En effet, les petites molécules migrent facilement mais leur mobilité dépend des autres substances dissoutes susceptibles de les solvater et de diminuer leur vitesse. De même, la charge des molécules influence directement leur mobilité. La charge est fonction du pH pour les molécules ionisables, de la force ionique et de la formation éventuelle de complexes. Le signe de la charge détermine le sens de migration et sa vitesse.

B. Facteurs environnementaux

L'intensité du champ électrique

Il représente la chute de potentiel par unité de longueur entre deux électrodes séparées par une distance. Le champ électrique est fourni par un générateur de courant continu. Le support de ce champ est constitué par un tampon de pH dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce support peut être liquide: on parle alors d'électrophorèse en veine liquide. Dans une large majorité des cas, on utilise un support poreux stabilisant la phase liquide: on parle alors d'électrophorèse sur support ou d'électrophorèse de zones. Le mélange à séparer est déposé sur un support poreux imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide, etc. Le support doit être homogène et inerte. Les particules à séparer peuvent être de nature et de taille très

différentes: des composés organiques ou minéraux, de la taille d'une cellule ou de celle d'un ion. Cette méthode est souvent utilisée pour séparer des acides nucléiques, des petits peptides ou des protéines.

✚ Le support

Certains supports possèdent des propriétés adsorbantes et peuvent fixer les molécules de solvants ou de solutés. Il en résulte un ralentissement de la migration entraînant un élargissement des zones sur l'électrophorégramme. Ces propriétés adsorbantes sont liées à la présence de certains groupements fonctionnels comme les hydroxyles.

✚ Tampon d'électrophorèse

La présence d'ions étant nécessaire au passage du courant, un compromis est obtenu avec une force ionique comprise entre 0.05 et 1 mol/l. Le pH influe sur l'ionisation des acides faibles et bases faibles, pour lesquels il s'avère nécessaire de travailler dans un milieu tamponné. A pH et force ionique identiques, deux tampons de nature différente ne produisent pas toujours des mobilités électrophorétiques identiques. Certaines substances ajoutées au tampon de migration modifient aussi les comportements électrophorétiques. Ainsi:

1. La présence d'EDTA ou d'acide citrique favorise par complexation la séparation de certains ions minéraux.
2. Les ions boratés forment avec les sucres des complexes chargés rendant ainsi possible leur séparation.
3. L'addition d'urée modifie le comportement électrophorétique des macromolécules par rupture de liaisons hydrogène.

III.2. Types de supports

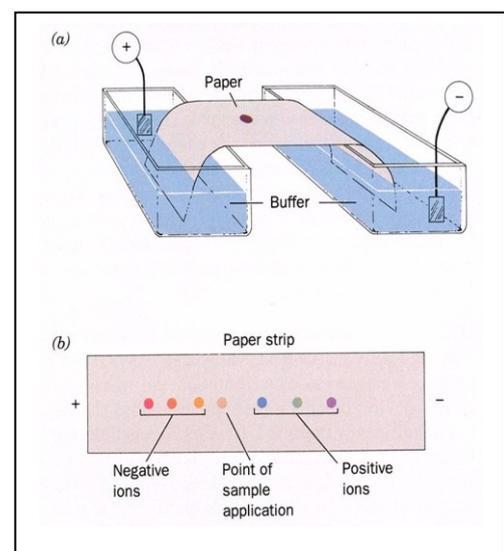
Les plus courants sont:

- Papier
- Gel d'agarose (*Agarose gel electrophoresis*)
- Gel de polyacrylamide (*PAGE*)
- Acétate de cellulose.

III.3. Les différents types d'électrophorèse

III.3.1 Électrophorèse sur papier

- ✚ Papier filtre ou acétate de cellulose
- ✚ Champ électrique: env. 20 V/cm
- ✚ cathode (-): attire les cations (+)
- ✚ anode (+): attire les anions (-)



Remarque

☞ Dans l'électrophorèse sur papier:

Les ions sont séparés en fonction de leurs charges.

☞ Dans la chromatographie sur papier:

Les molécules se séparent en fonction de leur caractère polaire.

L'électrophorèse sur l'acétate de cellulose est aussi simple que l'électrophorèse sur papier et les membranes en acétate de cellulose ont remplacé le papier. La cellule se compose de deux compartiments où sont placées les électrodes (anode et cathode) ; la membrane est disposée entre ces compartiments qui sont par ailleurs remplis d'une solution tampon (Figure 45). On peut dire que la transparence et l'uniformité de la porosité sont des avantages par rapport au papier. Les applications de cette technique concernent surtout la séparation de substances biochimiques.

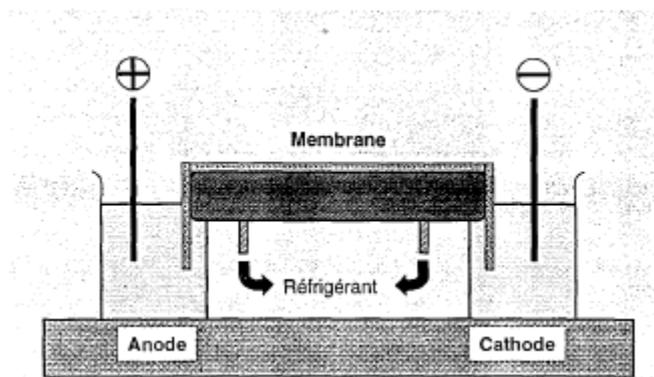
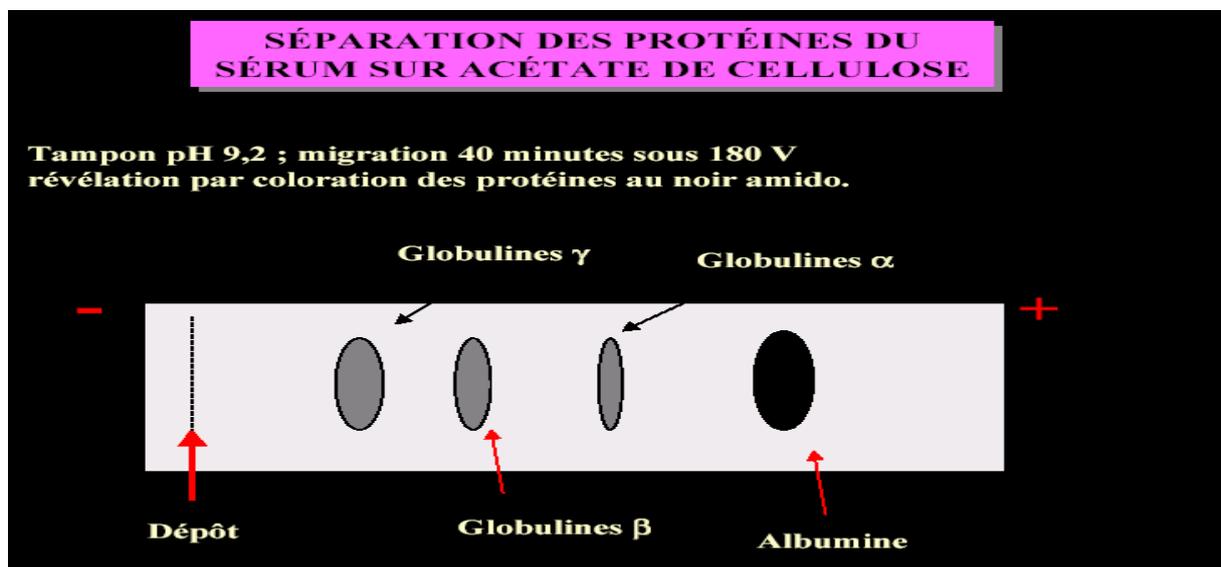


Figure 45: Représentation de la séparation par électrophorèse sur membrane en acétate de cellulose.

Exemple: Exemple de séparation par l'électrophorèse sur papier.



On peut dire que l'électrophorèse sur papier a bénéficié de la technique de chromatographie sur papier, car les exigences de qualité du papier sont les mêmes : épaisseur constante, porosité régulière, pureté chimique et résistance mécanique suffisante.

III.3.2 Électrophorèse sur gel

Constitue la technique parmi les plus puissantes et les plus faciles à utiliser dans la séparation des macromolécules.

Les gels d'usage commun, l'agarose et le polyacrylamide, possèdent des pores de la taille des protéines à séparer.

Gels avec pores de dimensions moléculaires de taille variable:

✚ **Polyacrylamide:** petite taille des pores

✚ **Agarose:** grande taille des pores (pour comp. > 200kDa)

- ☞ La taille des pores varie aussi avec la concentration des gels; Plus la concentration \uparrow , plus la taille \downarrow
- ☞ La séparation moléculaire est basée non seulement sur la mobilité électrophorétique des molécules, mais aussi sur le principe de filtration sur gel.

- les gels d'électrophorèse retardent les molécules de taille plus grande, ce qui est l'inverse de la filtration par gel. Ceci est dû au fait que dans la filtration par gel, il y a des espaces pour le solvant entre les billes de gel, ce qui n'existe pas dans l'électrophorèse sur gel, ce qui fait que la migration des molécules larges est donc retardée par rapport aux molécules plus petites.

III.3.2.1 Électrophorèse sur gel d'agarose

Gel d'agarose est un polysaccharide de MM élevée extrait à partir d'agar, gel très ouvert (pores larges). il est utilisé fréquemment pour de grosses molécules d'ADN.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN en fonction de leur masse moléculaire.

La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

La révélation des bandes d'ADN par coloration : Bromure d'Ethidium (BET) / UV
Le BET s'intercale entre les plateaux de paires de bases. Eclairé par UV courts (UV 200-300nm) => fluorescence orangée. Visualisation : transilluminateur UV (figure 46). Seuil de détection : quelques nanogramme.

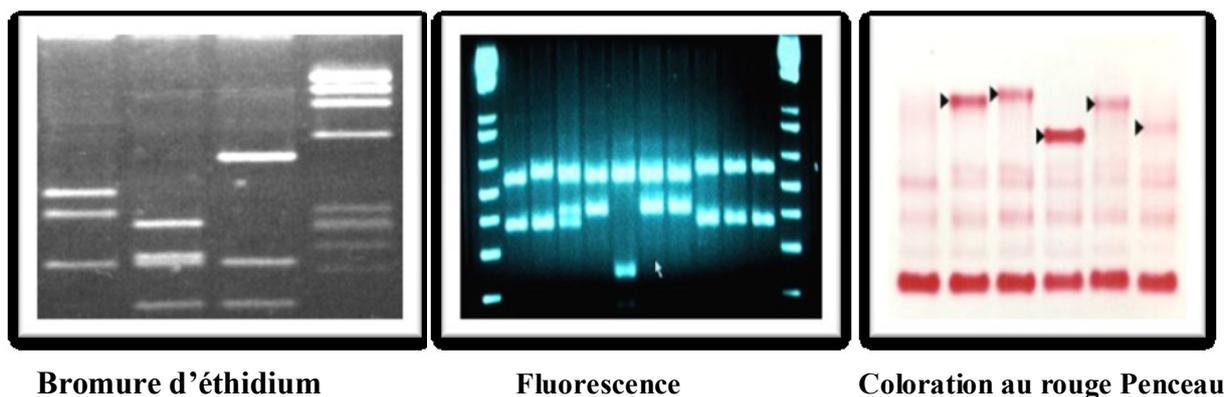


Figure 46: Coloration d'un gel d'agarose (révélation).

III.3.2.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Concerne exclusivement la séparation des protéines. La migration des molécules en fonction de leur charge globale, de leur taille et de leur forme. Electrophorèse sont possibles en conditions dénaturantes ou non dénaturantes (Native). Elles sont essentiellement utilisées en conditions dénaturantes. On parle alors d'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis).

Les gels de polyacrylamide sont obtenus par polymérisation du monomère acrylamide en présence d'un autre monomère bifonctionnel et donc réticulant, le N,N'-méthylène bisacrylamide (ou un équivalent). La polymérisation est en général initiée par du persulfate d'ammonium en présence de l'accélérateur TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylènediamine). Le TEMED (sous sa forme basique, ce qui implique un pH suffisamment élevé) catalyse la formation de radicaux libres à partir du persulfate (figure 47). Les radicaux libres initient la polymérisation. On peut aussi utiliser la décomposition par la lumière de la riboflavine-phosphate qui donne alors naissance à des radicaux libres. L'oxygène étant un inhibiteur de polymérisation, les solutions de monomères devraient donc être dégazées avant d'être mises à polymériser. Généralement, on "coule" le mélange acrylamide/bisacrylamide/solution tampon choisie/réactifs d'initiation de polymérisation dans un volume défini par deux plaques de verre et des intercalaires de faible épaisseur. La polymérisation est terminée en quelques minutes. La porosité des gels obtenus dépend de la concentration totale en monomères et de la proportion d'agent monomère réticulant (le bisacrylamide). En général, on appelle **T** (exprimé en %) la concentration totale en monomères: $\%T = (a+b)*100/v$, avec **a** masse d'acrylamide en g, **b** masse de bisacrylamide en g et **v** volume total de solution en mL. On appelle généralement **C** la proportion d'agent réticulant : $\%C = b*100/a$.

Remarque : La porosité diminue quand %T augmente. Jusqu'à la valeur limite %C=5%, la porosité diminue quand %C augmente. Au delà de %C = 5%, le bisacrylamide polymérise beaucoup sur lui-même, entraînant la formation de gels à porosité hétérogène.

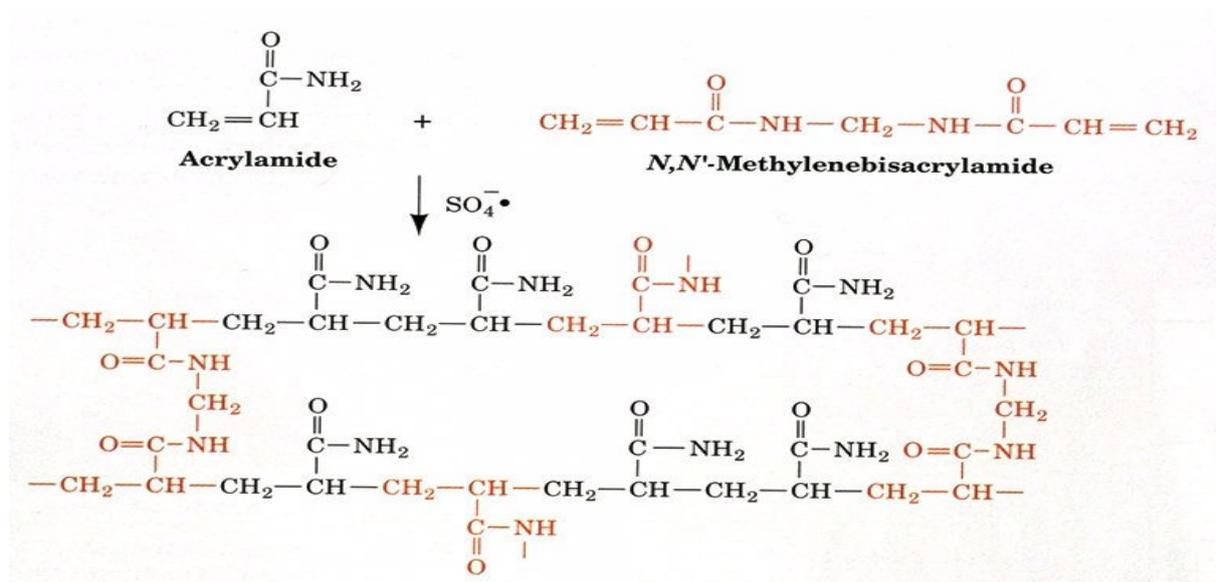


Figure 47: Polymérisation de l'acrylamide.

Des tables fournissent les capacités de séparation des gels en fonction de %C. Les gels avec gradient de concentration en acrylamide ont des résolutions très élevées.

Tableau I: Concentration en acrylamide du gel de séparation

| Masse moléculaire (MM) | % acrylamide |
|------------------------|--------------|
| 10 000-40 000 | 15-20 |
| 40 000-100 000 | 10-15 |
| 100 000-300 000 | 5-10 |
| 300 000-500 000 | 5 |
| 500 000 | 2-5 |

III.3.2.2.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide native

L'électrophorèse sur gel polyacrylamide (Native) permet la séparation et purification d'un mélange de protéines et la possibilité de détermination de la taille et la composition en sous unité d'une protéine dans des conditions non dénaturantes.

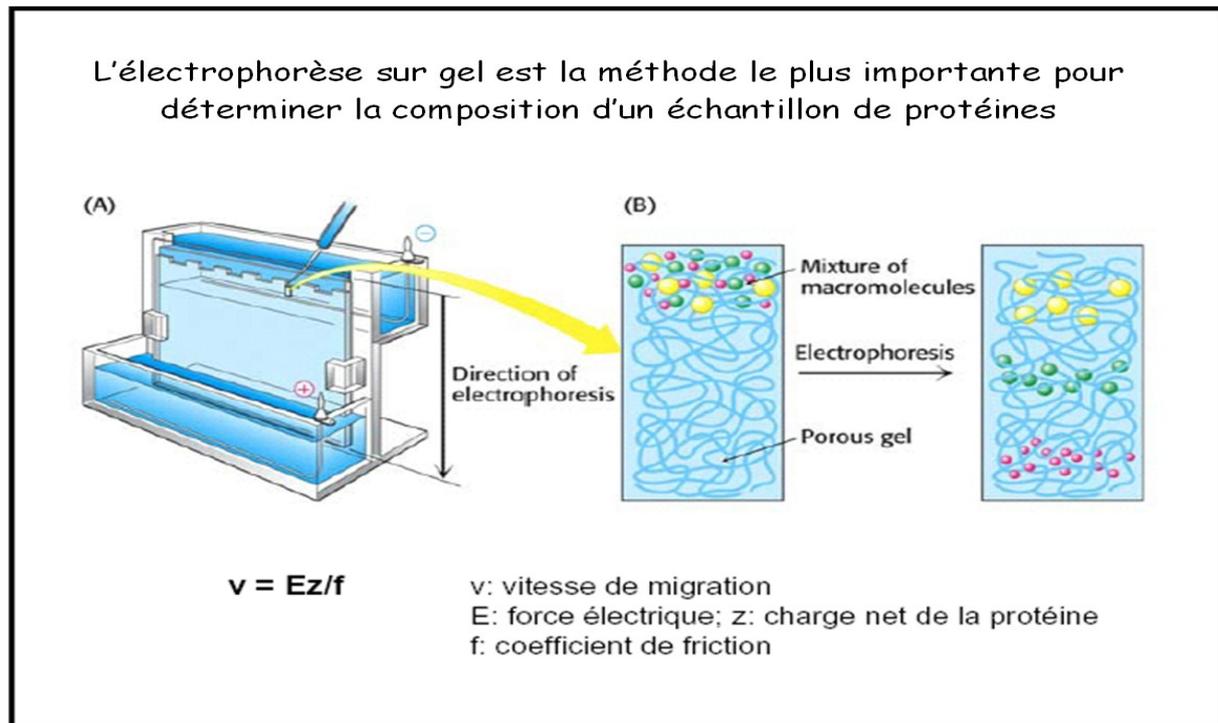


Figure 48: Détermination de la composition d'un échantillon de protéines par l'électrophorèse native (PAGE).

III.3.2.2.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide -SDS (SDS-PAGE)

La méthode la plus répandue parmi les techniques biochimiques afin de déterminer la pureté d'une protéine, elle est réalisée en condition dénaturante. Cette technique dépend du fait que certains savons ou détergents, par le biais de leurs interactions hydrophobes, sont capables de dénaturer la structure d'une protéine.

Le sodium dodecyl sulfate (SDS) représente un des détergents les plus puissants à cet égard (formule chimique du SDS: $[\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}_3^-] \text{Na}^+$).

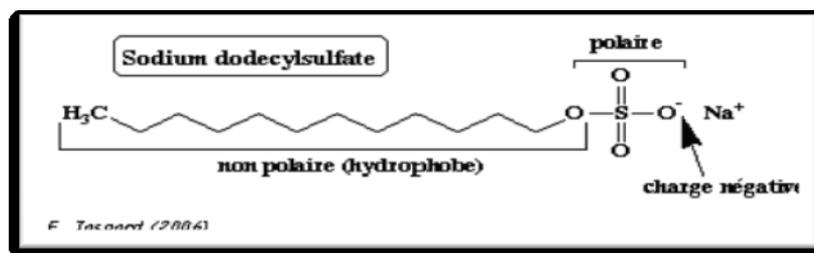


Figure 49: Structure chimique du SDS.

Le SDS se lie de façon importante aux protéines; une concentration de 0.1% de dodecyl sulfate est suffisante pour saturer par sa liaison avec une chaîne polypeptidique à un taux de 1 molécule de détergent par 2 résidus d'acides aminés.

En présence de SDS, les protéines contenant des sous-unités sont désunies et la chaîne polypeptidique de chaque sous-unité adopte une conformation étendue.

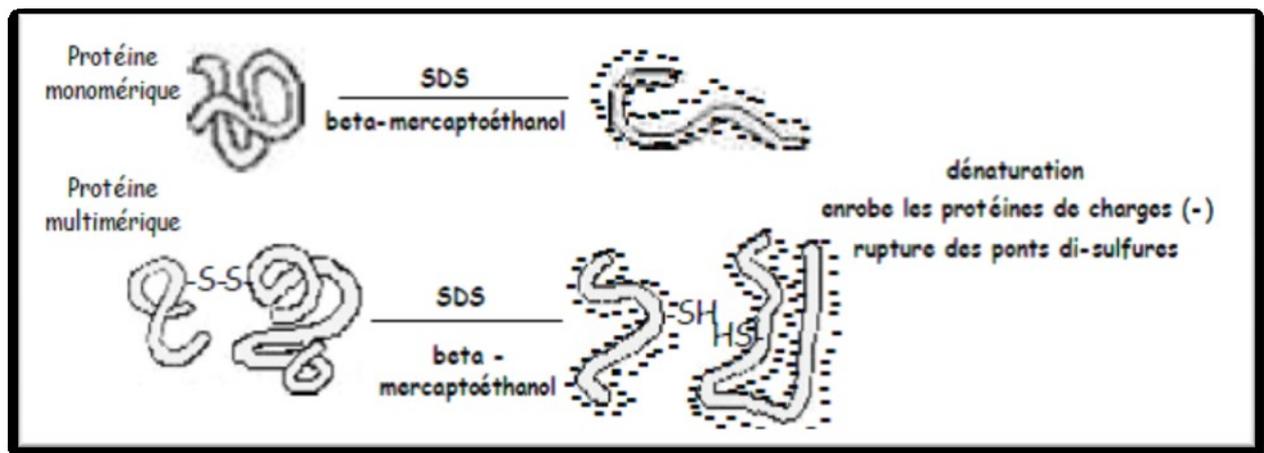


Figure 50: perte de la charge nette et de la structure III ou IV des protéines.

La forte charge négative globale apportée par le SDS masque la charge intrinsèque des protéines, par conséquent suppression facteurs forme et charge lors migration, donc la séparation des protéines se fait uniquement en fonction du facteur taille.

Le SDS est aussi un détergent qui brise les interactions et détruit les structures tertiaires et quaternaires.

La mobilité électrophorétique (μ) des protéines en SDS-PAGE est inversement proportionnelle au logarithme de sa masse moléculaire.

SDS-PAGE utilisé pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine ou de ses sous-unités, en utilisant des protéines « marqueurs » de masses moléculaires connues.

✳ Les étapes d'électrophorèse SDS PAGE

1. Dénaturation de l'échantillon lors de la SDS-PAGE

Dans des microtubes (1,5ml) Eppendorf dont le bouchon a été percé à l'aide d'une aiguille, mettre successivement:

- ☞ 20 μ l de solution protéique des fractions (0,5 mg/ml),
- ☞ 20 μ l de tampon de dénaturation (2x) dont la composition est: Tris-HCl, 0,125 M pH 6,8, Glycérol 20%, SDS 4%, Bleu de bromophénol 0,2% et b-mercaptoéthanol 10%.
- ☞ Préparer les échantillons de standards de poids moléculaires,
- ☞ Porter tous les échantillons à ébullition pendant 4 minutes.

L'action de chaque composé sur l'échantillon:

Le β mercaptoéthanol: Composé qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle. Les sous unités des protéines sont donc dissociées.

Le SDS: Composé capable de venir se fixer sur la périphérie des chaînes de protéines tout en leur conférant une charge négative.

Le glycérol: Qui donnent une densité à l'échantillon permettant ainsi à ce dernier d'être déposé facilement au fond des puits.

Le bleu de bromophénol: Est également utilisé comme marqueur coloré afin de vérifier le bon déroulement d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou en gel d'agarose.

Le tampon de migration: Il contient des électrolytes qui sont responsables du transport du courant électrique. Si la concentration de ces électrolytes est faible, la totalité du courant est transportée par le soluté et une faible proportion est transportée par les électrolytes, ce qui entraîne la migration des protéines et donc leur séparation.

Les marqueurs de masse moléculaire: La détermination de la masse moléculaire des protéines inconnues nécessite l'utilisation des protéines standards de masse moléculaire connue.

En conséquence, les protéines sont dénaturées (elles ont perdu leur structure tridimensionnelle) et n'ont plus de ponts disulfures (elles sont sous une forme monomérique).

2. Dépôt des échantillons et migration

Déposer 10 à 50µl d'échantillon protéique dénaturé par puits à l'aide d'une micropipette P 20.

Connecter les électrodes au générateur, (le + en bas du gel). Faire migrer à 30mA pendant 3 à 4 heures, jusqu'à ce que le front de Bleu de Bromophénol atteigne le bord du gel.

3. Coloration

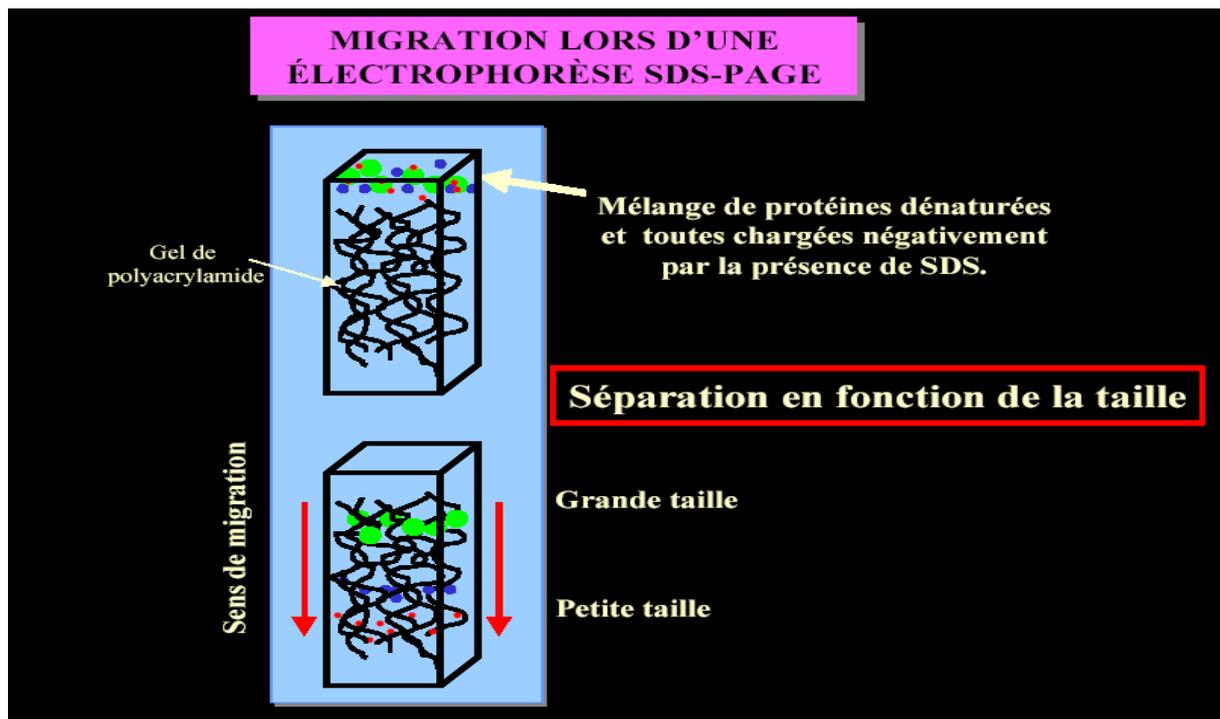
Une fois la migration électrophorétique terminée, le gel est démoulé, séché puis plongé dans une solution de coloration sous agitation, qui est composé de Bleu de Coomassie R250 0,25%, acide acétique 20%, Isopropanol 20% et H₂O 60%. Les protéines sont révélées par une coloration spécifique (par exemple avec le bleu de Coomassie).

4. Décoloration

Une succession de bains dans la solution de décoloration permet d'éliminer la coloration du fond de façon à faire apparaître les bandes correspondant aux diverses protéines séparées. Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du Isopropanol et de l'acide acétique. Le gel peut être conservé dans une solution aqueuse d'acide acétique à 5%.

Cette méthode donne la meilleure résolution et les bandes sont les plus résolues de toutes les méthodes d'analyse.

En utilisant des marqueurs de poids moléculaires connus, il est possible de calibrer la migration sur gel par rapport aux poids moléculaires. Il a été démontré qu'on peut obtenir une relation linéaire entre la mobilité électrophorétique et le logarithme du poids moléculaire.



✚ Détermination de la masse moléculaire

Le fait que le SDS rende négatives les protéines permet de les séparer en fonction de leur taille (masse moléculaire) et non pas en fonction de leurs charges. Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de la masse moléculaire et le déplacement électrophorétique (R_f) au sein du gel. Cette technique est utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine inconnue.

Dans les mêmes conditions, on soumet la protéine à analyser à une électrophorèse, la connaissance de son déplacement (R_f) et l'extrapolation de ce R_f sur la droite: $\text{Log } M = f(R_f)$, permettent la détermination de sa masse moléculaire (Figure 50).

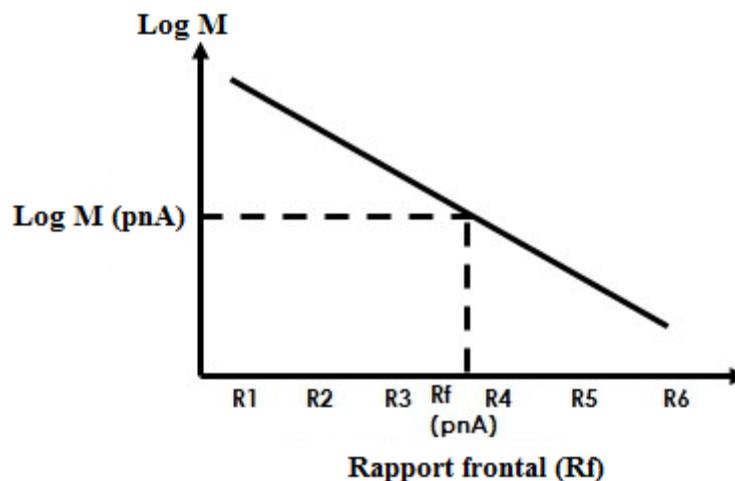


Figure 51: Mobilité des protéines en fonction du logarithme de leur masse moléculaire. (pnA: protéine A de masse moléculaire inconnue).

A l'aide de marqueurs protéiques (protéines pures de masse moléculaire connue) (Tableau II), on trace la droite d'étalonnage $\text{Log } M=f(\text{Rf})$.

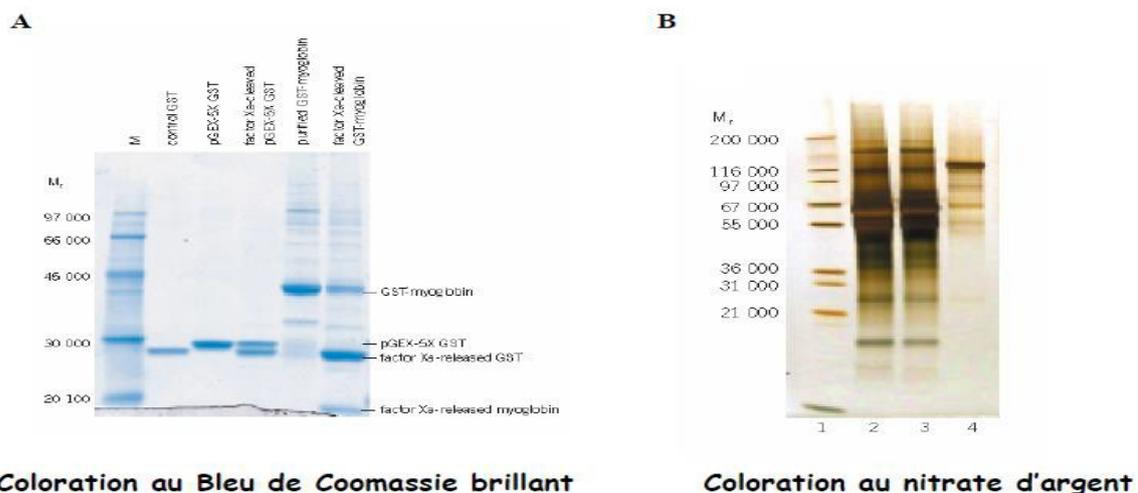
Le rapport frontal (Rf) représente le rapport de la distance parcourue par la protéine sur la distance parcourue par le front de migration (Fm).

✳ Révélation des protéines présentes sur les gels

La visualisation de l'ensemble des protéines présentes dans le gel se fait par coloration. La coloration est effectuée dans la majorité des cas avec du bleu de Coomassie (Figure A). Il est également possible de colorer les protéines présentes avec nitrate d'argent (Figure B).

Afin de visualiser uniquement la présence de certaines protéines, il est possible d'utiliser des anticorps marqués qui reconnaissent de manière spécifiques ces protéines. Pour ce faire il est nécessaire de transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose (Western blot). Ce support, plus solide que les gels, permet une manipulation plus aisée.

Coloration de gels de protéines



Coloration au Bleu de Coomassie brillant

Coloration au nitrate d'argent

III.3.3 Isoélectrofocalisation

La focalisation électrique ou isoélectrofocalisation (IEF) est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs points isoélectriques pH_i (valeur de pH à laquelle la molécule ne présente aucune charge nette).

L'IEF est pratiquée sur lame ou sur colonne, dans lesquelles un gradient de pH est préétabli. Le gradient de pH est réalisé en imprégnant le gel avec un mélange de substances amphotères de points isoélectriques différents. Lorsque la différence de potentiel est appliquée, les différents ampholytes se rangent dans l'ordre de leur point isoélectrique et réalisent un gradient de pH entre les deux électrodes. Les protéines déposées migrent vers l'anode ou la cathode selon leur charge mais, au fur et à mesure de leur déplacement, le pH

extérieur varie, ainsi que leur propre charge: elles ne migrent plus quand leur charge nette est nulle (elles focalisent à l'endroit où le pH est égal à leur propre point isoélectrique (Figure 52). Les ampholytes sont des mélanges d'un certains nombre de molécules de faible masse moléculaire, donc très mobiles, et comportant chacune plusieurs groupements acide carboxylique et amine.

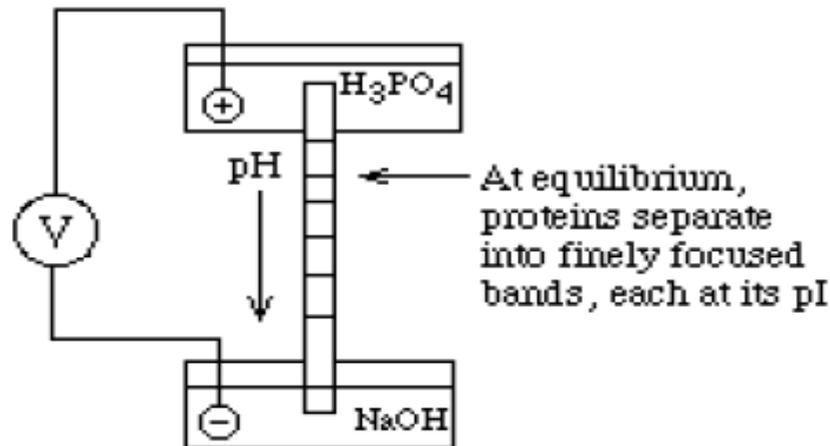


Figure 52: Gradient de pH en isoélectrofocalisation.

L'échantillon protéique est déposé dans un large puits au centre du gel. Les protéines migrent dans une direction ou dans l'autre jusqu'à ce qu'elles rencontrent leur point isoélectrique, point où elles cessent de migrer.

Dans l'IEF, le gel de polyacrylamide doit être de forte porosité pour que la taille des protéines n'influence pas leur migration. L'IEF est utilisée pour déterminer le point isoélectrique d'une protéine inconnue par l'utilisation des marqueurs de point isoélectrique (standards), en traçant la droite d'étalonnage: $pHi \text{ standards} = f(Rf)$. Il ya une relation linéaire entre le point isoélectrique des protéines et leur rapport frontal (Figure 53).

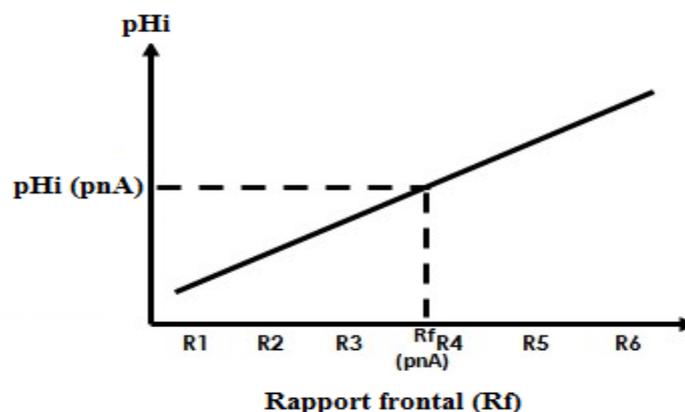


Figure 53: Mobilité des protéines en fonction de leur point isoélectrique.
(pnA: protéine A de pHi inconnu).

III.3.4 Electrophorèse bidimensionnelle

C'est une méthode de séparation des protéines selon leur point isoélectrique (pHi) et leur masse moléculaire. La séparation se fait en deux dimensions: La première dimension consiste à séparer les protéines selon leur pHi par isoélectrofocalisation (IEF) et la deuxième dimension consiste à séparer les protéines selon leur masse moléculaire par électrophorèse en présence de SDS. cette technique permet la haute résolution et elle est très utilisée en "Protéomique".

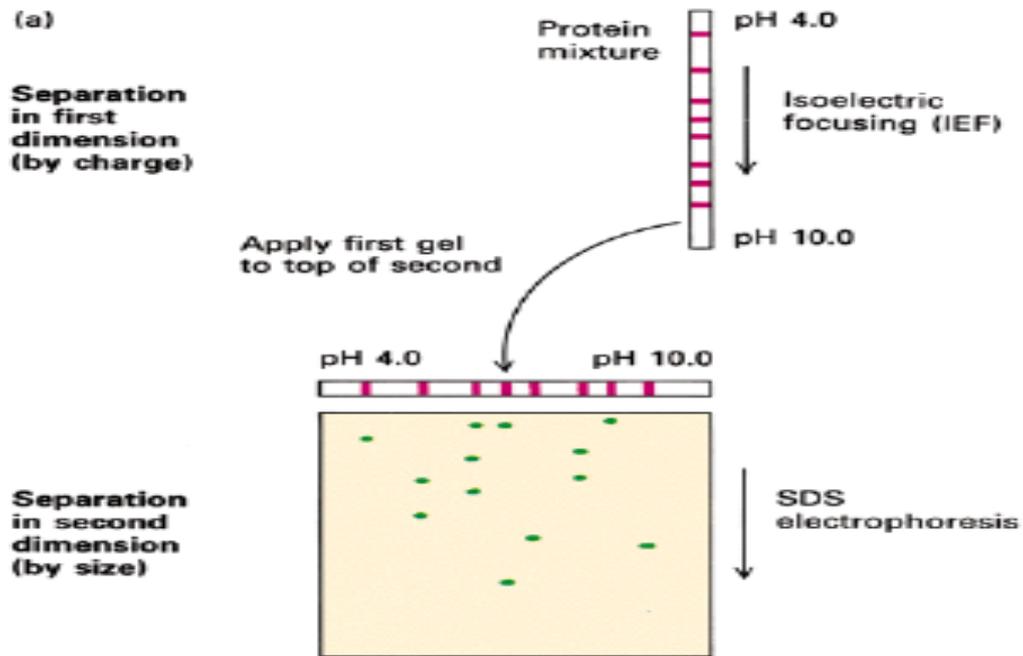


Figure 54: Electrophorèse bidimensionnelle.

Références Bibliographiques

Ait-Adoubel, A., 2004. Nouvelles approches en électrophorèse capillaire pour l'énantio séparation d'acides aminés aromatiques ou aliphatiques non dérivés.

Blessum, C., Jeppsson, J., Aguzzi, F., Bernon, H., Bienvenu, J., 1999. L'électrophorèse capillaire: principe et applications au laboratoire de biologie clinique, *Annales de Biologie Clinique*, 643-657.

Burgot, G., Burgot, J.-L., 2011. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. Lavoisier.

Christophe D., Michel P., 2003. Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques. Bourgogne.

Filtration, G., 1991. Principles and methods. Handbooks from Amersham Biosciences.[Can be downloaded from the following website: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_gelfiltration.pdf].

Girard, M., 2003. Etude qualitative et quantitative des interactions entre la β -lactoglobuline et la pectine en système dilué. Université de Laval.

Heftmann, E., 1983. Chromatography: fundamentals and applications of chromatographic and electrophoretic methods. P. A, Fundamentals and techniques.

Huber, L., 1994. Principles and techniques of practical biochemistry. Wiley Online Library.

Jean-Louis CUQ, 2007. Chromatographie liquide, université Montpellier.

Kabouche Z. 2010. Cours et exercices de Chromatographie, OPU Constantine

Khabchi, M.E., 1993. Chromatographie en phase liquide: contribution à l'optimisation d'une séparation préparative en gradient d'éluion.

Lurie I., 1992. Micellar electrokinetic capillary chromatography of the enantiomers of amphetamine, methamphetamine and the hydroxyphenethylamine precursors. *J. Chromatogr.*, **605**: 269-275.

Mahuzier, G., Hamon, M., 1990. Abrégé de chimie analytique, *Tome 2*, 2ème édition
Masson Paris

Mendham, J., Denney, R., Barnes, J., Thomas, M., 2005. Analyse chimique quantitative de Vogel. 1ère Edition edn. De Boeck.

Miller, J.M., 2005. Chromatography: concepts and contrasts. John Wiley & Sons.

Perrin-Drouin, Y., 1958. Chromatographie en phase gazeuse: méthode de partage gaz-liquide.

Petitjean P., Henin O., Ellias S., Gruau G. 2001. Application de l'électrophorèse capillaire au dosage des anions et des cations majeurs en solution dans les eaux douces naturelles, cahiers techniques de géosciences Rennes N°2

Poole, C.F., 2003. The essence of chromatography. Elsevier.

Rosset, R., Caude, M., Jardy, A., 1982. Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. Issy-les-Moulineaux (Hauts-de-Seine): Masson.

Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., 2004. Analyse chimique-6ème édition-Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. De Boeck Supérieur.

Skoog, West, Holler, Crouch, 2013. Chimie Analytique, 8ème édition Bruxelles.

Small, H., Stevens, T.S., Bauman, W.C., 1975. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. Analytical Chemistry 47, 1801-1809.

Small, H., Riviello, J., Pohl, C.A., 1997. Ion chromatography using frequent regeneration of batch-type suppressor. Google Patents.

Small, H., 2013. Ion chromatography. Springer Science & Business Media.

Weis, J., 2008. Ion chromatography. John Wiley & Sons.

Yost, R.W., Ettre, L.S., Conlon, R.D., Vaumoron, J., 1981. Pratique de la chromatographie liquide. Technique et Documentation.

Younan N., 2011. Méthodes de Séparation.

Site Internet

<https://www.emse.fr/fr/transfert/spin/formation/ressources/sam96/hplc97htm/sep.htm>

[file:///C:/Users/bcs/Desktop/Cour%20chromato/Chromato_liquide_2007%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/bcs/Desktop/Cour%20chromato/Chromato_liquide_2007%20(1).pdf)

<http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/theoriechromato2.html#A23>

ftp://ftp.mn-net.com/francais/Flyer_Catalogs/Chromatographie/Catalogue-FR/KATFR200001-5CPG-www.pdf

<http://chemphys.u-strasbg.fr/mpb/teach/chromato3/chromato3.pdf>

<http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/CPG.html>