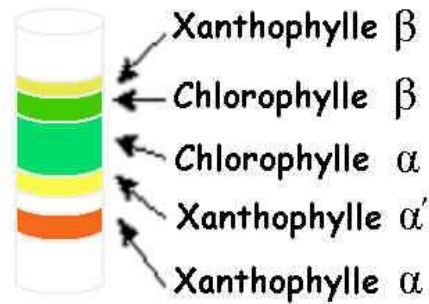


Les techniques chromatographiques

1. Introduction

1906: description de la méthode de séparation de pigments végétaux par Tswett



1

Les grandes étapes de l'évolution de la chromatographie

1906 - M. TSWETT

1931 - Séparations préparatives (KHUN et LEDERER)

1938 - REICHSTEIN : chromatogramme liquide. Développement de la chromatographie sur couche mince (**ISMAILOV ET SHRAIBER**)

1940-1943 - TISELIUS : analyse frontale et développement par déplacement. Chromatographie par échange d'ions (**SAMUELSON**)

1941 - MARTIN et SYNGE : chromatographie de partage sur gel de silice.

1944 - CONSDEN, GORDON et MARTIN : chromatographie de partage sur papier

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

1952 : mise au point de la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

1968 : mise au point de la Chromatographie Liquide Haute Performance CLHP ou HPLC en anglais.

1979 : première séparation chirale par HPLC.

2

Définition

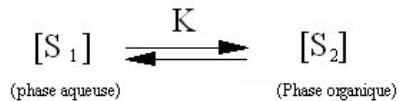
La chromatographie sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la (ré)partition sélective des solutés entre ces deux phases.

Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

3

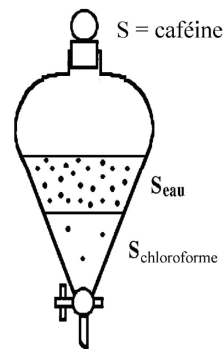
La chromatographie est une méthode basée sur la différence de miscibilité d'un soluté entre deux phases.

Cette technique s'apparente à l'extraction...



avec la constante d'équilibre $K = [S_2]/[S_1]$

K s'appelle aussi le coefficient de partition.

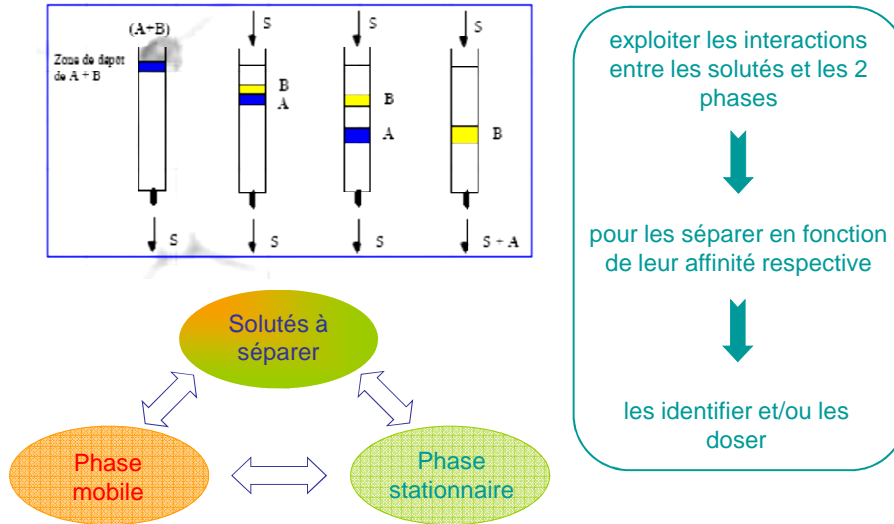


Application: extraction de la caféine avec du chloroforme dans une décoction de thé.

$K = [\text{caféine}(\text{CHCl}_3)]/[\text{caféine}(\text{eau})] = 8,36.$

4

Chromatographie en phase liquide : applications



5

Principes généraux de la chromatographie

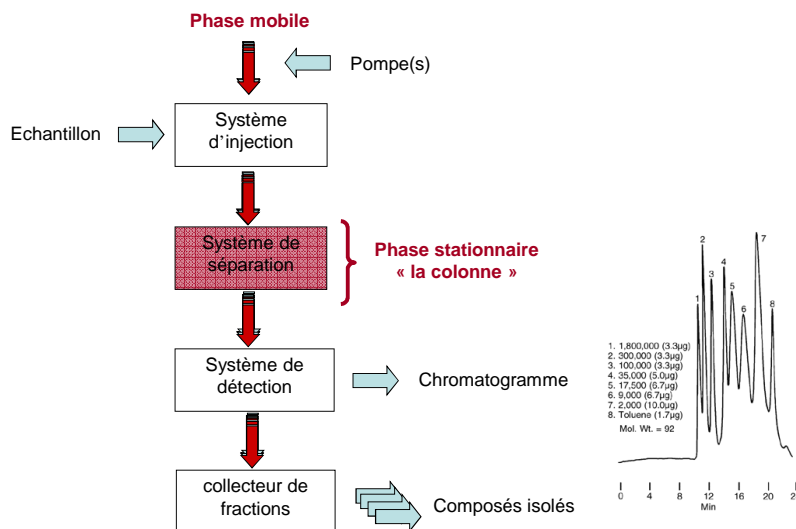


Schéma d'un système chromatographique

6

Facteurs intervenant dans le partage des molécules à séparer :

- la solubilité dans un solvant liquide : dans la [chromatographie de partage](#)
- la taille, la forme : dans la [chromatographie d'exclusion](#)
- la polarité : dans la [chromatographie d'adsorption](#), et d'[adsorption en phase inversées](#)
- la charge électrique : dans la [chromatographie par échange d'ions](#)
- la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers : dans la [chromatographie d'affinité](#)

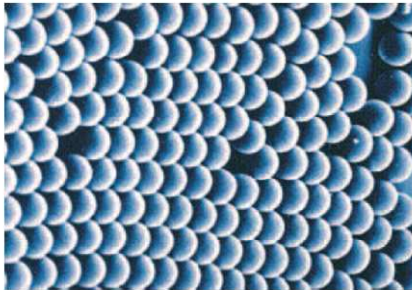
7

Les différents types de chromatographie liquide et nature des biomolécules purifiées

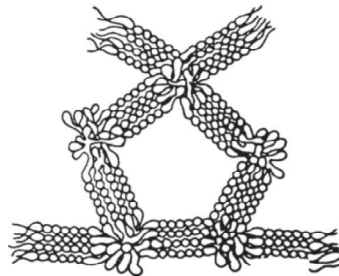
Paramètres	Type de chromatographie	Applications
Charge électrique	Echange d'ions	Protéines, AA, acides nucléiques, sucres
Taille et forme (volume)	Exclusion ou gel filtration	Protéines, acides nucléiques, sucres, lipides
Polarité, hydrophobicité	Polarité de phase inverse	Protéines, acides nucléiques, sucres, lipides, AA
	Interactions hydrophobes	Protéines
Structures particulières permettant des liaisons spécifiques (tags)	Affinité	Protéines

8

Nature des supports (matrice) de la phase stationnaire



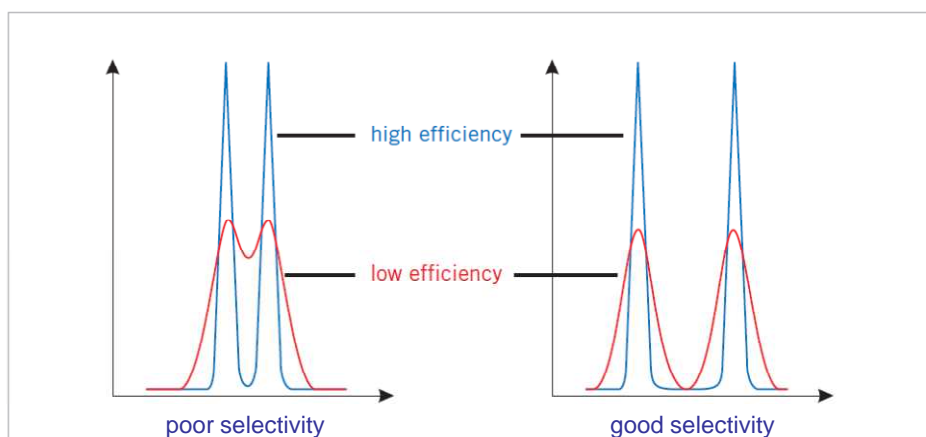
polystyrene with divinyl benzene :
produce highly spherical
(monodispersed), small (10, 15 or 30
 μm), porous particles that facilitate *high
resolution separations at high flow rates*



Sepharose media are based on chains of
agarose, arranged in bundles and with
different degrees of intra-chain cross-linking,
to give a range of rigid, macroporous
matrices with good capacity and low non-
specific adsorption

9

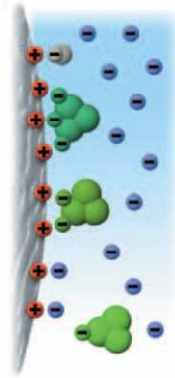
Résolution: efficacité et sélectivité



efficacité (N) \Leftrightarrow élargissement des pics
sélectivité (α) \Leftrightarrow degré de séparation entre les pics

10

Chromatographie d'échange d'ions



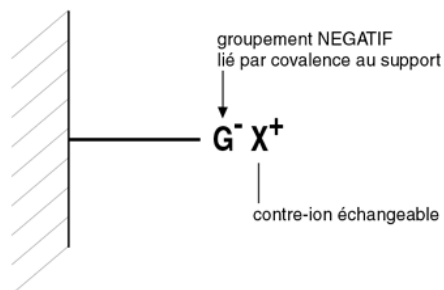
11

Chromatographie sur échangeurs d'ions

Résine cationique : qui échange réversiblement des cations. Une résine cationique est chargée négativement.



Résine échangeuse de cations (cationique) :

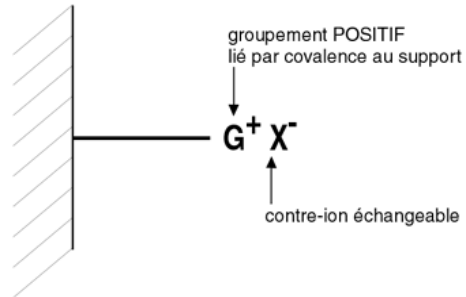


12

Résines anioniques : qui échange réversiblement des anions. Une résine anionique est chargée positivement.

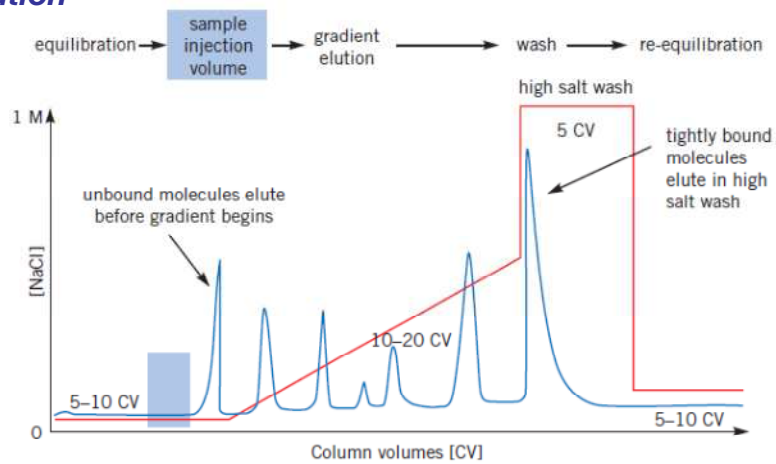


Résine échangeuse d'anions (anionique) :



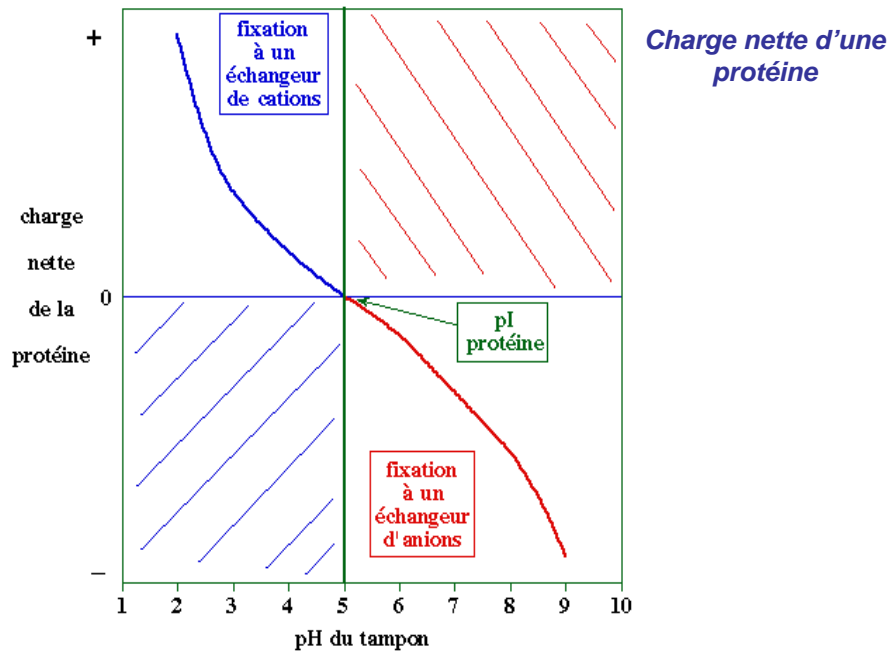
13

Elution



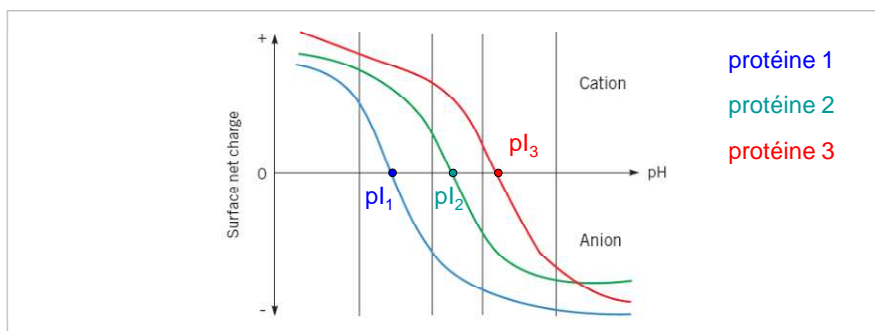
- **élution par augmentation de la force ionique de l'éluant: gradient de NaCl**
→ les composés éluent en fonction de leur charge nette au pH de travail (de la plus faible à la plus élevée)
- **élution par changement de pH**

14



15

Charge nette d'une protéine

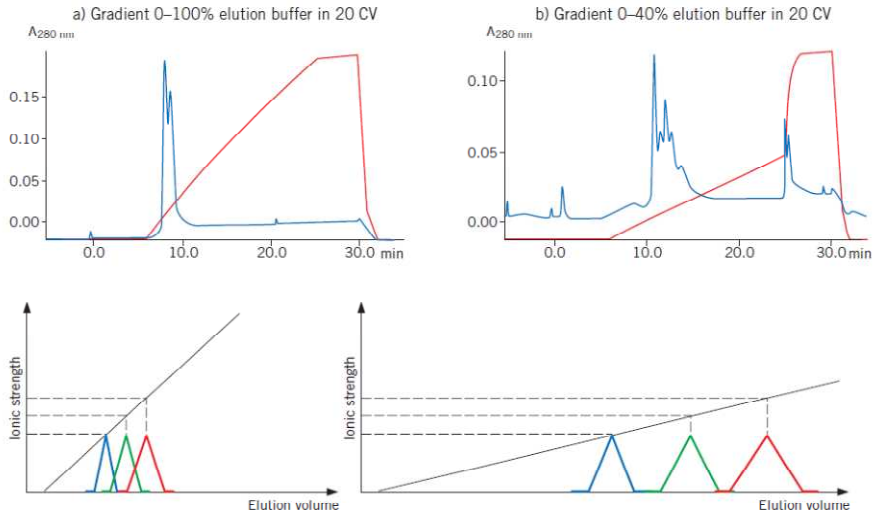


$5.5 < \text{pH} < 7.5$
pour la plupart des
protéines

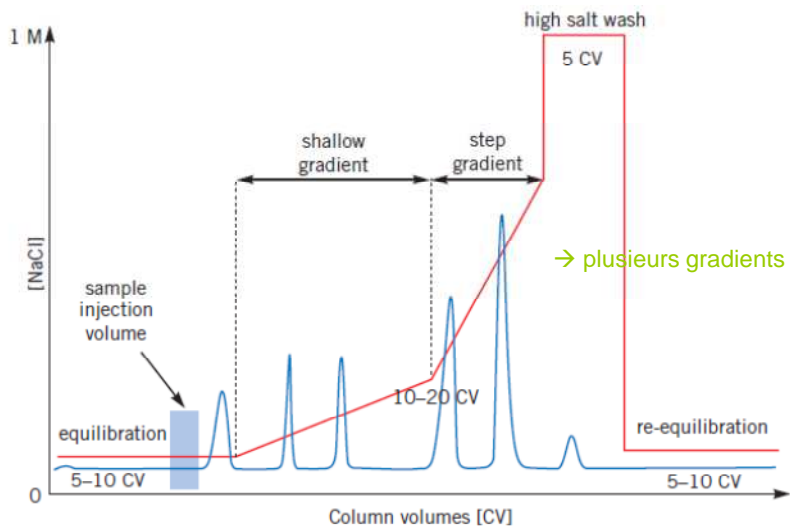
16

Elution : influence du gradient sur la séparation

Start buffer: 20 mM Tris, pH 7.0
 Elution buffer: 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7.0

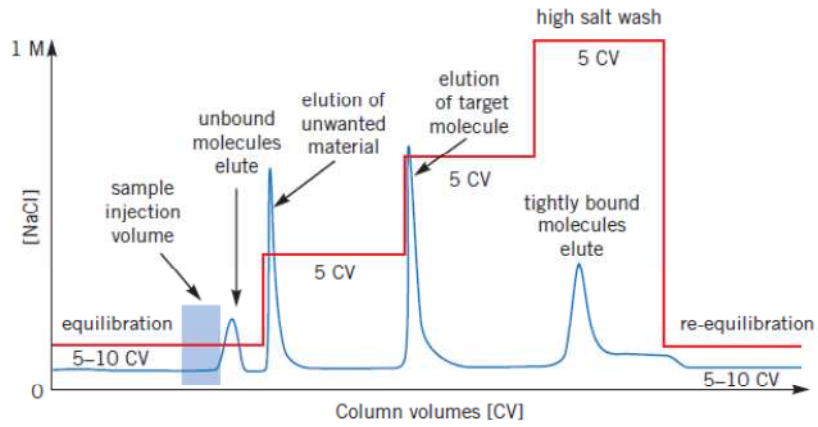


Elution : influence du gradient sur la séparation



18

Elution : influence du gradient sur la séparation



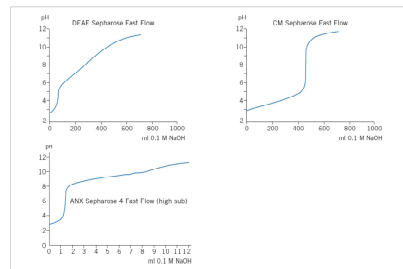
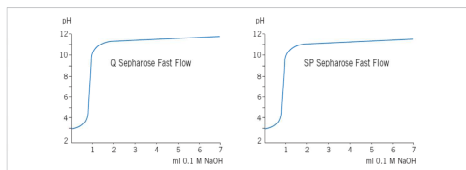
→ Éluion par paliers

19

Groupes fonctionnels utilisés comme échangeurs d'ions

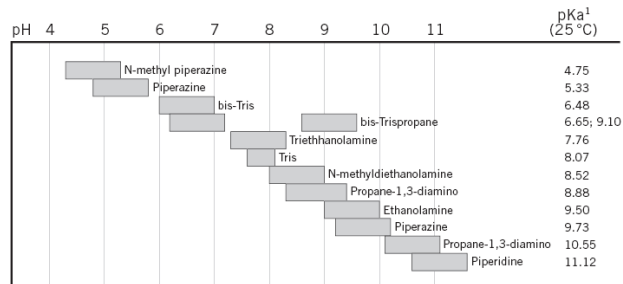
Anion exchangers		Functional group
Quaternary ammonium (Q)	strong	$-O-CH_2N^+(CH_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE) ⁺	weak	$-O-CH_2CH_2N^+(CH_2CH_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX) ⁺	weak	$-O-CH_2CHOHCH_2N^+(CH_2CH_3)_2$
Cation exchangers		Functional group
Sulfopropyl (SP)	strong	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CH_2SO_3^-$
Methyl sulfonate (S)	strong	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CHOHCH_2SO_3^-$
Carboxymethyl (CM)	weak	$-O-CH_2COO^-$

Stabilité de l'état d'ionisation sur une large gamme de pH

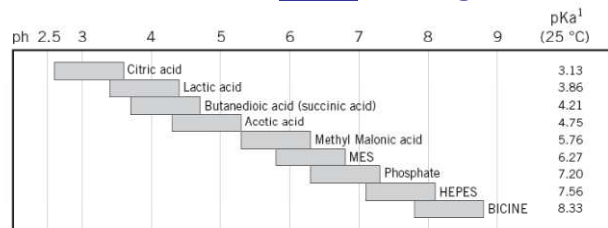


20

Non-volatile buffers for anion exchange chromatography



Non-volatile buffers for cation exchange chromatography



21

Animation

Echange d'ions appliqué à la purification de protéine

[..\Documentation\Protein purification\GE-Healthcare Handbook series\Animations\GE Ion Exchange.swf](#)

22

Chromatographie d'exclusion ou filtration sur gel ou perméation de gel

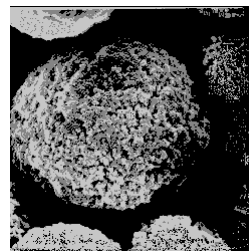
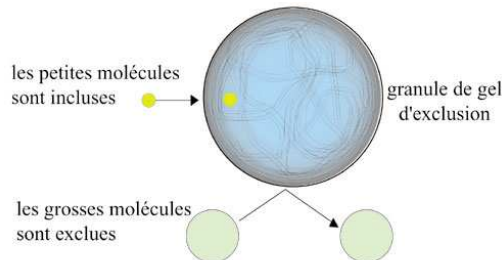
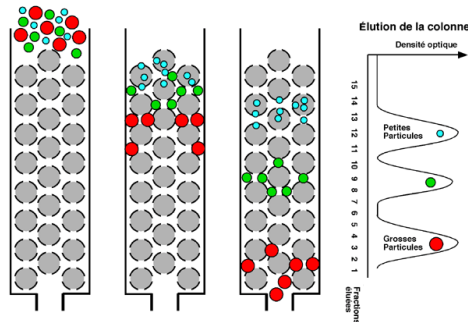


tamissage
moléculaire

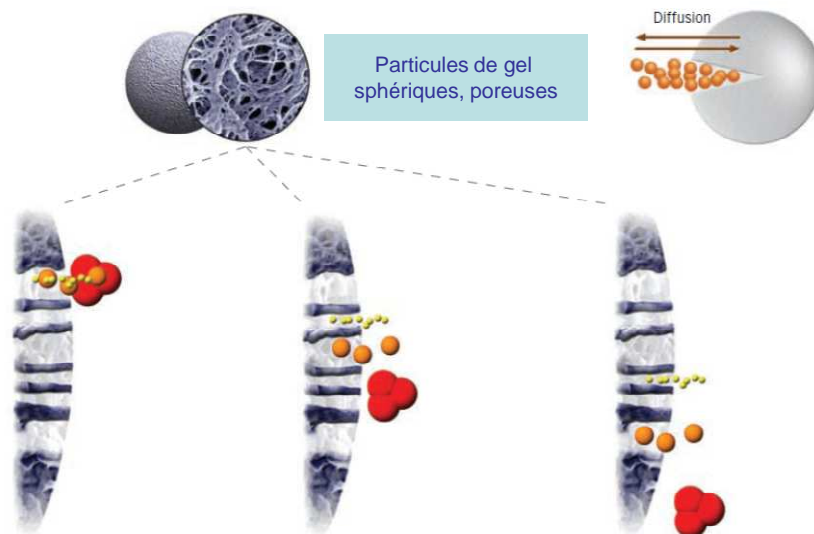


23

Chromatographie d'exclusion



24



25

Théorie de la chromatographie d'exclusion

On considère une colonne de volume total V_{total} remplie d'un gel solvaté :

$$V_{\text{total}} = V_0 + V_i + V_g$$

- V_0 = volume d'eau externe aux granules
- V_i = volume d'eau interne aux granules
- V_g = volume du gel

Un soluté est distribué dans l'eau interne et l'eau externe selon un coefficient de partage, K_d :

- si $K_d = 0$, le soluté est totalement exclu.
- si $0 < K_d < 1$, le soluté est partiellement inclus. Le taux d'inclusion augmente avec K_d .
- si $K_d = 1$, valeur théorique correspondant à une inclusion totale d'un composé dans le gel.
- si $K_d > 1$, le soluté est inclus et adsorbé.

26

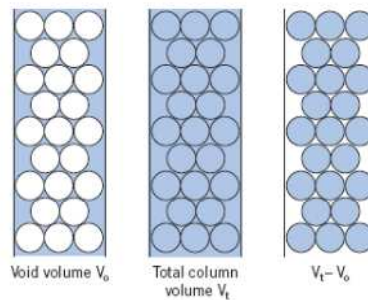
La constante K_d est égale à :

$$K_d = \frac{\text{concentration du soluté dans l'eau interne}}{\text{concentration du soluté dans l'eau externe}}$$

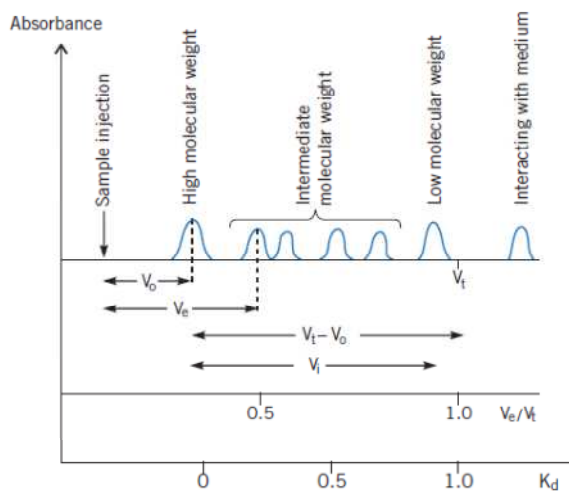
→ fraction de la phase stationnaire disponible pour la diffusion d'une molécule donnée

$$K_d = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

- V_t = volume total (il est mesuré en remplissant la colonne d'eau)
- V_0 = volume mort (il est déterminé en mesurant le V_e d'une substance totalement exclue), correspond à environ 30% du volume total de la colonne
- V_e = volume d'élué d'une substance donnée



27



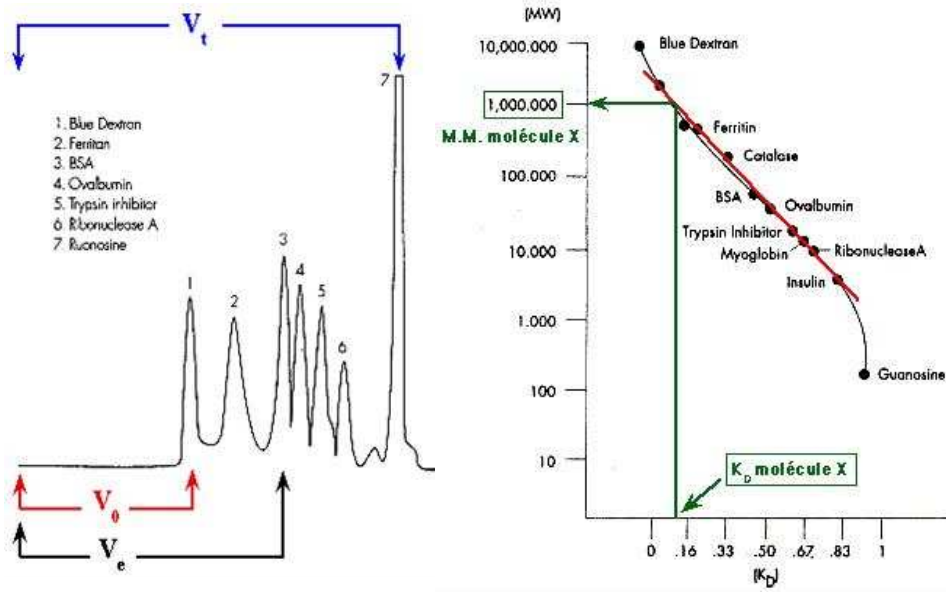
→ élué des solutés dans l'ordre inverse des masses moléculaires

V_0 : volume de la phase mobile

V_i : volume de tampon à l'intérieur de la matrice = V_s ,
volume de la phase stationnaire = $V_t - V_0 - V_g$

28

Détermination de la masse molaire d'un composé



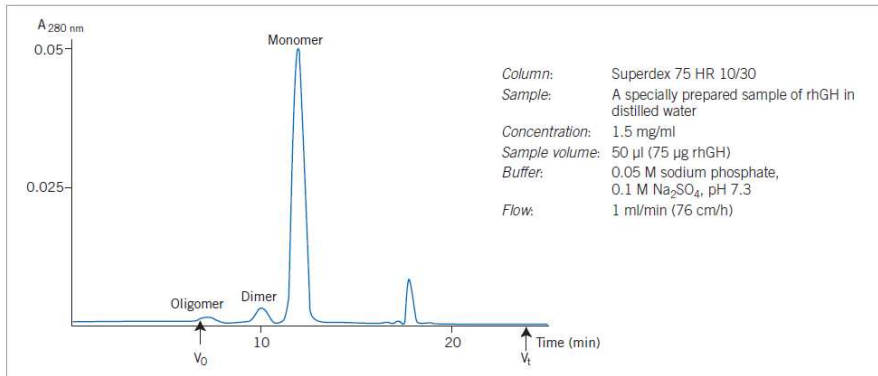
On définit le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel:

$$K_D = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

On trace la droite étalon : **log (masse molaire) = f (K_D)** (ou **masse molaire = f(K_D)** sur une échelle semi-logarithmique).

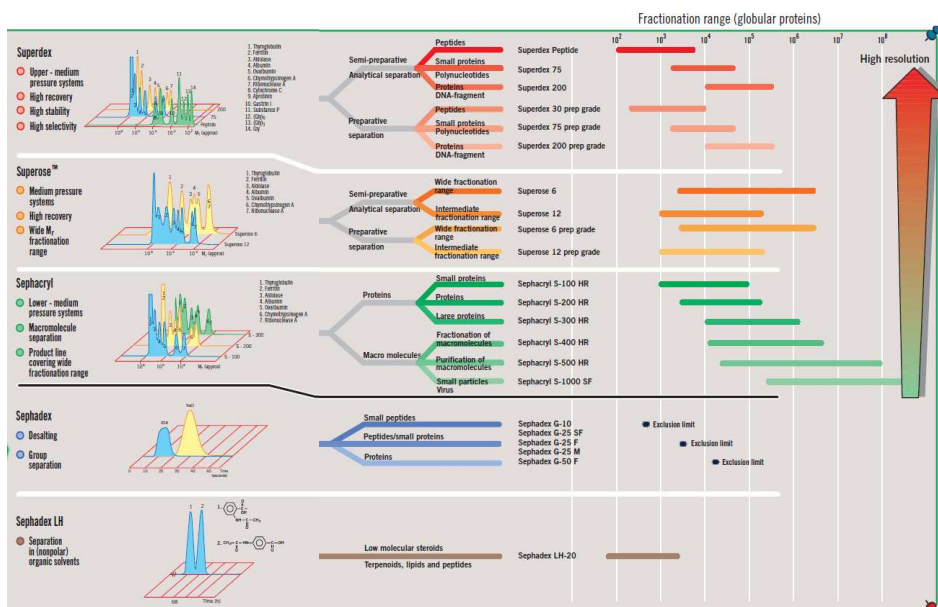
La partie linéaire de cette droite (en rouge) permet de déterminer la masse molaire d'une **molécule X** dont le volume d'éluion a été mesuré dans les **mêmes conditions**, en reportant son **K_D** .

Détermination de l'état d'association d'une protéine en solution



31

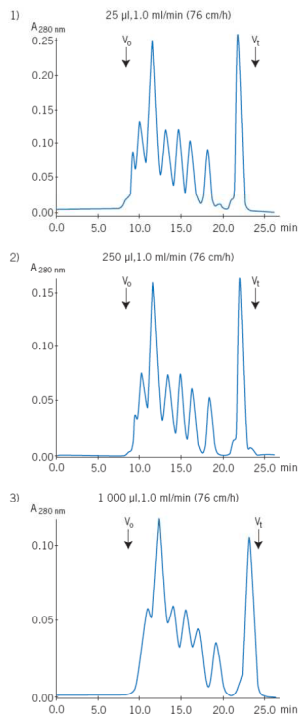
Choix du gel



Choix du gel

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

33



Volume de l'échantillon

colonne : 24 ml

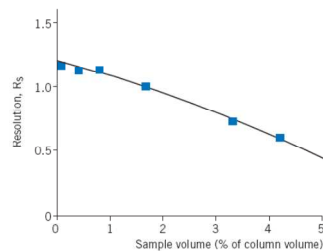
échantillon :

1) 25 µl (1‰)

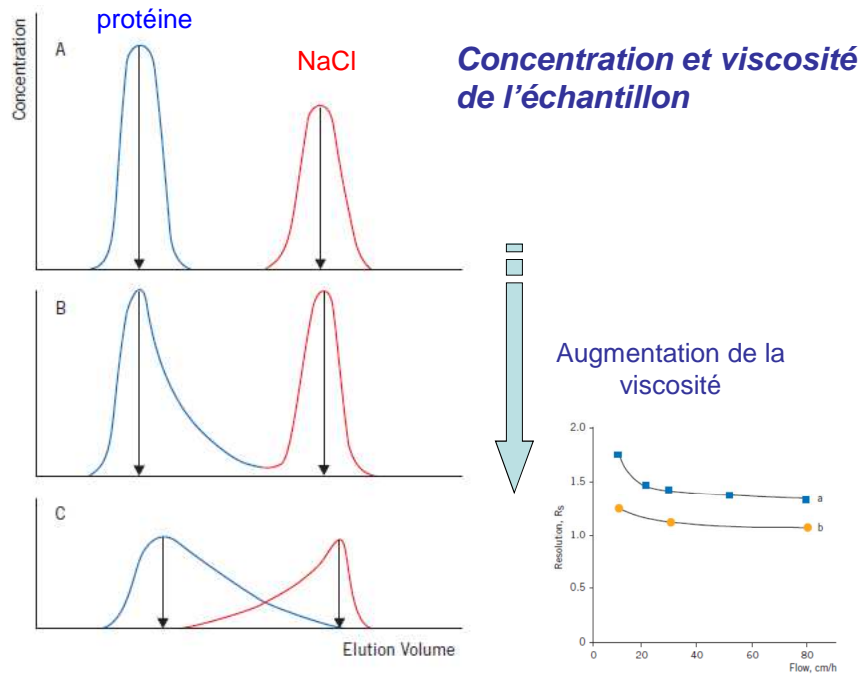
2) 250 µl (1%)

3) 1000 µl (4%)

→ volume recommandé : 0.5 – 4%
du volume de la colonne
(en général < 2%)

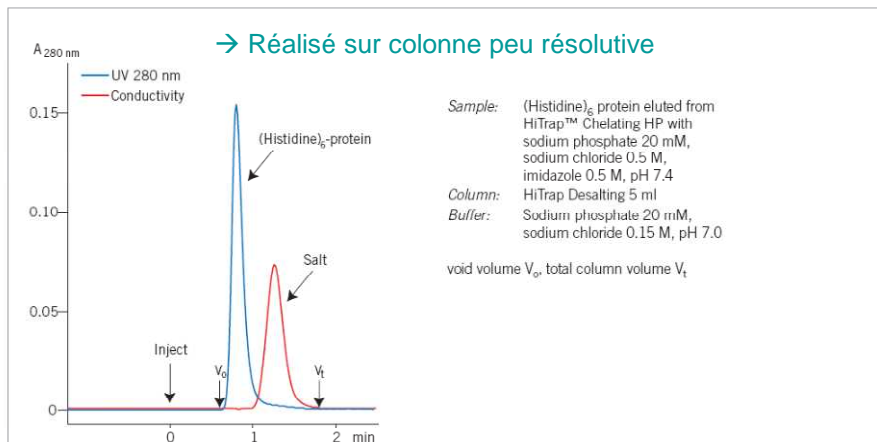


34



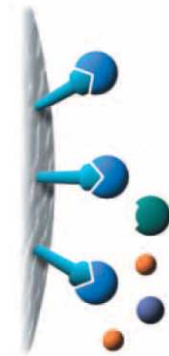
35

**Cas particulier de la chromatographie d'exclusion :
dessalage / changement de tampon**



36

Chromatographie d'affinité



37

Chromatographie d'affinité

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser.

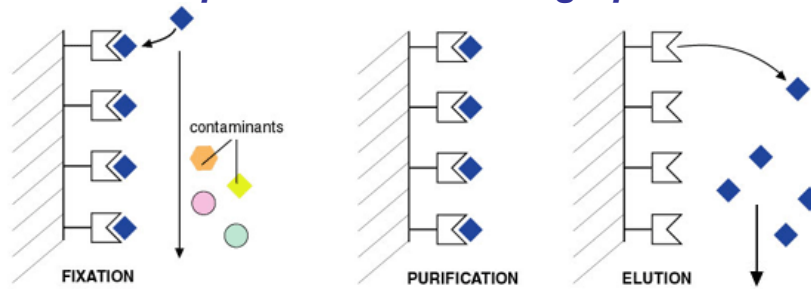
Trois types d'affinités sont utilisées :

- affinité enzyme-substrat
- affinité récepteur-ligand
- affinité antigène-anticorps

Très souvent, la molécule fixée sera le substrat, le ligand, ou bien l'anticorps. Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement.

38

Les 3 étapes d'une chromatographie d'affinité



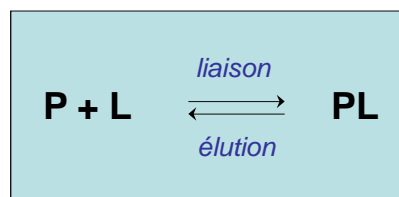
1 - Etape de **FIXATION** : Le mélange de molécules contenant le composé à purifier est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.

2 - Etape de **PURIFICATION** : En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.

3 - Etape d'**ELUTION** : La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluat.

39

Souvent l'un des partenaires de l'interaction est une protéine (P), l'autre sera qualifié de ligand (L) de cette protéine



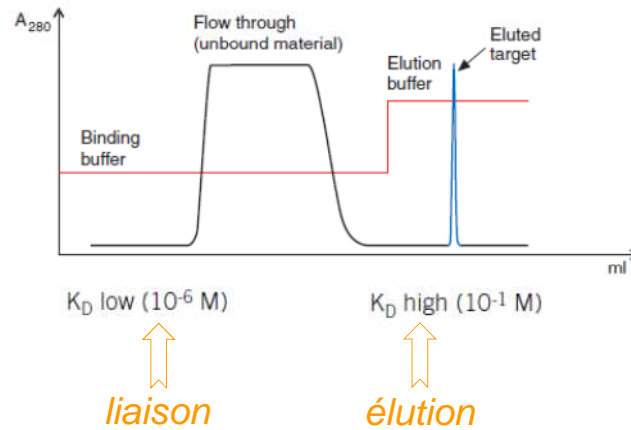
La constante définissant cet équilibre est:

$$\mathbf{Kd = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]}}$$

40

Elution par altération des conditions permettant la liaison

→ pH, force ionique, température, compétiteur ...



41

Elution : les différentes stratégies



Méthode 1. Changement de composition du tampon qui n'altère ni le ligand, ni la cible

Méthode 2. Changement de pH vers des pH extrêmes ou ajout d'agents chaotropiques (urée, chlorure de guanidinium) qui peuvent altérer la cible temporairement ou de manière permanente

Méthodes 3 et 4. Compétition d'une substance qui va déplacer la cible soit en se liant à l'effecteur (cas 3), soit en se liant à la cible même (cas 4)

42

Phases stationnaires pour la chromatographie d'affinité

Résine	Affinité pour...	affinité	mode d'éluion
antigène	anticorps	très forte	pH
anticorps	antigène	très forte	pH
protéine A/G	IgG (différentes classes et sous-classes)	forte	pH
glutathion	GST+ protéine fusionnée à une GST	forte	glutathion
calmoduline	ATPases, protéine kinases, phosphodiésterases, neurotransmetteurs	forte	
AMP, ADP, ATP	kinases dépendantes de l'ATP, enzymes à cofacteurs	moyenne	co-facteur
DNA-agarose	ADN polymérases, protéines liant l'ADN	très forte	oligonucléotide, température, dénaturants
héparine	Lipases, protéines liant l'ADN	moyenne	force ionique
Poly(U) sepharose	Transcriptase réverse, ARNm		
Arginine sepharose	Sérine protéases		
Lysine sepharose	ARNr		
Cibacron blue F3G-A (colorant bleu)	enzymes nécessitant des nucléotides, enzymes à cofacteurs NAD ou NADP, albumine, facteurs de coagulation, interféron	moyenne	
ConA Sepharose	glycoprotéines contenant du a-D-mannose, du a-D-glucose et des sucres similaires		
Wheat Germ Lectin Sepharose	glycoprotéines contenant du N-acetyl-β-D-glucosamine	moyenne à forte	glucanne

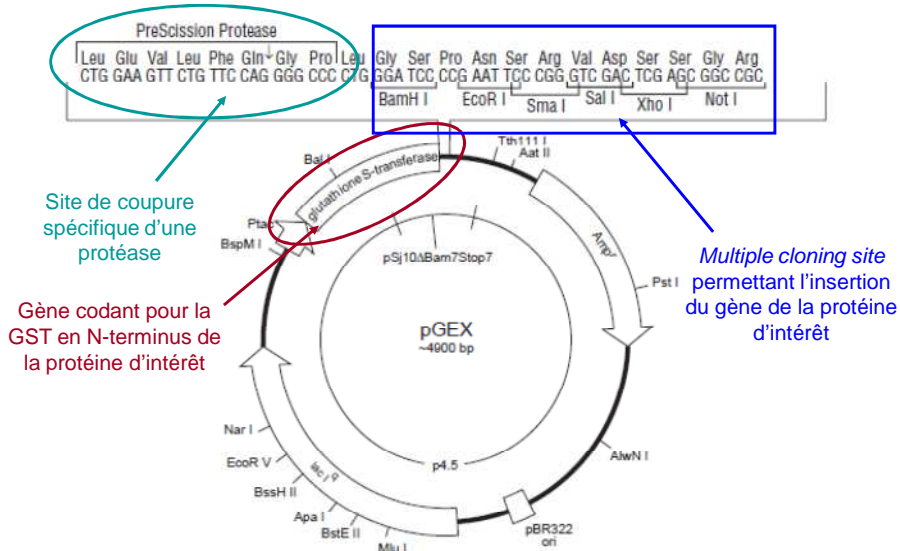
43

Phases stationnaires pour la chromatographie d'affinité

Résine	Groupe à coupler
CNBr-activated Sepharose 4B	-NH ₂
EAH Sepharose 4B	-COOH
Activated thiol sepharose 4B	-SH
rProtein A sepharose	Partie Fab des anticorps

44

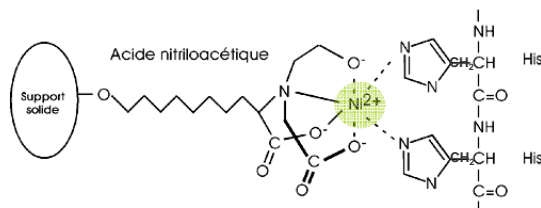
Purification des protéines portant une étiquette ('tag') : expression hétérologue dans *E. coli*



45

Purification des protéines portant une étiquette ('tag') : Histidine-tag

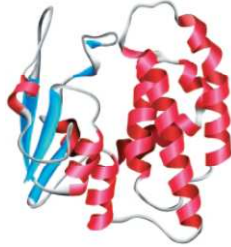
IMAC (immobilized metal affinity chromatography)



- ↳ Coordination d'un atome métallique bivalent (Ni²⁺ ou Cu²⁺ ou Zn²⁺)
- ↳ Elution : compétition avec l'imidazole
- ↳ Conditions dénaturantes possible (6M chlorure de guanidinium ou 8M urée)
- ↳ En absence d'agents chélatant (EDTA, EGTA, citrate) et de réducteurs (DTT, DTE, β-ME)

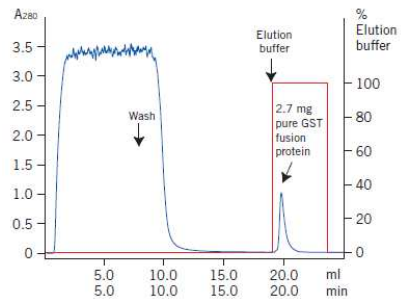
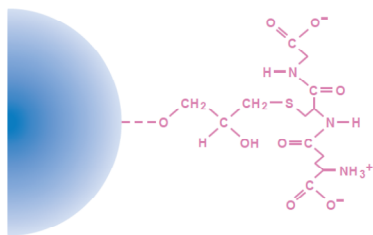
46

Purification des protéines portant une étiquette ('tag') : GST-tag



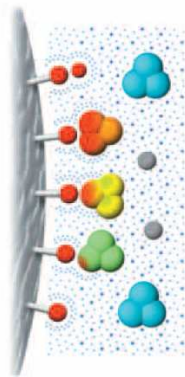
GST= glutathione S-transferase (Mr 26 000 Da)

- Affinité pour le glutathion immobilisé sur la matrice
- Élué de la protéine d'intérêt par compétition avec le glutathion
- Conditions dénaturantes impossible
- Possibilité d'utiliser agents chélatant et réducteurs



47

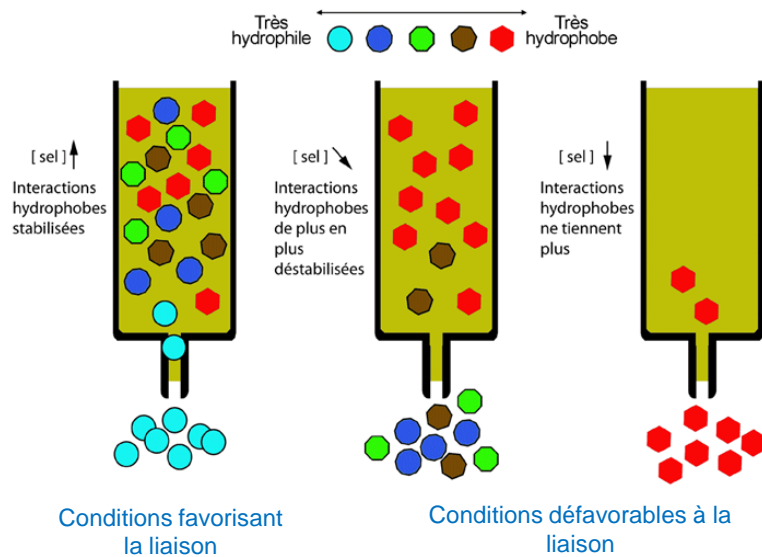
Chromatographie d'interaction hydrophobe



*Cas particulier de la
chromatographie d'affinité*

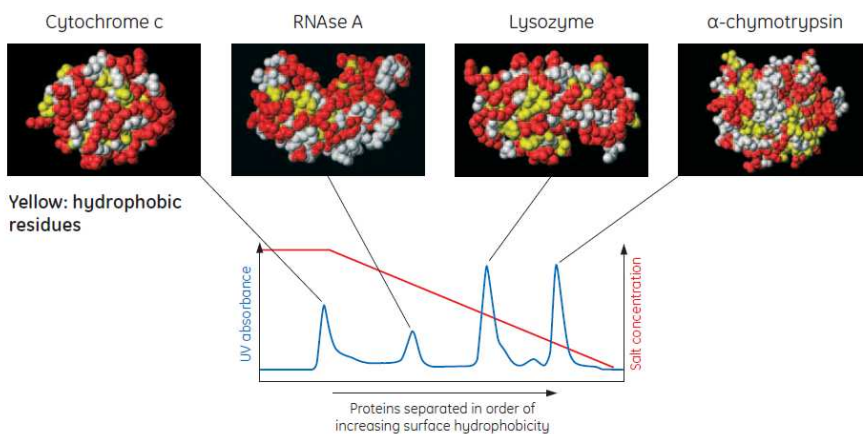
48

Principe de la chromatographie d'interaction hydrophobe



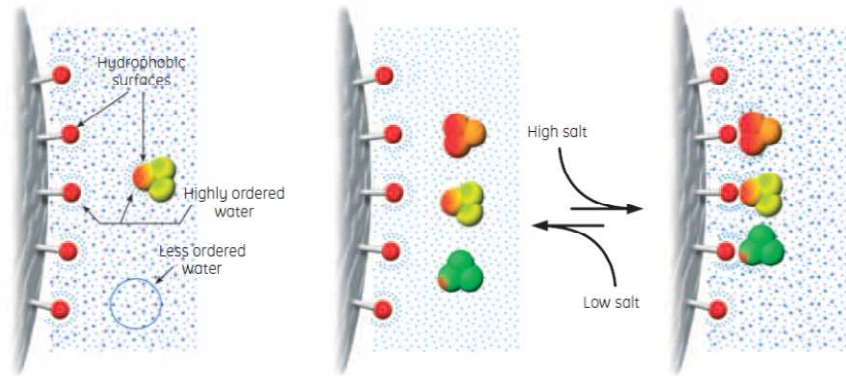
49

Chromatographie d'interaction hydrophobe et hydrophobicité de surface des protéines



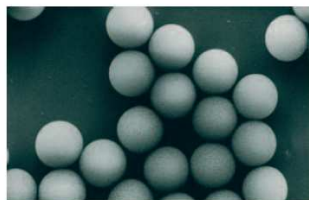
50

Chromatographie d'interaction hydrophobe : le rôle de l'eau



51

Phases stationnaires pour la chromatographie d'interaction hydrophobe



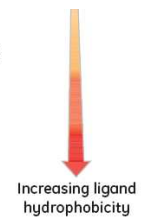
Ligand

Ether (ETH) $-O-CH_2-CHOH-CH_2-OH$

Isopropyl (ISO) $-O-CH-(CH_3)_2$

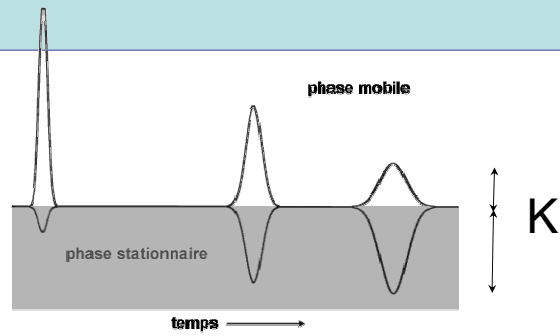
Butyl $-O-(CH_2)_3-CH_3$

Phenyl $-O-C_6H_5$



52

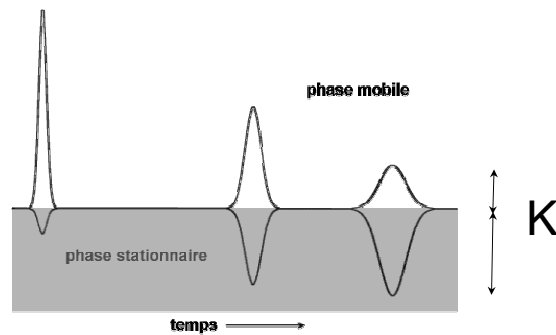
Chromatographie de partage



53

Chromatographie de partage sur papier

Chromatographie liquide-liquide, *essentiellement qualitative*, fondée sur la (ré)partition différentielle de chacun des solutés entre deux liquides non miscibles: l'un constituant la phase stationnaire, l'autre la phase mobile
→ basée sur la différence de solubilité des espèces à séparer



support : solide poreux, inerte, imprégné de liquide (cellulose, gel de silice...)

54

Principe chromatographique

Séparations basées sur les différences de distribution des solutés entre deux phases non miscibles

coefficient de partage : $K = \frac{[S_{org.}]}{[S_{aq.}]}$

$[S_{org.}]$: concentration en soluté S dans la phase organique

$[S_{aq.}]$: concentration en soluté S dans la phase aqueuse.

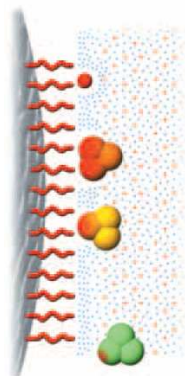
Plus K est faible, plus le composé est fortement absorbé dans la phase aqueuse, en général assimilé à la phase stationnaire, et plus la rétention est grande, et vice versa.

La valeur de K dépend :

- de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des phases
- de la nature de la phase stationnaire qui est un adsorbant ou un solvant pour chacun des composés
- de la phase mobile, seulement si elle est un liquide, et donc un solvant pour chacun des composés
- de la température qui affecte les pressions de vapeur et les solubilités

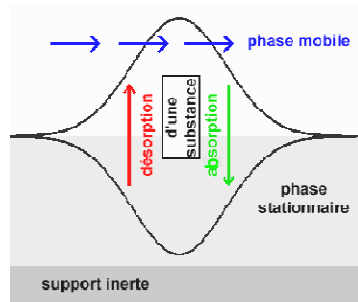
55

Chromatographie d'adsorption

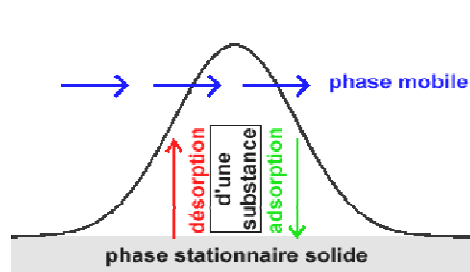


56

aBsorption



aDSORPTION

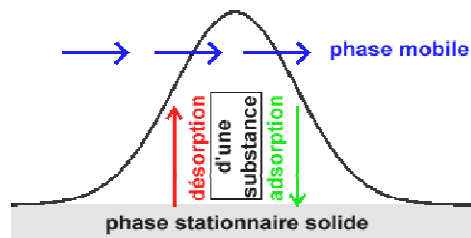


En physique et en chimie, l'absorption, par opposition à adsorption, consiste à joindre la molécule absorbée à une autre ce qui entraîne sa disparition par transformation ou modification chimique

57

Chromatographie d'adsorption

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

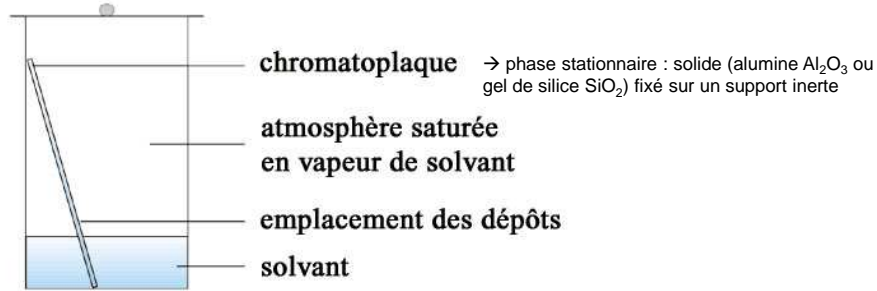


Répartition des molécules entre les deux phases dont l'une est solide.
Ici les molécules sont adsorbées à la surface du solide.

58

Chromatographie sur couche mince

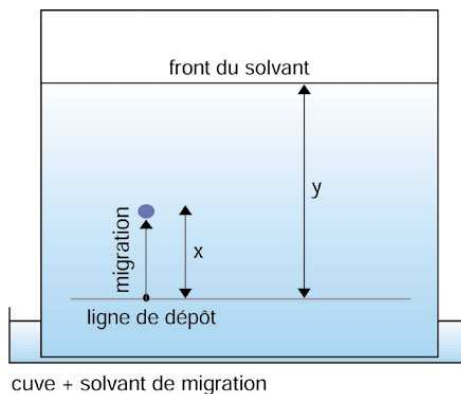
Schéma d'une CCM



Chromatographie liquide-solide, utilisée essentiellement en analyse qualitative, fondée sur la différence d'adsorption, sur la phase stationnaire, de chacun des solutés entraînés par l'éluant
→ les constituants migrent avec la phase mobile selon leur polarité

59

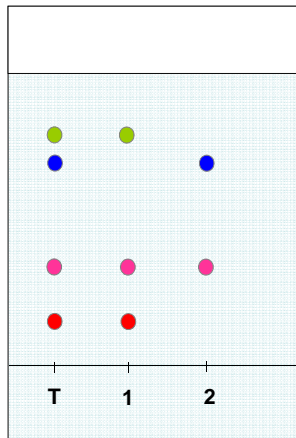
Rapport frontal



$$R_F = \frac{x}{y} \quad (R_F < 1)$$

60

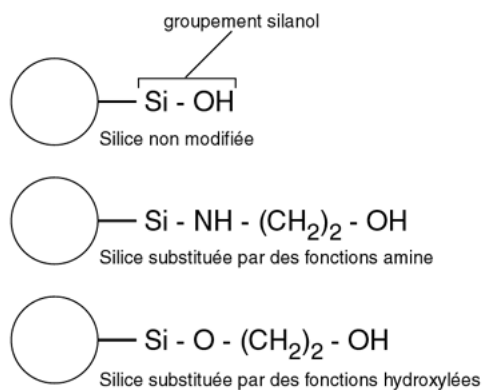
Révélation



- composés colorés → visibles à l'œil nu
- composés absorbant l'UV (aromatiques, hétérocycles...) & composés fluorescents → lampe UV (254 & 360 nm)
- les autres composés → utilisation d'un révélateur qui, par réaction chimique avec le composé, va donner un produit coloré (destruction du composé à analyser) : I_2 , ninhydrine,...

61

Silices polaires greffées



62

Solvent	Polarity index acc. to Snyder	Dielectricity constant DK (20 resp. 25 ° C)	Molar Mass (g/mol)	Boiling point (°C)	Vapour pressure (20 °C) (mbar)
n-Heptane	-	1.9	100.21	98.4	48
n-Hexane	0.0	1.9	86.18	68.9	160
Cyclohexane	0.0	2.0	84.16	80.7	104
Isooctane	0.4	1.9	114.23	99.2	51
1,1,2-Trichlorotrifluoroethane	-	2.4	187.38	47.7	368
Carbon Tetrachloride	1.7	2.2	153.82	76.5	120
Toluene	2.3	2.4	92.14	110.6	29
tert-Butyl methyl ether	2.9	-	88.15	55.2	417
Chloroform	4.4	4.8	119.38	61.7	210
Dichloroethane	3.7	10.6	98.97	83.4	87
Dichloromethane	3.4	9.1	84.93	40.0	453
1-Butanol	3.9	17.8	74.12	117.2	6.7
Acetonitrile	6.2	37.5	41.05	81.6	97
2-Propanol	4.3	18.3	60.10	82.4	43
Ethyl acetate	4.3	6.0	88.10	77.1	97
Acetone	5.4	20.7	58.08	56.2	233
Ethanol	5.2	24.3	46.07	78.5	59
1,4-Dioxane	4.8	2.2	88.11	101.0	41
Tetrahydrofuran	4.2	7.4	72.11	66.0	200
Methanol	6.6	32.6	32.04	65.0	128
Water	9.0	80.2	18.01	100.0	23

Solvants pour la chromatographie en phase normale

63

Chromatographie d'adsorption en phase inversée

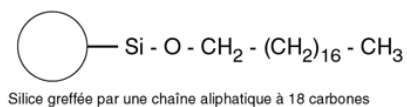
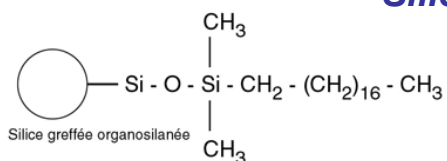
C'est une chromatographie d'adsorption liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire se distingue par son apolarité. Elle est constituée, la plupart du temps, par des silices apolaires greffées. Il existe des greffons apolaires de taille différente, de 2 à 18 atomes de carbone (C2 à C18), donc de polarités différentes.

La phase mobile est polaire et hydrophile. Les séparations sont fondées sur des interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire.

Ainsi, plus un soluté est apolaire, plus il sera retenu au niveau de la phase solide stationnaire. A l'inverse, plus un soluté est polaire, plus il sera entraîné par la phase mobile liquide.

64

Silices apolaires greffées



Dans la pratique, cette chromatographie ne s'applique qu'en HPLC, elle porte le nom de RP-HPLC (ou Reverse Phase HPLC, ou HPLC en phase inverse).

La RP-HPLC s'applique bien à la séparation de petites molécules apolaires : lipides, acides aminés, peptides.

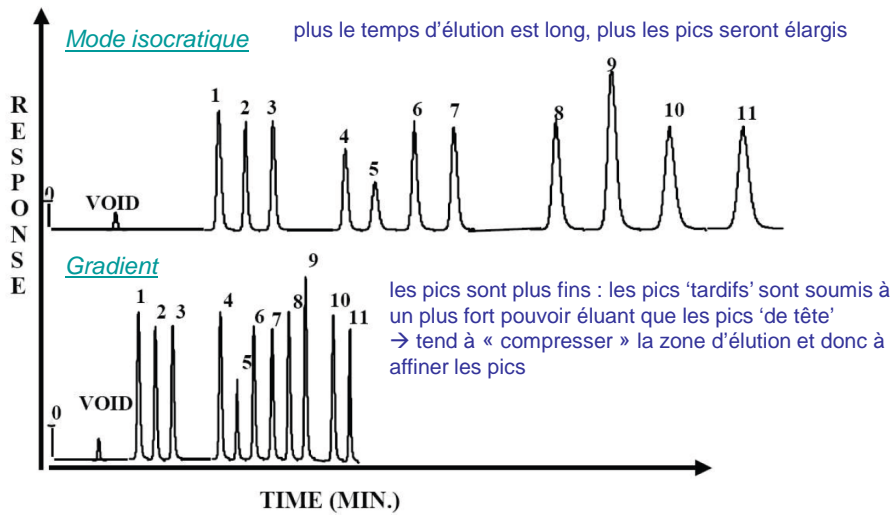
65

Solvants pour la chromatographie en phase inverse

Name	MW	BP, °C	R.I.	UV, nm	Viscos., cP	M, Debye
Acetonitrile	41	82	1.341	195	0.358	3.37
Dioxane	88	101	1.421	215	1.26	0.45
Ethanol	46	78	1.359	205	1.19	1.68
Methanol	32	65	1.326	205	0.584	1.66
Isopropanol	60	82	1.375	205	2.39	1.68
Tetrahydrofurane, THF	72	66	1.404	215	2.20	1.70
Water	18	100	1.333	185	1.00	1.84

66

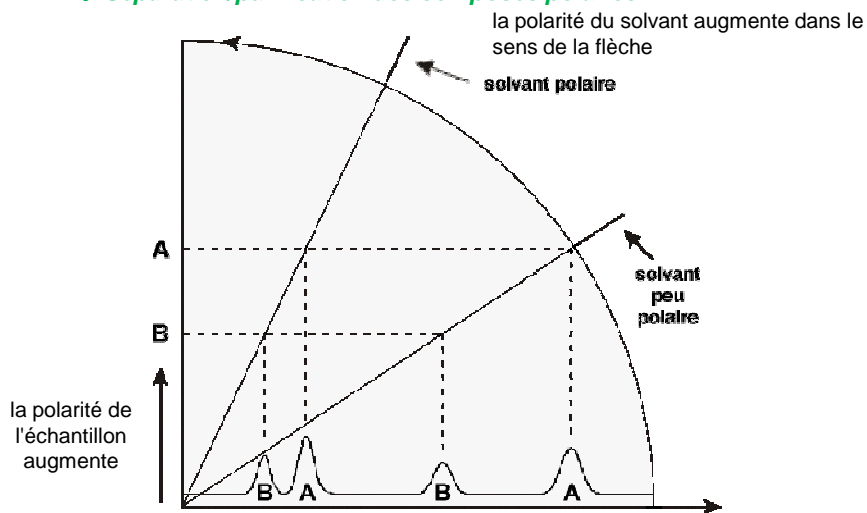
Elution isocratique ou gradient d'élution



67

Phase normale : adsorbant polaire

→ Séparation/purification des composés polaires

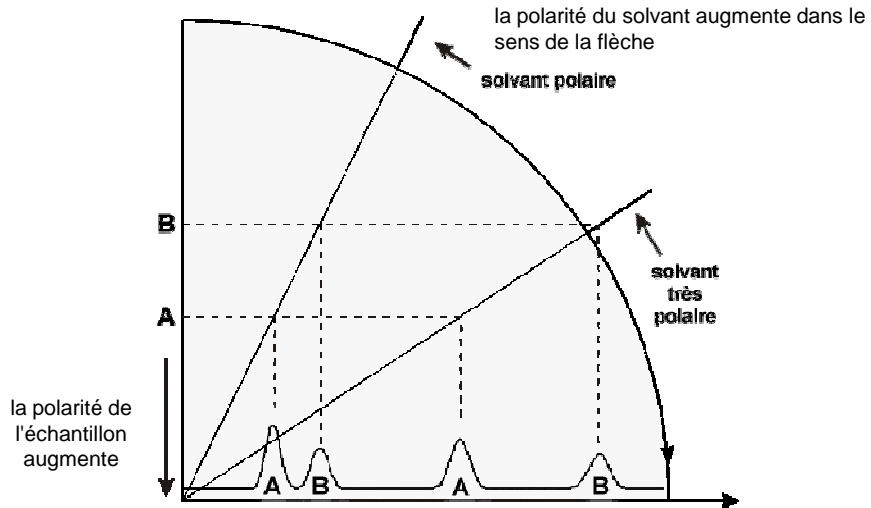


A est plus polaire que B

68

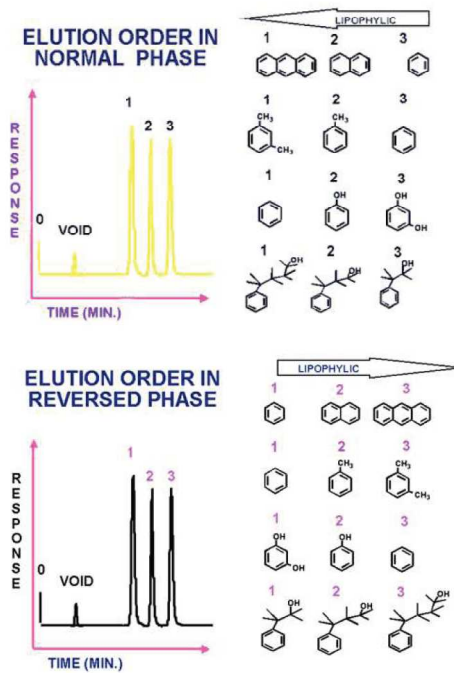
Phase inversée : adsorbant apolaire

→ Séparation/purification des composés apolaires



A est plus polaire que B

69



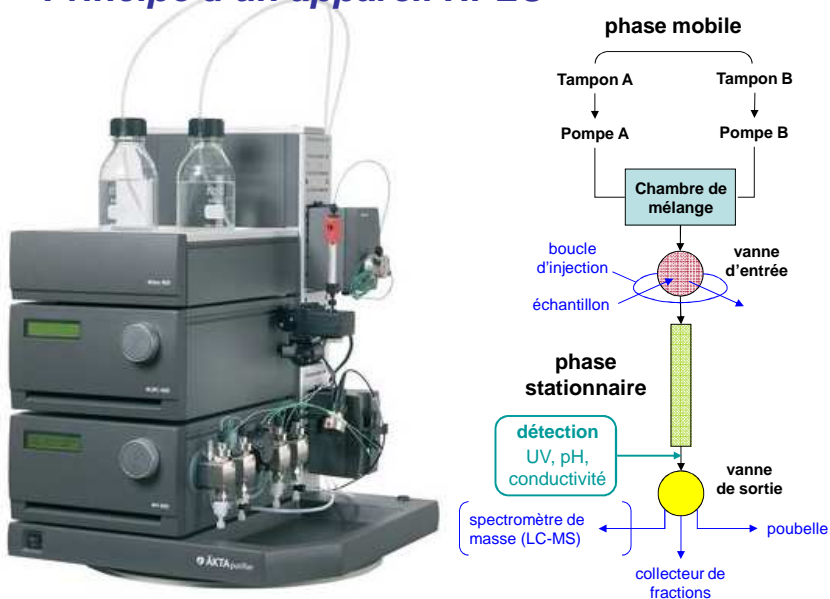
70

Chromatographie en phase liquide

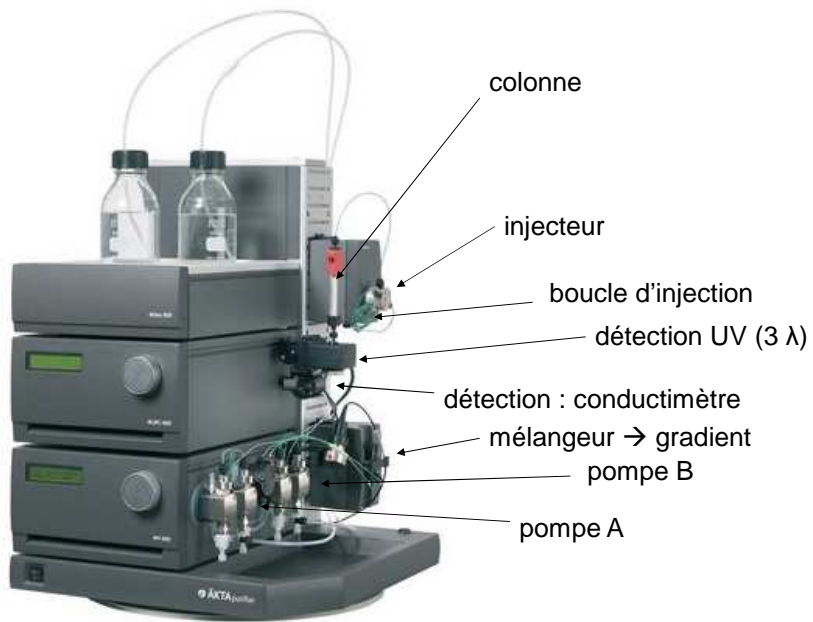
	<i>type</i>	<i>phase stationnaire</i>
<i>liquide/solide</i>	adsorption	solide poreux
	échange d'ions Interactions hydrophobes affinité	solide à la surface duquel se trouvent des effecteurs (composés ioniques ou hydrophobes, ligands) qui permettent, à l'aide d'un solvant approprié, l'échange de solutés (ions, protéines, récepteurs) présents dans la phase mobile
	exclusion (filtration sur gel ou perméation de gel)	solide dont la dimension des pores permet la séparation des espèces selon leur taille
<i>liquide/liquide</i>	partage phase normale	solide poreux inerte enrobé de liquide (de moins en moins utilisée)
	partage phase inversée	solide poreux sur lequel sont greffées des chaînes hydrocarbonées non-polaires

71

Principe d'un appareil HPLC

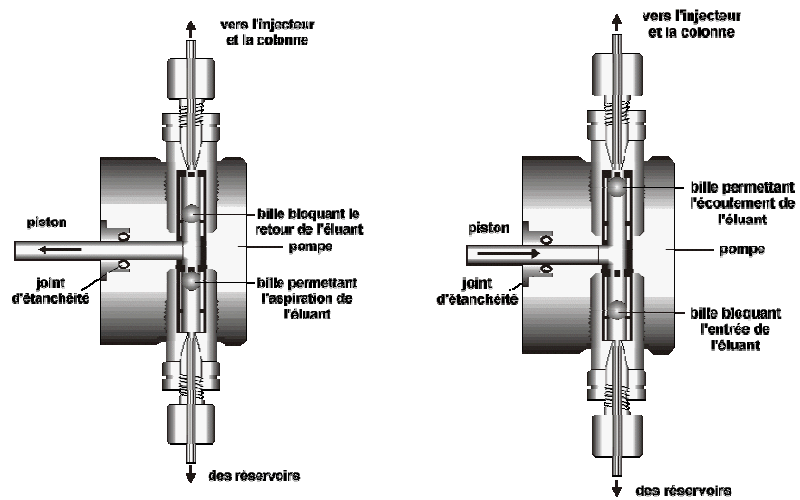


72



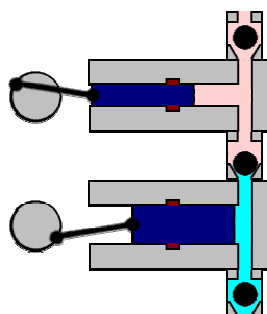
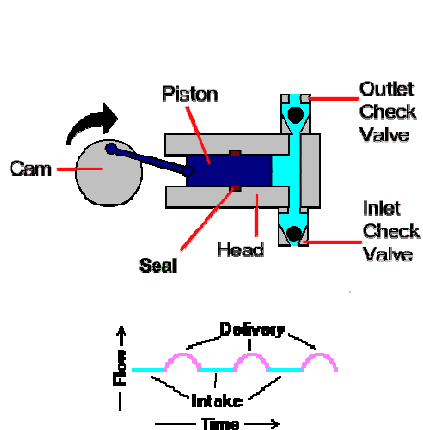
73

Pompes



74

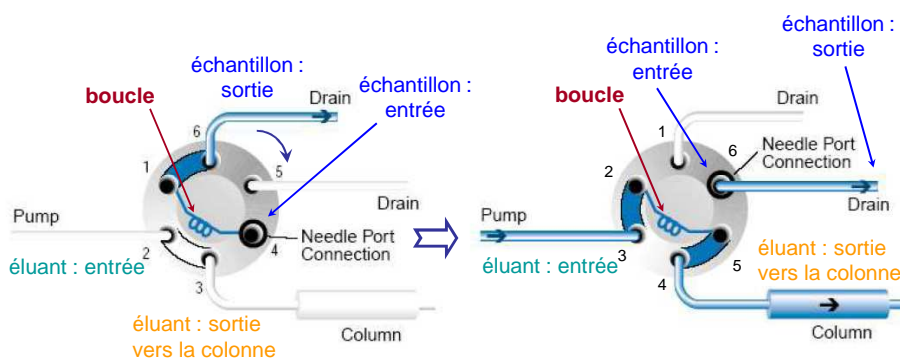
Pompes à double piston



→ débit de la pompe plus constant
(certains détecteurs sont sensibles aux 'pulsations' du débit)

75

Injecteurs à boucle



Remplissage de la boucle
(mode 'load')

Injection sur la colonne
(mode 'inject')

76

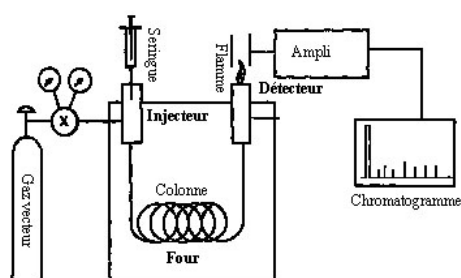
Détecteurs

Détecteurs	Système	Limite de détection
Spectrométrie de masse (MS)	GC, HPLC	< 0.1 ppb
Ionisation de flamme (FID)	GC	< 1 ppm
Absorbance (DAD)	HPLC, GC	1 ppb
Indice de réfraction (RID)	HPLC, GC	1 ppm
IRTF	HPLC, GC	> 10 ppm
Diffusion de la lumière (LALLS)	HPLC, GC	> 10 ppm
Viscosimétrie	HPLC, GC	
Conductivité		
Électrochimique (redox reaction)		
Fluorescence		
RMN		

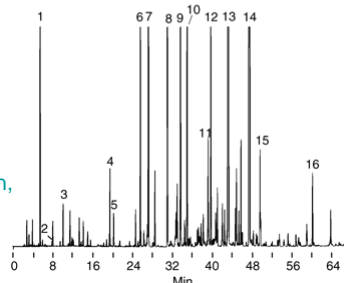
77

Chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC)

→ phase mobile = gaz vecteur (gaz porteur)



1. α-Pinène
2. β-Pinène
3. Limonène
4. cis-Rose oxide
5. trans-Rose oxide
6. Menthone
7. Isomenthone
8. Linalool
9. Guaia-6,9-diene
10. Citronellyl formate
11. α-Terpineol
12. Geranyl formate
13. Citronellol
14. Geraniol
15. Geranyl butyrate
16. Geranyl tiglate



Chromatogramme de l'essence de géranium

→ la plus performante au point de vue de la séparation, est réservée aux produits volatils et thermostables. (Masse moléculaire < 500 Daltons)

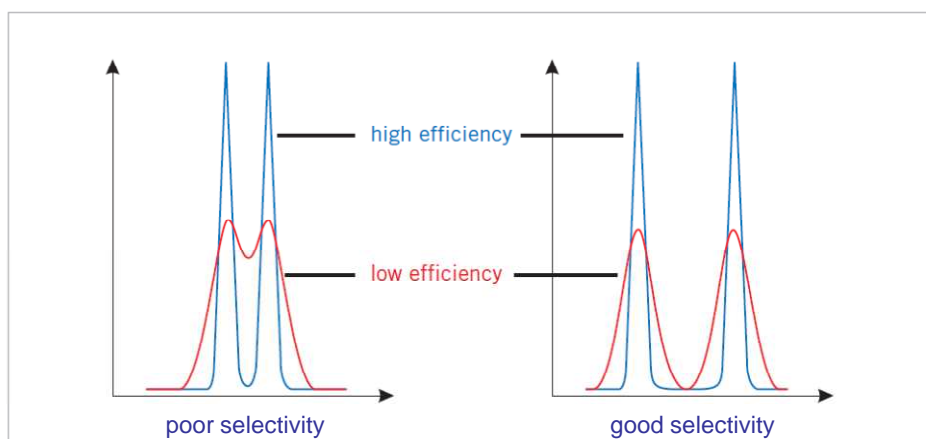
- gaz - liquide (la plus répandue)
- gaz - solide

78

Principes chromatographiques de séparation

79

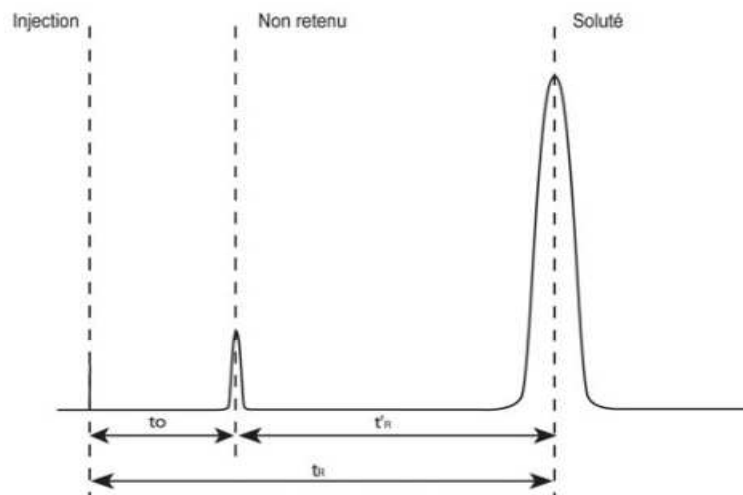
Résolution: efficacité et sélectivité



efficacité (N) \Leftrightarrow élargissement des pics
sélectivité (α) \Leftrightarrow degré de séparation entre les pics

80

Paramètres liés à la rétention



81

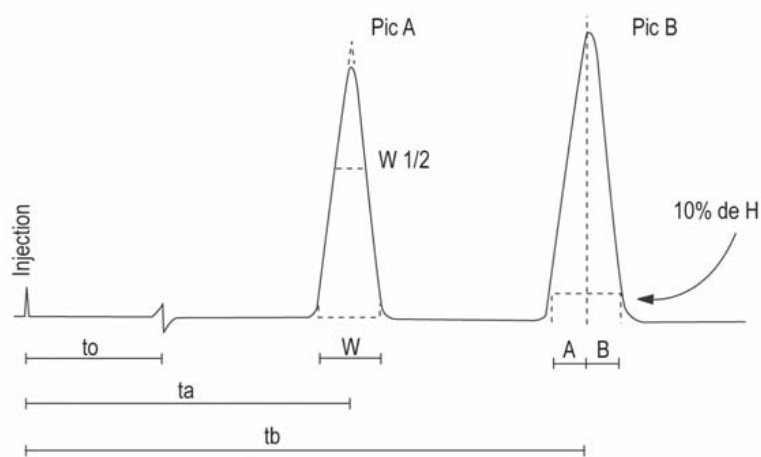
Constante	Définition	Commentaires
V_0	Volume mort (ou volume vide, en mL) de la colonne $V_0 = D \times t_0$	C'est le volume de rétention du non-retenu. Il est lié au vide entre et dans les particules (pour une silice de 5 μm , 50-75% du volume géométrique de la colonne)
t_0	Temps de rétention d'un composé non-retenu (mn) ou temps mort	Un composé non retenu est un composé sans interaction avec la phase stationnaire (ne pas confondre avec un composé exclu)
D	Débit en ml/min	$D = V_0 / t_0$
t_R	Temps de rétention mesuré au sommet du pic (mn) $V_e = D \times t_R$	Temps passé par le composé dans l'appareillage chromatographique mais qui est susceptible de varier en fonction : - du débit (fuite, ...) - de la température (saison, ...) - de la phase mobile (évaporation, additifs de stabilisation, ...) - du vieillissement de la colonne

82

Constante	Définition	Commentaires
t'_R	Temps de rétention réduit $t'_R = t_R - t_0$	Temps de séjour d'un composé passé dans ou sur la phase stationnaire
k' (ou k)	Facteur de capacité (ou facteur de rétention) $k' = t'_R / t_0 = (t_R - t_0) / t_0$	Paramètre fondamental caractérisant la rétention du composé par le système chromatographie (ou vitesse de progression des composés sur la colonne) S'apparente au coefficient de partage K : exprime le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile Indépendant du débit ou de la longueur de la colonne Pour un même composé, si on observe : - $k' < 1$: élution trop rapide - $1 < k' < 5$: élution optimale - $k' > 5$: élution trop lente

83

Paramètres liés à l'efficacité de l'appareillage



t_R : temps de rétention

W_t : largeur du pic à la base en unité de temps

84

L'efficacité d'une colonne dépend du degré d'élargissement du pic qui se produit à mesure que l'analyte parcourt la colonne. Cet élargissement dépend du temps de séjour de l'analyte dans les 2 phases :

- t_R grand : pics larges
- t_R petit : pics fins

L'efficacité d'une colonne s'évalue à partir de l'un ou l'autre de ces deux termes :

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

L'efficacité augmente quand N augmente ou quand H diminue à L constante.

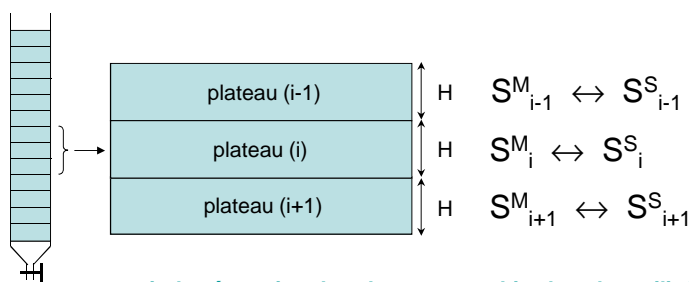
σ est la variance, ω est la largeur du pic à la base, δ (ou $\omega_{1/2}$) la largeur du pic à mi-hauteur :

$$N = \frac{L}{H} \quad \text{et} \quad H = \frac{\sigma^2}{L}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5,54 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

85

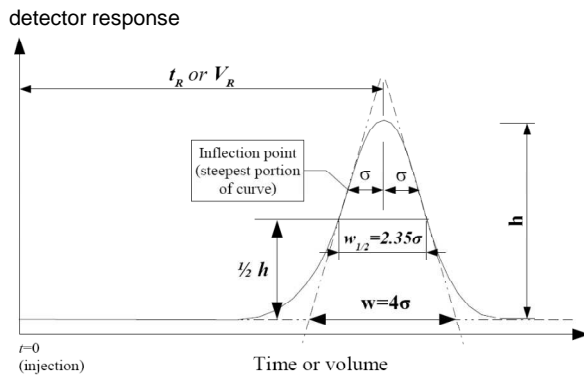
Notion de plateau théorique



pouvoir de séparation des chromatographies les plus utilisées

Type de chromatographies	Nombre de plateaux théoriques N	N/par mètre de colonne	H (HETP) en mm
CPG (colonne remplie de 2 m)	2000	1000	1
CPG (colonne capillaire de 25 m)	100000	4000	0,25
LC classique de 50 cm	100	200	5
HPLC de 10 cm	5000	50000	0,02

86



$$N = \frac{L}{H} = \frac{L^2}{\sigma^2} = 16 \frac{L^2}{w^2} \equiv 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

87

Le nombre de plateaux théoriques et effectif N_{th} et N_{eff} : efficacité de la colonne

$$N_{th} = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{\omega} \right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right)^2$$

ω = largeur du pic à la base

$\omega_{1/2}$ = largeur du pic à mi-hauteur

$$N_{eff} = 16 \cdot \left(\frac{t_r - t_0}{\omega} \right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t_r - t_0}{\omega_{1/2}} \right)^2 = N_{th} \cdot \left(\frac{k}{1+k} \right)^2$$

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

L = longueur de la colonne

N = nombre de plateaux théoriques

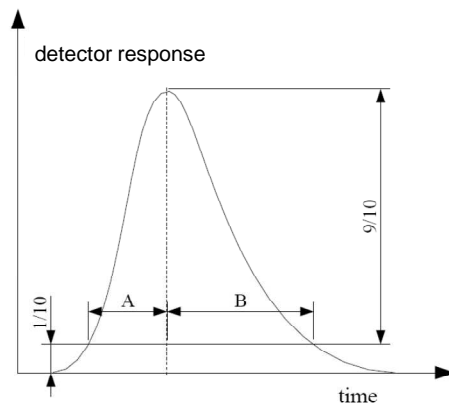
$$N = \frac{L}{H} = \frac{L^2}{\sigma^2} = 16 \frac{L^2}{w^2} \equiv 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

88

Constante	Définition	Commentaires
N (pic symétrique)	Efficacité $N = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2$ $N = 5,54 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2$	On appelle plateau théorique la portion de phase stationnaire dans laquelle un soluté est en équilibre de répartition entre la phase mobile et stationnaire (chaque plateau pouvant alors être assimilé à une ampoule à décanter)
H	Hauteur d'un plateau théorique $H = L / N$ (L : longueur de la colonne)	Un H faible est synonyme d'une meilleure efficacité
dp	Diamètre des particules	Généralement indiqué "granulométrie"
As	Asymétrie $As = B / A$	Asymétrie de pic à 10% de la hauteur

89

Asymétrie des pics



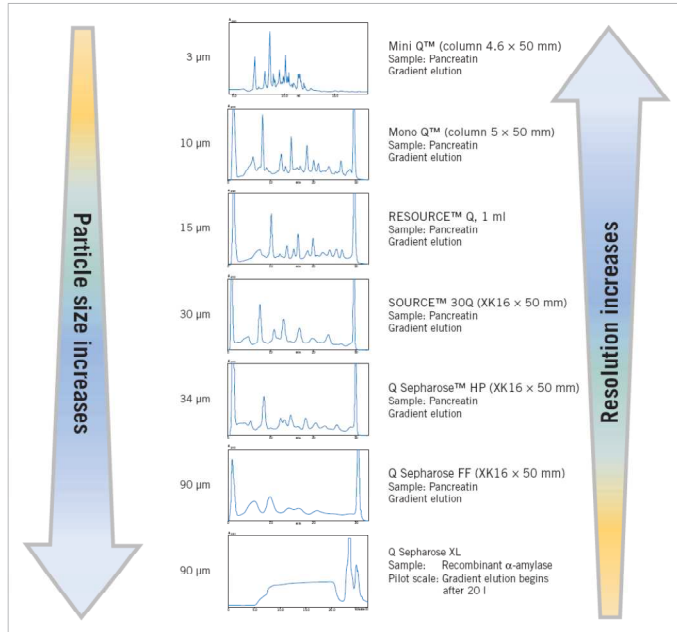
$$A_f = \frac{B_{(1/10 h)}}{A_{(1/10 h)}}$$

$$T_f = \frac{A + B}{2 A}$$

$$N = \frac{41.7}{\frac{B}{A} + 1.25} \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = \frac{41.7}{A_f + 1.25} \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

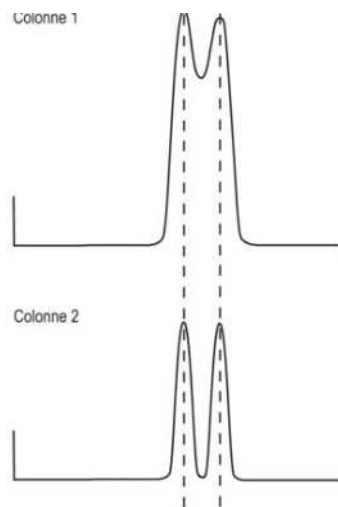
90

Influence de la taille des particules de phase stationnaire sur la résolution



91

Paramètres liés à la séparation

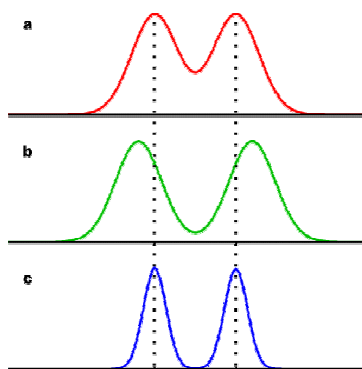


92

Constante	Définition	Commentaires
α	Sélectivité $\alpha = t'_{R2} / t'_{R1} = k_2 / k_1$ $\alpha \geq 1$	Précise les positions relatives de deux pics adjacents $\alpha \neq 1$: condition nécessaire mais non suffisante à une bonne résolution. → il faut en plus un retour à la ligne de base du premier pic avant que le second ne démarre.
R_s	Résolution $R_s = 2 \frac{t_R(B) - t_R(A)}{\omega_B + \omega_A}$	En HPLC analytique, on estime que la résolution minimale pour détecter deux pics de hauteur voisine doit être de 0.6 mais doit être de 1.5 pour un retour à la ligne de base. <ul style="list-style-type: none"> ▪ $R_s < 1$ mauvaise résolution ▪ $1 < R_s < 1.5$ résolution acceptable ▪ $R_s > 1.6$ trop bonne résolution, le temps d'analyse est rallongé

93

La résolution R_s



a) les pics se recouvrent;

b) la distance séparant les sommets des pics est plus grande mais les largeurs à la base sont les mêmes qu'en a);

c) la distance séparant les sommets des pics est égale à celle trouvée en a) mais les largeurs à la base sont plus petites qu'en b).

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{\bar{\omega}}$$

$$R_s = 2 (t_R^2 - t_R^1) / (\omega^2 + \omega^1)$$

$$R_s = 1.18 (t_R^2 - t_R^1) / (\omega_{1/2}^2 + \omega_{1/2}^1)$$

ω : largeur des pics à la base

$\omega_{1/2}$: largeur à mi-hauteur

94

Optimisation

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \cdot \sqrt{N_2^{\text{th}}} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \sqrt{N_2^{\text{eff}}}$$

I
II
III

(l'indice 2 se rapporte au composé le plus retenu)

Pour accroître R_s , on peut augmenter l'un de ces trois facteurs :

- I sélectivité,
- II rétention des solutés,
- III efficacité de la colonne.

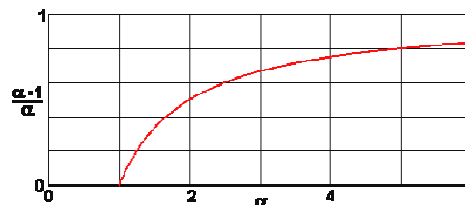
On optimisera d'abord I (paramètre thermodynamique déterminant) puis II et III (cinétique des échanges).

95

1. Variation de R_s avec α

La résolution augmente avec la sélectivité qui mesure les différences de distribution de deux substances entre les deux phases. La sélectivité étant fonction des coefficients de distribution des constituants du mélange à analyser, elle peut être modifiée :

- en changeant la nature et la composition de la phase mobile et en jouant sur le pH
- en changeant la nature de la phase stationnaire
- en modifiant la température



Si $\alpha = 1$, il n'y a pas de séparation quelle que soit la valeur de N .

Si α passe de 1,1 à 1,2, la valeur de R_s double.

Si $\alpha > 2$, la valeur de R_s ne change presque pas.

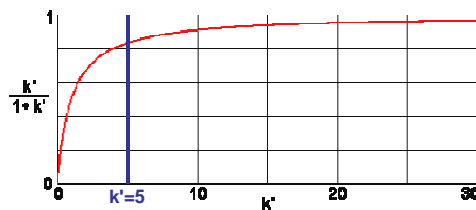
96

2. Variation de Rs avec k

Si k est nul ($t_R=t_0$), les deux solutés sortent simultanément de la colonne après écoulement du volume mort et la résolution est nulle.

La résolution augmente en même temps que k mais de moins en moins vite puisque $k/(1+k)$ tend rapidement vers 1 et le gain en résolution devient négligeable. À ce moment, le temps de rétention devient très long et le pic de plus en plus large.

On peut mettre en œuvre un gradient d'élution de façon à ramener les facteurs de capacité des solutés à des valeurs convenables (entre 2 et 5), ou encore modifier le taux de greffage, la surface spécifique du support ou la composition de la phase mobile.



97

3. Variation de Rs avec N

La valeur de R_s est proportionnelle à la racine carrée du nombre de plateaux théoriques.

Si la **longueur de la colonne** est multipliée par 2, R_s est multiplié par 1,4.

Cependant, N demeure un facteur important dans le processus de séparation des pics en chromatographie.

Il est possible de **réduire le diamètre des particules** ou **d'augmenter la vitesse de la phase mobile** pour augmenter l'efficacité.

98

Influence du débit Equation de Van Deemter- Knox

Equation de Van Deemter (en C.P.G) ou équation, pratiquement équivalente, de Knox (en chromatographie liquide) qui relie la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT, H) à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile u :

$$H(u) = A + \frac{B}{u} + C u$$

diffusion turbulente diffusion longitudinale résistance au transfert de masse

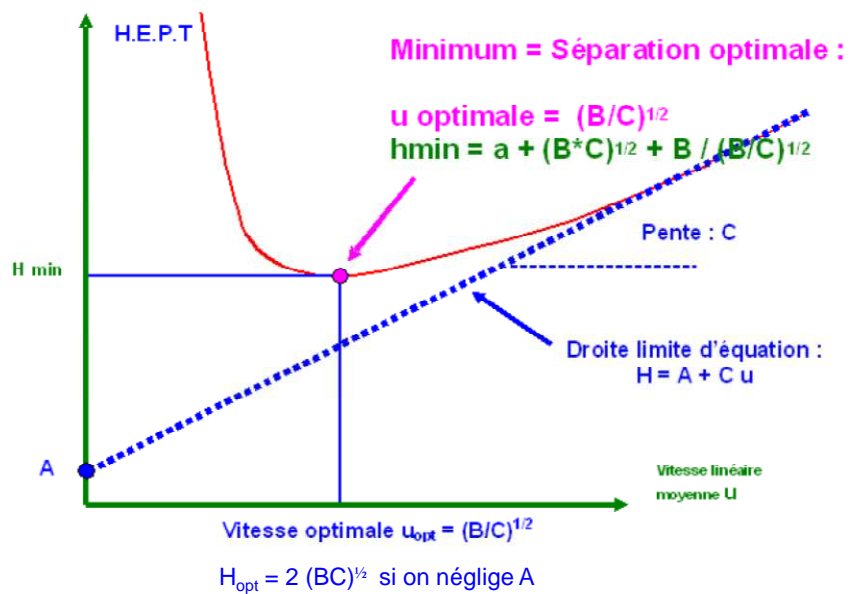
traduit la dispersion du soluté à cause de la diffusion du soluté dans la colonne

Attention aux unités utilisées, on exprime généralement :
u en cm/s et h en cm.

Dans ces hypothèses :

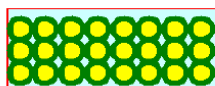
A sera en cm ; B sera en cm²/s et C sera en s

99



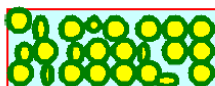
100

Signification physique des termes A, B et C



Bon remplissage bien régulier
Pas de chemins préférentiels :

A faible voire négligeable



Mauvais remplissage irrégulier
Création de chemins préférentiels :

A élevé = mauvaise séparation

A : terme de remplissage

Ce terme est en relation avec le profil d'écoulement de la phase mobile à travers la phase stationnaire.

→ la phase mobile circule plus ou moins facilement en fonction de la taille des particules, leur répartition, la régularité du remplissage ou du tassement de la colonne

→ si des chemins préférentiels sont créés, les équilibres entre la phase stationnaire et la phase mobile ne se font plus correctement ce qui diminue l'efficacité de la colonne (la phase mobile va circuler préférentiellement dans les zones "moins remplies") = diffusion turbulente d'Eddy

→ phénomène parfois négligeable en HPLC ou en CPG sur colonne capillaire alors $A=0$ (équation de Goley)

101

Signification physique des termes A, B et C

B : terme de diffusion dans la phase mobile

Ce terme est particulièrement important en CPG, il est une conséquence du second principe de la thermodynamique qui veut que **l'entropie (donc le désordre) augmente spontanément**.

→ la séparation chromatographique étant une "mise en ordre", elle s'oppose à cette augmentation de l'entropie donc du désordre

→ les molécules ont toujours une tendance naturelle à occuper au maximum l'espace qui leur est offert et à se mélanger à nouveau entre elles : particulièrement vrai si le débit de la phase mobile est trop faible \Rightarrow les molécules se mélangent alors plus vite qu'elles ne se séparent, donc diminution de l'efficacité pour les très faibles débits ($H \rightarrow \infty$ quand $u \rightarrow 0$)

C : terme de transfert de masse

Le terme C est dû à la résistance au transfert de masse du soluté entre les deux phases

→ il devient prépondérant lorsque le passage est trop rapide (débit de phase mobile trop élevé) pour que les équilibres puissent s'établir correctement.

→ les solutés sont alors entraînés hors équilibre et les séparations ne se font plus correctement

102