

## Les techniques Chromatographiques

### 1.1. Introduction

### 1.2. Définition

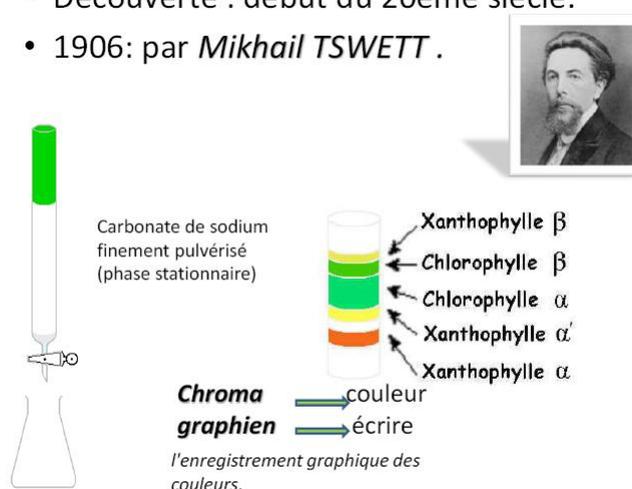
La chromatographie, **méthode d'analyse physico-chimique**, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par **entraînement au moyen d'une phase mobile** (liquide ou gaz) **le long d'une phase stationnaire** (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases.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

### 1.3. Historique

La chromatographie est une science très ancienne. Ainsi on trouve la première référence d'un processus chromatographique dans l'Ancien testament qui fait mention de propriétés adsorptives de certaine variété de bois pour adoucir de l'eau amère

Le terme de chromatographie fut employé pour la première fois par le botaniste russe **Michael Tswett** en 1903 pour décrire un procédé de séparation des pigments végétaux colorés (chlorophylle brute) par passage à travers une colonne remplie d'un adsorbant, le carbonate de calcium, et éluée avec l'éther de pétrole.

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



Il a donné à cette technique le nom chromatographie puisque chroma (Χρωμα) en grec, signifie couleur et graphein signifie écrire. De nos jours, ce terme **recouvre plus généralement toutes les techniques de séparation de substances en solution par passage au travers d'un matériau sélectif**. Cette technique fut quasi-abandonnée jusqu'en 1930, où **Edgar Lederer** a purifié par la méthode de Tswett la lutéine (Pigment présent dans le jaune d'œuf et dans certains végétaux) du jaune d'œuf.

En 1931, la publication de **Kuhn et Lederer** sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle apparue. En effet, c'est Kuhn qui, en 1938 reçut le Prix Nobel sur la chromatographie en couche mince

Vers 1940, **Martin et Syngé** développent la pratique et la théorie de la chromatographie, ils obtiennent le prix Nobel en 1952.

1952: Naissance officielle de la chromatographie phase gaz.

1955–1960 : Age d'or de la chromatographie en phase gazeuse.

Fin des années 60 : Naissance de la chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC.

La chromatographie est en pleine évolution actuellement surtout avec l'arrivée des colonnes capillaires en C.P.G et le couplage avec d'autres méthodes tel que la spectrométrie de masse. La multiplicité des procédés utilisés confère à la chromatographie une très grande souplesse. Les chromatographes actuelles sont pilotés par des logiciels informatiques.

Elle est employée à des fins préparatives pour séparer des quantités **notables** de substances, mais aussi et surtout dans un but analytique (**petite quantité**) qualitatif ou quantitatif grâce à la très grande sensibilité des moyens de détection et aux substances étalons.

## 2. Classification des méthodes chromatographiques

Il existe plusieurs variantes de techniques chromatographiques, classées de plusieurs manières différentes :

- 1- selon la nature des phases (mobile et stationnaire).
- 2- selon Le procédé opératoire.
- 3- selon le principe des phénomènes mis-en dans la séparation (type d'équilibre).

### 2.1. Classification selon la nature physique des phases

Selon la nature de la phase mobile on distingue:

- la chromatographie en phase liquide (CPL)
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- la chromatographie en phase supercritique (CPS)

Selon la nature de la phase stationnaire on distingue:

- la chromatographie liquide/solide (CLS)
- la chromatographie liquide/liquide (CLL)
- la chromatographie gaz/solide (CGS)
- la chromatographie gaz/liquide (CGL).

## 2.2. Classification d'après le procédé opératoire

Selon le support de la chromatographie on distingue :

**2.2. 1. La chromatographie sur colonne (CC)** : la phase stationnaire est contenue dans une colonne en verre ou en métal

**2.2. 1. La chromatographie planaire** : on distingue deux types

- **la chromatographie sur papier (CP)** : une surface plane de cellulose considérée comme support maintient par imbibition une phase stationnaire liquide.
- **2-la chromatographie sur couche mince (C.C.M)** la phase stationnaire est étalée sur une surface plane (chromatographie planaire) qui peut être en verre en feuille d'aluminium en une couche mince d'épaisseur uniforme de l'ordre de (0,2 à 2,5mm) de gel de silice, de cellulose, d'alumine, ou parfois de grains de résines échangeuses d'ions.

## 2.3. Classification selon le principe des phénomènes chromatographiques

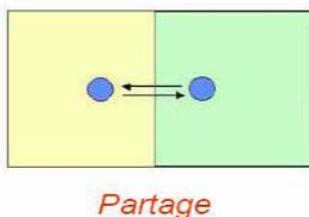
La **classification** des chromatographies peut se faire **en fonction des phénomènes ou bien des mécanismes de séparation**. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs, mais **l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale** au cours d'une séparation chromatographique.

### Chromatographies en phase liquide CPL

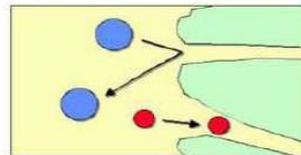
Dans ce cas, la phase mobile est un liquide. Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue :

#### Les chromatographies de partage

- ✚ **La chromatographie de partage** : C'est une chromatographie liquide-liquide. **La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte** (ex. : de l'eau sur la cellulose d'un papier). Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.



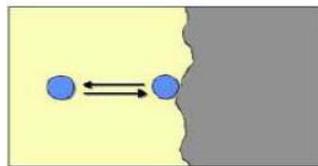
- ✚ **La chromatographie d'exclusion** : On l'appelle également chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel. **La phase stationnaire est un solide poreux** : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche, les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel.



*Exclusion*

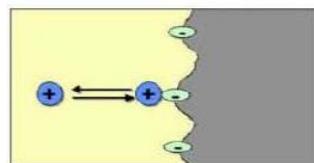
### Les chromatographies d'adsorption

- **La chromatographie d'adsorption en phase normale** : C'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire.



*Adsorption*

- **La chromatographie d'adsorption en phase inverse** : C'est une chromatographie liquide solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.
- **La chromatographie sur échangeurs d'ions** : La phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu.



*Échange d'ions*

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

## Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

La phase mobile est un gaz appelé gaz vecteur ou encore gaz porteur. On distingue dans ce cas :

- **La chromatographie gaz-liquide** : C'est une chromatographie de partage. La phase stationnaire est un liquide fixé par imbibition d'un support inerte.
- **La chromatographie gaz-solide** : C'est une chromatographie d'adsorption. La phase stationnaire est un solide adsorbant.

### En résumé

Les différents principes de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié un des facteurs suivants, afin de séparer des composés constituant un mélange :

Facteur	Technique chromatographique
Solubilité dans un solvant liquide	Chromatographie de partage
Taille et forme	Chromatographie d'exclusion
Polarité	Chromatographie d'adsorption et d'adsorption en phase inversée
Charge électrique	Chromatographie par échange d'ions
Groupement d'atomes formant des sites particuliers	Chromatographie d'affinité

## La chromatographie de partage

### 1. Principe

Cette chromatographie liquide-liquide est fondée sur la répartition différentielle de chacun des solutés entre deux liquides non miscibles, l'un constituant la phase stationnaire, l'autre la phase mobile. C'est une technique essentiellement qualitative. Cette technique est un peu comparable à une extraction liquide-liquide.

### 2. Théorie de la partition

La distribution d'un soluté A entre deux solvants non-miscibles, l'un aqueux (*Saq*), l'autre organique (*Sorg*), relève de l'équilibre.  $A_{Sorg} \rightleftharpoons A_{Saq}$ . La constante d'équilibre, qui est appelée « **coefficient de partage** » ou « **coefficient de distribution** », est égale à

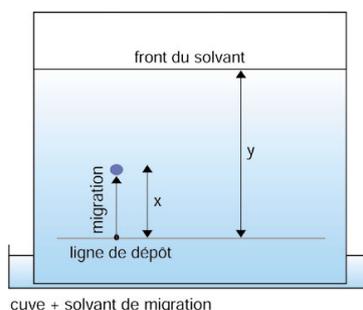
$K = [A_{Sorg}] / [A_{Saq}]$ . C'est l'**équation de Nernst** pour le partage d'une substance entre deux phases liquides non miscibles, avec  $[A_{Sorg}]$ : la concentration en soluté A dans la phase organique et  $[A_{Saq}]$ : la concentration en soluté A dans la phase aqueuse. En général, le soluté

est plus miscible dans le solvant organique que dans le solvant aqueux et  $K$  est donc supérieur à 1.

La transposition de cette partition d'un composé entre deux phases liquides dans un système chromatographique est rendue possible par la **fixation de l'un des solvants sur un support inerte**, l'autre solvant constituant la phase mobile. Un soluté très soluble dans la phase fixée migrera lentement, la force de rétention prédominant sur la force d'entraînement. A l'inverse, un soluté soluble dans la phase mobile migrera rapidement.

### 3. Rapport frontal

On appelle rapport frontal,  $R_F$  (ou « référence front », « coefficient de migration »), le **rapport Distance parcourue par le soluté / Distance parcourue par le solvant**. Le schéma de la figure montre comment calculer le  $R_F$  dans le cas d'une chromatographie liquide ascendante.



**Figure: Schéma montrant comment déterminer le rapport frontal d'une substance.**

Un soluté très soluble dans la phase fixe aura un  $R_F$  faible, alors qu'un soluté très soluble dans la phase mobile aura un  $R_F$  élevé et proche de 1.

### 4. Chromatographie bidimensionnelle

Dans le cas où le mélange contient des solutés de mobilités voisines, on peut augmenter le pouvoir séparateur en réalisant une **chromatographie bidimensionnelle** : sur le même support, on réalise une première chromatographie à l'aide d'un système de solvants, puis une deuxième à l'aide d'un second système de solvants, **dans une direction perpendiculaire à la première** (figure).

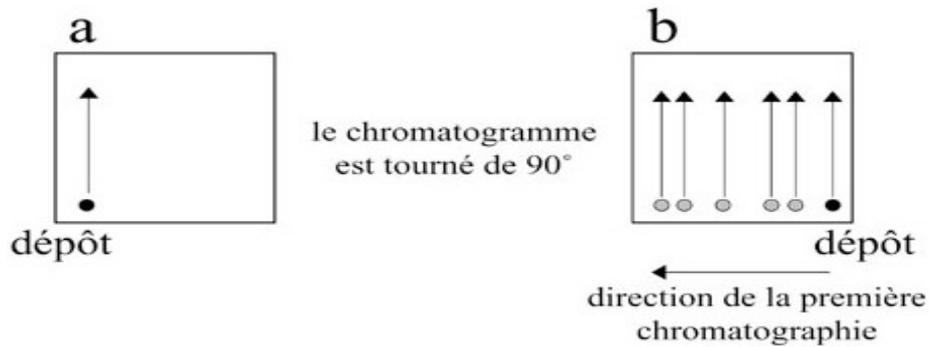


Figure: Chromatographie liquide-liquide bidimensionnelle

## 5. Solvants

Les deux solvants sont caractérisés par leur **différence de polarité** et leur **non miscibilité**. Généralement, le solvant fixe est polaire et très souvent, ce sera l'eau. Le solvant mobile sera quant à lui non polaire et constitué d'un mélange choisi selon les nécessités de la séparation.

## La chromatographie d'exclusion

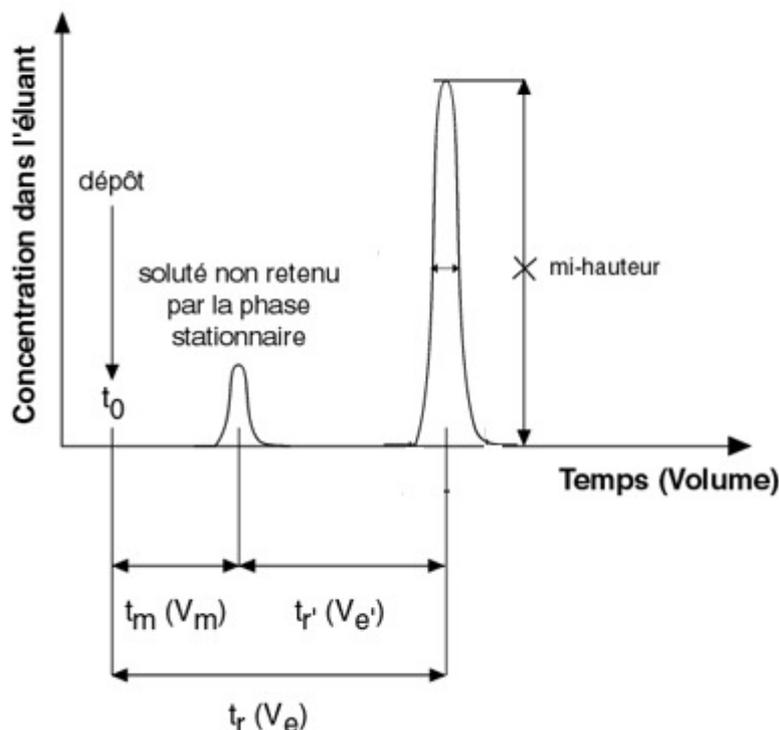
### 1. Terminologie et grandeurs de rétention

- **Chromatogramme**

Un chromatogramme 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). Ce graphique est utilisé à la fois en analyse qualitative et quantitative.

**Analyse qualitative** : permet l'identification des composés par la position du pic

**Analyse quantitative** : évaluer la concentration ou la masse d'un composé en utilisant l'aire des pics



**Figure:** Diagramme montrant les caractéristiques d'un chromatogramme

- **Elution**

L'éluion 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.

- **Le temps mort ( $t_m$ )**

Le temps mot  **$t_m$**  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).

- **Le temps de rétention ( $t_r$ )**

C'est le temps que met le soluté à sortir de la colonne c'est à dire le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué (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). Il est noté  **$t_r$**  (en minutes).

Le temps de rétention est caractéristique d'une espèce pour des conditions d'analyse données et peuvent servir à l'analyse qualitative.

- **Le temps de rétention réduit ( $t_r'$ )**

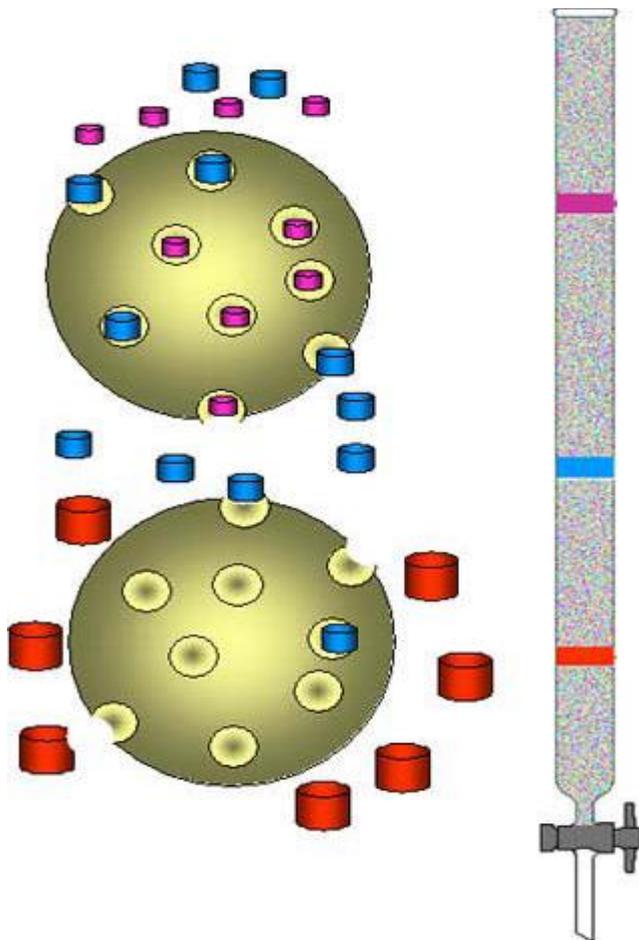
Le temps de rétention réduit ( $t_r'$ ) représente le temps passé par le soluté dans la phase stationnaire.  **$t_r' = t_r - t_m$** .

- **Le volume de rétention  $V_r$  ou volume d'élution  $V_e$ .**

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 constant,  $V_r = tr.D$ .

## 2. Le Principe de la chromatographie d'exclusion

Cette technique permet la **séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme**. On utilise pour cela des **granules de gel poreux**. Les **grosses molécules** (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont **exclues** et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort ( $V_m$ ). Les **petites et moyennes molécules** sont éluées plus tardivement, car **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'élution et le logarithme de la masse moléculaire. L'ensemble de ces considérations est illustré schématiquement dans la figure.



**Figure. : Schéma illustrant le principe de la chromatographie d'exclusion:**

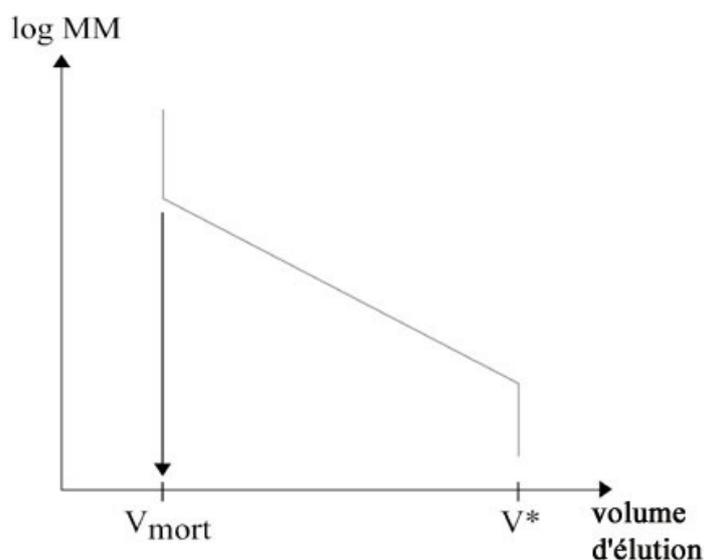
Les plus petites molécules peuvent pénétrer dans de nombreux pores, se répartissant entre le gel et la phase mobile, ce qui rend leur trajet plus lent à parcourir et les fait éluer en dernier. Les molécules de taille moyenne peuvent pénétrer seulement dans quelques pores, la répartition entre le gel et la phase mobile est plus rapide que pour les petites molécules, le trajet parcouru est moins long et elles sont éluées plus rapidement. Finalement, les grosses molécules ne peuvent pénétrer dans les pores du gel (elles sont exclues), il n'y a donc pas de répartition entre la phase mobile et le gel, leur trajet est donc réduit au minimum et elles sont éluées en premier.

### 3. Types de gels (les phases stationnaires)

- **Gels hydratés** (les plus utilisés) : le Séphadex<sup>TM</sup> (G10 à G200) qui sont des polysides bactériens de type dextran et le Sépharose <sup>TM</sup> (agarose). Le gain d'eau correspond au nombre de grammes d'eau fixés par gramme de substance sèche.
- **Gels permanents** : Ce sont des copolymères organiques ou bien des minéraux (silice). Ici, des effets d'adsorption s'ajoutent au tamisage moléculaire.

### 4. Représentation des résultats

- Soit on porte le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'élution, comme indiqué dans la figure ci-dessous :  $\log MM = f(V_e)$ .
- Soit on porte le logarithme de la masse moléculaire en fonction du KAV, le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel :  $\log MM = f(KAV)$ , avec  $KAV = (V_e - V_m) / (V_t - V_m)$  où  $V_t$  est le volume total (mesuré en remplissant la colonne d'eau) et  $V_m$  est le volume mort (déterminé en mesurant le  $V_e$  d'une substance que l'on sait totalement exclue).



**Figure: Graphique du log de la masse moléculaire en fonction du volume élué**

Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc toutes éluées les premières, au niveau du volume mort ( $V_m$  ou  $V_0$ ). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est gênée. Une molécule totalement incluse sera éluee avec un volume  $V^* =$

$V_m + V_i$ , où  $V_i$  est le volume d'eau interne aux granules de gel. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

### 5. Théorie de la chromatographie d'exclusion

On considère une colonne de volume totale  $V_t$  remplie d'un gel solvaté :  $V_t = V_0 + V_i + V_g$ , où  $V_0$  est le volume mort, c'est-à-dire le volume d'eau externe aux granules,  $V_i$  est le volume d'eau interne aux granules et  $V_g$  est le volume du gel.

Un soluté est distribué entre l'eau interne et l'eau externe selon un coefficient de distribution (de partage) :  $K$ .

- Si  $K = 0$ , le soluté est totalement exclus.
- Si  $0 < K < 1$ , le soluté est partiellement inclus. Le taux d'inclusion augmente avec  $K$ .
- Si  $K = 1$ , le soluté est totalement inclus dans le gel.
- Si  $K > 1$ , le soluté est non seulement inclus, mais aussi adsorbé par le gel.

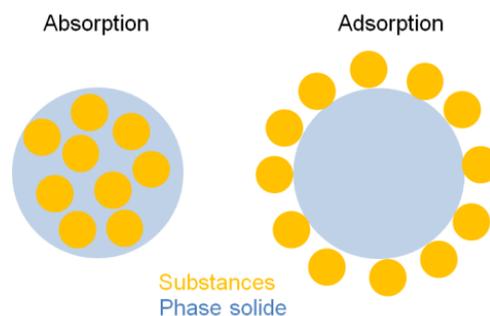
## Les chromatographies d'adsorptions

### 1. La chromatographie d'adsorption en phase normale

#### 1.1.Principe

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

**L'adsorption est un phénomène de surface** par lequel des molécules se fixent sur la surface d'un adsorbant, selon divers processus plus ou moins intenses. Le phénomène inverse, par lequel les molécules adsorbées sur une surface s'en détachent se nomme la désorption.



### 1.2. Les adsorbants (les phases stationnaires)

Ce sont des **solides très divisés** (l'adsorption est un phénomène de surface), ainsi, On peut distinguer :

- Les adsorbants à faible capacité d'adsorption, comme le talc ou le carbonate de sodium.
- Les adsorbants forts, comme le gel de silice, l'alumine ou le charbon actif. Certains adsorbants présentent une forte polarité électrique, comme le gel de silice ou l'alumine, alors que d'autres, comme le charbon actif ou les phases inverses (dont nous parlerons plus en détail ultérieurement) ont une faible polarité.

### 1.3. Les solvants

Pour un système chromatographique donné (caractérisé par une phase stationnaire, une température, une pression et un soluté), **le pouvoir éluant dépend de la polarité du solvant**. Prenons, par exemple, une phase stationnaire constituée d'un adsorbant polaire (le gel de silice), d'un soluté polaire adsorbé et d'un solvant polaire (la propanone). Le solvant polaire possède un pouvoir éluant élevé, fortement adsorbé, il déplace le soluté. En revanche, un solvant apolaire comme l'éther de pétrole possèdera un mauvais pouvoir éluant, mais entraînera un soluté apolaire. Le tableau suivant reprend quelques **solvants classés dans l'ordre croissant de polarité**.

	Éther de pétrole		Dichlorométhane		Propan-1-ol
	Cyclohexane		Éther diéthylique		Éthanol
	Tétrachlorométhane		Trichlorométhane		Méthanol
	Trichloroéthène		Éthanoate d'éthyle		Eau
	Toluène		Pyridine		Acide éthanoïque
	Benzène		Propanone		

### 1.3. Technologie

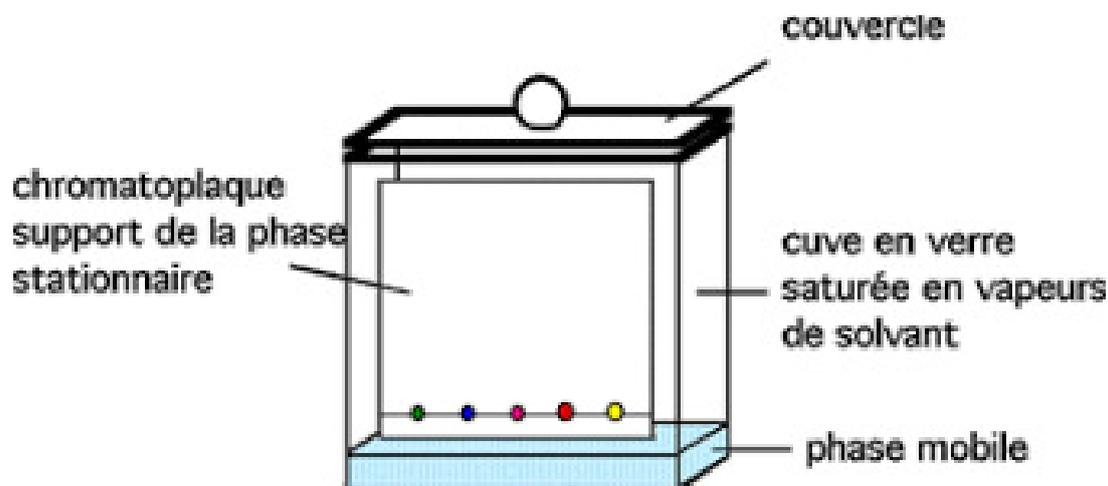
La chromatographie d'adsorption est appliquée selon différentes techniques :

- **Sur colonne** : ouverte à pression ambiante, en flash chromatographie, à moyenne pression, en CLHP (chromatographie liquide haute performance ou haute pression).
- **Sur papier** : en chromatographie ascendante ou radiale ; dans cette technique, le papier joue le rôle de phase fixe.
- **Sur couche mince** : le gel adsorbant (cellulose, silice) est coulé sur une plaque (verre, aluminium, plastique), mélangé à un liant (plâtre).

Exemple de la chromatographie d'adsorption :

### 1.3. La chromatographie sur couche mince (CCM)

#### 1.3.1. Définition et appareillage:



**Figure :** Schéma d'une chromatographie sur couche mince (CCM).

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

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

- la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- la phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.
- l'échantillon : environ un microlitre ( $\mu\text{l}$ ) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- l'éluant : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

#### 1.3.2. Principe de la technique.

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement **par capillarité**. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à **sa propre vitesse** derrière le front du solvant. Cette

vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

### 1.3.3. Applications de la CCM.

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.

De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

La chromatographie sur couche mince est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne.

### 1.3.4. Adsorbants et plaques chromatographiques.

Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose.

Les plaques vous seront fournies prêtes à l'emploi.

### 1.3.5. Choix de l'éluant.

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants.

Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est trop polaire; celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment.

Une méthode simple pour trouver l'éluant approprié consiste à préparer des solutions de l'échantillon dans différents solvants, en concentration d'environ 2 à 5% en volume. A l'aide d'une micropipette, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée d'environ 1 cm. Le meilleur éluant est celui qui, lorsqu'il a terminé sa migration, a entraîné le soluté à une distance d'environ la moitié de celle qu'il a parcourue.

### 1.3.6. Dépôt de l'échantillon.

L'échantillon est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : on emploie fréquemment le méthanol, le trichlorométhane (chloroforme),

la propanone ou le dichlorométhane. La solution est déposée en un point de la plaque situé à environ 1 cm de la partie inférieure.

Il est important que le diamètre de la tache produite au moment du dépôt soit faible; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3 mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large.

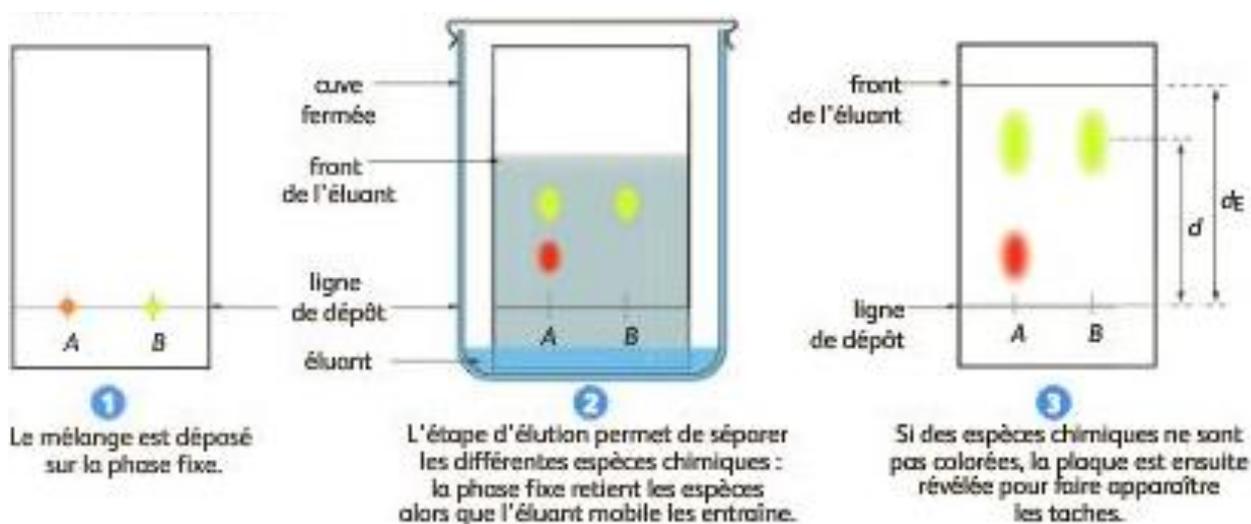
L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité de la pipette sur la couche d'adsorbant en prenant soin de ne pas le détériorer.

### 1.3.7. Développement de la plaque.

Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque. Dans les analyses usuelles de laboratoire, le principal type de développement est la chromatographie ascendante : la plaque est placée en position verticale dans une cuve et le solvant qui en recouvre le fond monte par capillarité.

Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve; on place souvent du papier filtre contre les parois de la cuve pour saturer plus rapidement la cuve en vapeurs d'éluant et éviter les effets de bords. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée.

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



### 1.3.8. Révélation.

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes (valable également pour la chromatographie sur papier):

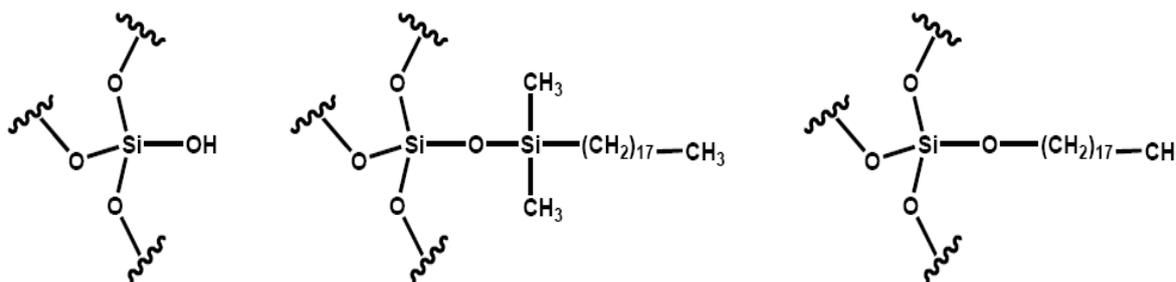
- 1-directement si les substances sont colorées
- 2-à l'aide de révélateurs si elles sont incolores afin de les transformer en taches colorées; les produits sont souvent décelés par leurs réactions fonctionnelles classiques: les acides aminés par la ninhydrine qui donne avec la plupart une couleur bleu-violet, les acides organiques par des indicateurs colorés, les sucres par le réactif de Molisch qui utilise le pouvoir réducteur des sucres. Quelques réactifs comme l'iode ou le permanganate donnent des colorations non spécifiques avec la plupart des composés organiques.
- toutes les substances ayant une absorption dans la région au-dessus de 230 nm sont étudiées sur des supports additionnés de corps fluorescents par irradiation de lumière UV à ondes courtes ( $\lambda_{\max} < 254 \text{ nm}$ ). L'emploi de couches non additionnées de produits fluorescents permet aussi la mise en évidence de beaucoup de substances dans l'UV à ondes courtes ( $\lambda_{\max} < 254 \text{ nm}$ ) ou à ondes longues ( $\lambda_{\max} > 366 \text{ nm}$ ) par suite de la fluorescence propre des composés.

Dans tous les cas, il faut noter les positions des taches colorées juste à la fin de la chromatographie en les cerclant car certains produits disparaissent avec le temps.

### La chromatographie d'adsorption en phase inversée

#### 1. Principe

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



**Figure. : Phase normale et phase inverse** : De gauche à droite sont représentées : Une silice non greffée (phase normale), une silice greffée organosilanée de type C18 (phase inverse) et finalement, une silice greffée par une chaîne aliphatique de type C18 également (phase inverse).

## Chromatographie par échange d'ions

### 1.1. Introduction

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.

### 1.2. Principe

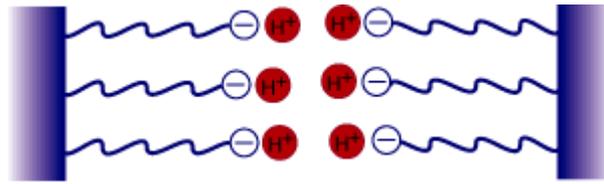
Un échangeur d'ions est une substance, généralement poreuse, sur laquelle est greffé (fixé), par liaison covalente, un groupement chimique ionisable. Cette partie chargée peut interagir fortement avec des ions présents dans le mélange chromatographié. Ainsi des molécules chargées peuvent s'adsorber réversiblement sur l'échangeur d'ions, et être ensuite désorbées de la résine, en modifiant la composition ionique du solvant.



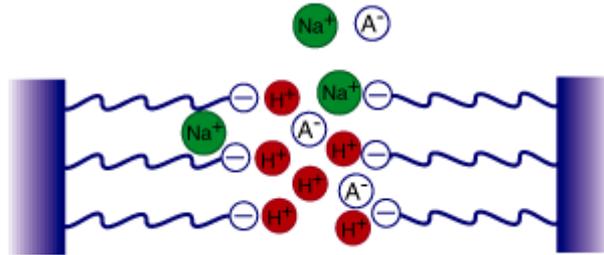
On peut résumer le processus comme suit : dépôt des substances sur la colonne choisie en fonction des charges des molécules et de la résine (A), élution des molécules généralement en augmentant de façon graduelle la force ionique et enfin régénération de l'échangeur d'ions (par lavage avec une solution de pH permettant de remettre les charges dans leur valeur initiale).

Exemple :

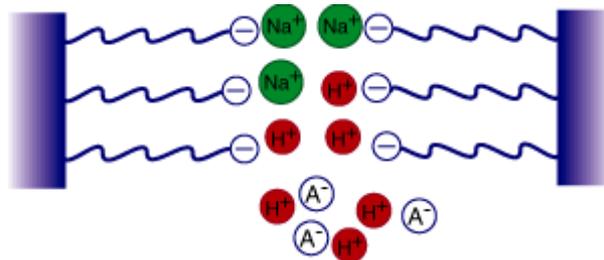
Une résine échangeuse de cations est un polymère sur lequel sont greffées des chaînes latérales avec des groupements anioniques. Initialement, les contre-ions sont des protons H<sup>+</sup>.



Quand on dépose la solution d'un sel  $\text{Na}^+\text{A}^-$  sur la colonne, les cations se distribuent entre la phase stationnaire (résine) et la phase mobile (solution) selon leur affinité aux anions sur la résine et dans la solution. Les anions de la solution ne sont pas retenus par la colonne.

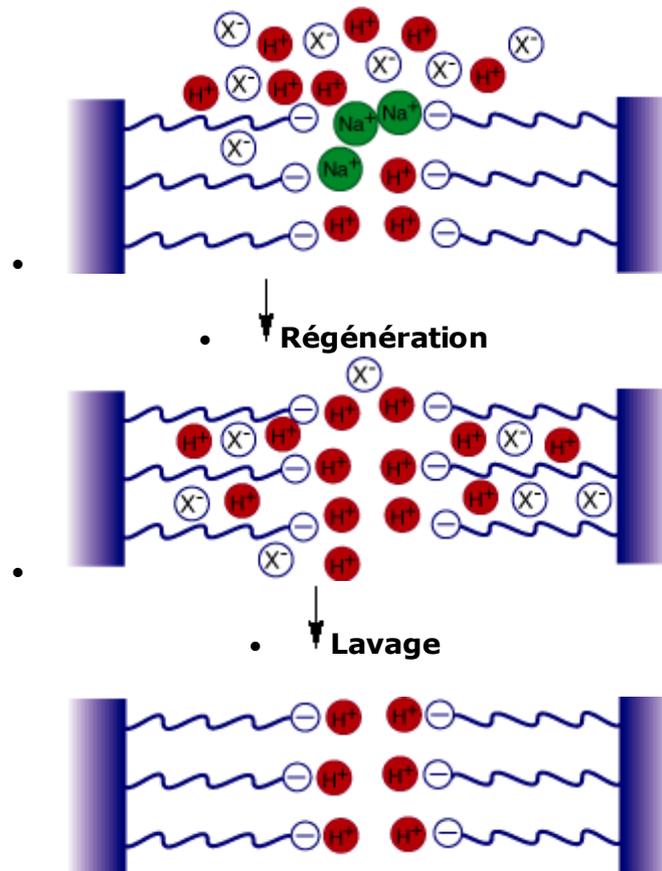


En descendant dans la colonne, la solution s'appauvrit en  $\text{Na}^+$  et s'enrichit en  $\text{H}^+$ . A la fin, tous les  $\text{Na}^+$  ont été échangés et on récupère une solution de  $\text{H}^+\text{A}^-$ .



### Précautions d'emploi

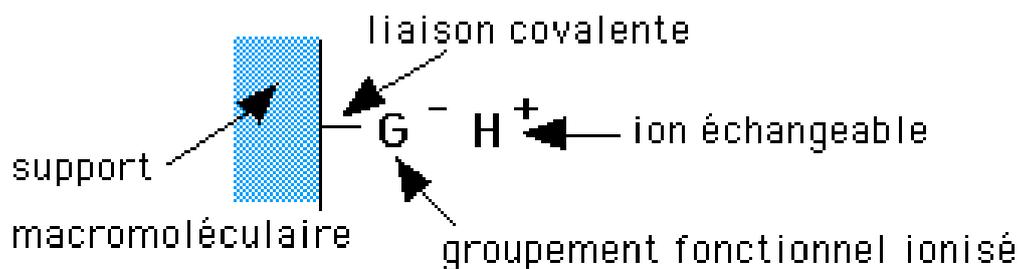
- La résine gonfle dans l'eau. Il faut la stocker sous l'eau.
- La colonne ne doit jamais devenir sèche. Quand la solution déposée est entièrement absorbée, il faut remettre de l'eau (de l'éluant) pour couvrir la résine.
- **Régénération de la colonne**
- Pour régénérer la colonne pour une utilisation ultérieure, il faut la laver avec une solution très acide, puis avec de l'eau pour enlever l'excès d'acide.



### 1.3. La phase stationnaire

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

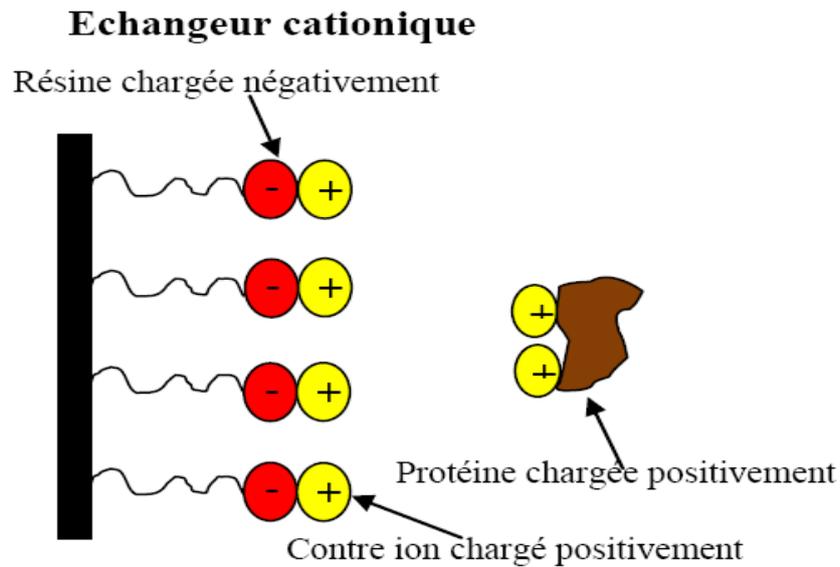
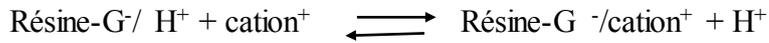
L'échangeur d'ions comporte deux parties : Les groupements fonctionnels qui lui confèrent ses propriétés et la matrice (support fixe) sur laquelle ces derniers sont greffés.



Les groupements fonctionnels sont fixés par des liaisons covalentes sur la matrice; ils sont de deux types :

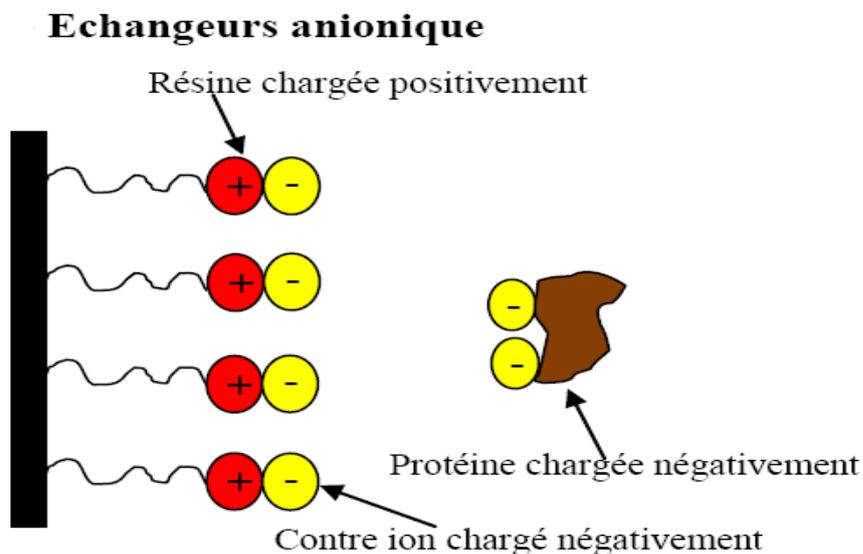
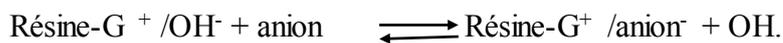
1. les échangeurs de cations portent des groupements chargés négativement (-)

Résine anionique (échangeur de cations) : l'échange se fait suivant l'équation



2. les échangeurs d'anions portent des groupements chargés positivement (+)

Résine cationique (échangeur d'anions): l'échange se fait suivant l'équation



### 1.3.1. Les supports

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

### 1.4. La phase mobile

Les éluants servant de phase mobile sont des solutions aqueuses chargées d'ions salins ou organiques et si nécessaire, d'un peu de méthanol ou d'acétone pour faciliter la dissolution de certains échantillons. Le pH est ajusté en fonction de la séparation à réaliser.

### 1.4. 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.

## La chromatographie d'affinité

### 1.1. Introduction

Ce mode de chromatographie connaît depuis 1970 un développement sans précédent et est appelé à prendre une place encore plus grande avec l'essor des biotechnologies. 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.

### 1.2. Principe

Dans la chromatographie d'affinité, la séparation des molécules va se faire selon leur capacité à se lier à un ligand spécifique fixé sur une résine. Toute la subtilité de la technique consiste à choisir judicieusement le ligand qui est utilisé. Un exemple classique est l'utilisation d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement la molécule à purifier. Lors du dépôt du mélange contenant la molécule à purifier, seules les molécules possédant de l'affinité pour le ligand attaché à la résine vont se lier (dans l'idéal, une seule espèce moléculaire). Il faut, bien sûr, que la résine porteuse soit la plus neutre possible, pour éviter la fixation non spécifique d'autres espèces moléculaires. Après avoir éliminé le « non-fixé » en lavant la résine avec le tampon de fixation, la molécule d'intérêt peut être éluée, par exemple en utilisant un tampon d'éluion de haute force ionique, de pH différent, ou comportant une forte concentration d'une

molécule possédant également de l'affinité pour le ligand (libération de la molécule d'intérêt par compétition pour les sites de fixation). Voir la figure 1.

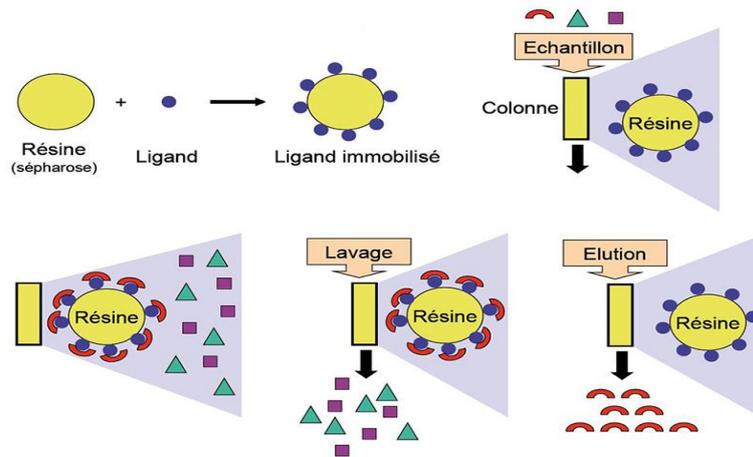


Figure 1 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie d'affinité

### Etapes d'une chromatographie d'affinité

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

- **Etape de fixation :**

Un ligand biospécifique est fixé par liaison covalente à une matrice (dextrane, agarose) sans perdre son affinité pour le produit à analyser. Le mélange de molécules contenant le composé à purifier est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.

- **Etape de purification (lavage) :**

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

- **Etape d'éluion :**

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

1/ Tampons de pH différent de celui ayant permis la charge donc changement de l'état d'ionisation de la molécule donc on a désorption

2/Tampon de pH ionique différent de celle ayant permis la charge donc changement de conformation de la molécule.

3/Compétition avec un ligand libre (libération de la molécule d'intérêt par compétition pour les sites de fixation).

### 1.4. Avantage et inconvénient de la méthode

L'avantage de cette technique est sa très grande sélectivité potentielle, à tel point que son utilisation peut parfois permettre une purification suffisante en une seule étape, ce qui est rarement le cas avec les autres types de chromatographie.

L'inconvénient de cette technique provient de la nécessité de posséder un ligand adapté, lui-même suffisamment purifié. Il faut donc, dans une première étape, trouver un ligand suffisamment spécifique (ce qui détermine la sélectivité de la purification) et qui possède pour la molécule d'intérêt une affinité ni trop faible (il faut une interaction suffisante pour que cette molécule soit retenue), ni trop forte (car il faut pouvoir la décrocher).

Une fois la « perle rare » trouvée, il faut, dans une seconde étape, purifier ce ligand avant de le coupler à une résine porteuse. La purification du ligand est nécessaire car l'utilisation d'un mélange entraînerait une forte probabilité de fixer des molécules autres que celle d'intérêt.

La chromatographie d'affinité est donc très puissante par sa sélectivité importante, mais souvent plus lourde et plus onéreuse à mettre en œuvre que d'autres types de chromatographie. Par ailleurs, elle n'est pas adaptée à la purification de grandes quantités de molécules. En effet, la capacité est fonction du nombre de sites disponibles sur la résine : lorsque ceux-ci sont saturés, les molécules en surnombre ne seront pas purifiées.

## Chromatographie liquide à haute performance CLHP

### 1.1. Introduction

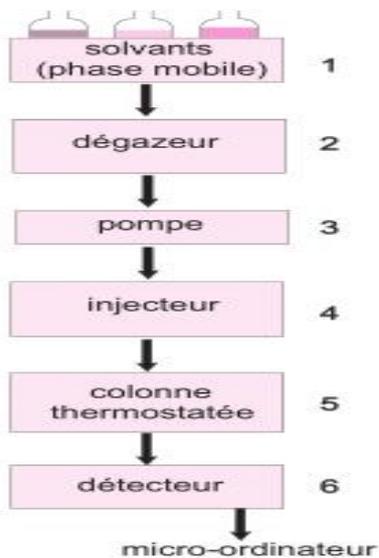
La chromatographie liquide haute performance, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase.....)

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

### 1.2. Appareillage

Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance on retrouvera toujours les éléments de base suivants (Fig.1) : 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 éléments s sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm).



AnalyticalToxicology.com

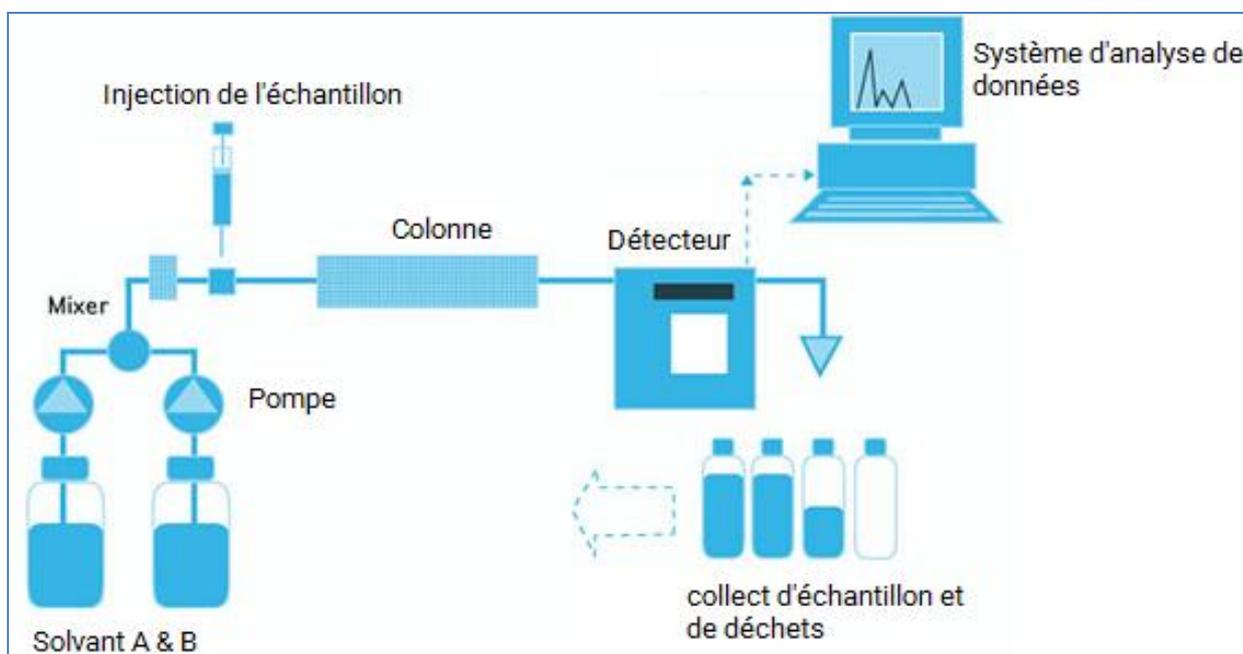


Figure.1: Les composants d'un chromatographe liquide à haute performance.

### 1.2.1 Réservoir de solvant (éluant) :

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.

### 1.2.2. 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.

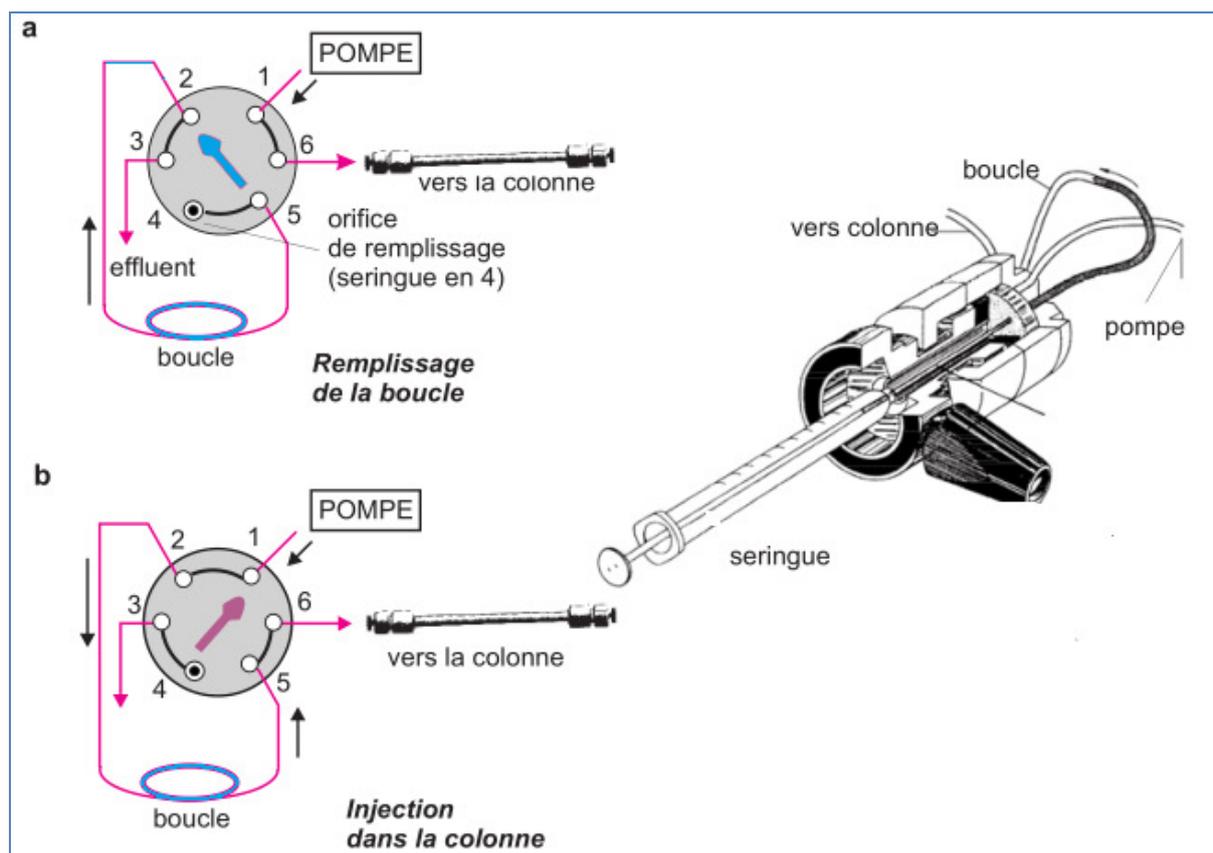
### 1.2.3. Pompe :

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

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants. Les pompes actuelles ont des pressions maximales de refoulement voisines de 400 bar et un débit variable de quelques  $\mu\text{l}$  à plusieurs ml/min.

### 1.2.4. Vanne d'injection :

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.



**Figure 2.** 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). Vanne modèle 7125. Les vannes sont motorisables.

### 1.2.5. Colonne :

Les colonnes CLHP sont généralement courtes et droites en acier inoxydable se caractérisent par leur géométrie (diamètre intérieur de 4 mm et une longueur de 5 à 30 cm) et par la nature des phases qu'elles contiennent (Figure 3). Elles doivent être capables de résister aux fortes pressions. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques mL/min. Ces colonnes ont l'avantage de la rapidité de l'analyse, consomment moins de solvant et conduisent à une meilleure résolution de l'analyse. 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.

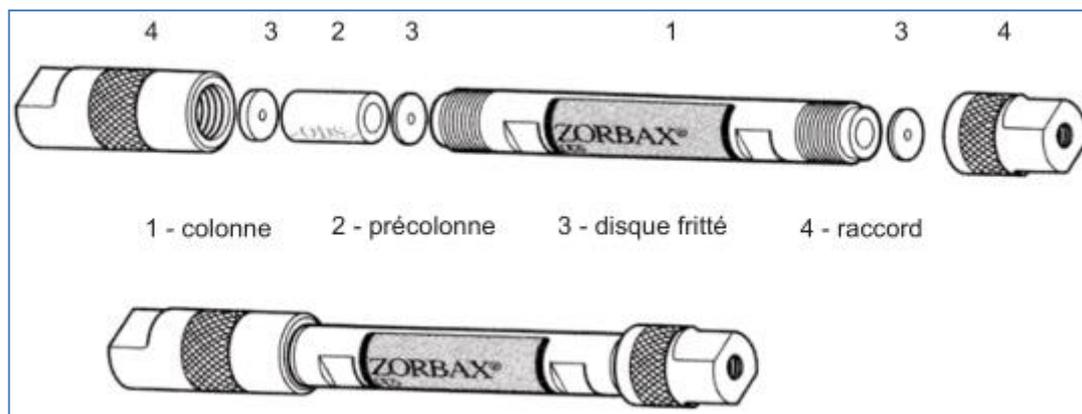


Figure 3. Colonne standard et précolonne de CLHP.

**1.2.6. Les thermostats des colonnes :** La plupart des appareils commerciaux récents sont équipés de dispositifs de régulations de la température ; qui la contrôle de la température ambiante jusqu'à 150°C. On obtient souvent de meilleurs chromatogrammes en maintenant la température constante à quelques dixièmes de degrés Celsius.

### 1.2.7. Détecteurs

#### a /Photomètre UV-Visible :

Le détecteur UV-Visible mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que:

- Le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil.
- La phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

Ce détecteur détecte seulement les changements dans le soluté donc on peut l'utiliser dans l'analyse par gradient d'élution. Le détecteur est facile à opérer et ne détériore pas l'échantillon.

. Ce type de détecteur permet de sélectionner la longueur d'onde optimale de détecteur pour chaque soluté. Il y'a plusieurs types de détecteurs :

- Détecteur à  $\lambda$  fixe : vapeur de Hg (254 nm)
- Détecteur à  $\lambda$  variable Détecteur à
- Détecteur à barrettes de diodes (DAD) : la cellule de mesure est éclairée par une source polychromatique ; gamme de 190 à 800 nm permettant l'enregistrement tridimensionnel absorbance-temps-longueurs d'onde. Ce type de détecteur permet de sélectionner la longueur d'onde optimale de détecteur pour chaque soluté.

### **b/Réfractomètre différentiel :**

Il mesure la variation de l'indice de réfraction entre la phase mobile contenant le soluté et la phase mobile pure correspondant à la référence. La sensibilité optimale correspond à un maximum d'écart entre les indices de réfraction des composants de l'échantillon et de la phase mobile. Un composant dont l'indice est voisin de celui de la phase mobile est alors pratiquement indétectable. Son utilisation est moins répandue que celle du détecteur à UV à cause de sa plus faible sensibilité.

### **c/Détecteur fluorimétrique :**

Il mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. L'émission de lumière est mesurée à angle droit du faisceau d'excitation. Ce procédé sert pour les composés fluorescents ou les dérivés fluorescents de certains composés. Ce mode de détection est plus sélectif et plus sensible de tous les détecteurs optiques à condition que les composés présentent une fluorescence, qu'elle soit naturelle ou obtenue par formation de dérivés

### **d/ Détecteur électrochimique :**

Cette méthode de détection ne s'adresse qu'à la détection de molécule douée de propriétés oxydoréduction.

### **e/ Détecteur par spectroscopie de masse :**

La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS) est une technique d'analyse qui permet d'identifier clairement un composé grâce à son rapport masse molaire/charge ( $m/z$ ).

## **1.3. Phase stationnaire**

### **1.3.1. 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 apolaire qui sortent en tête. 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.

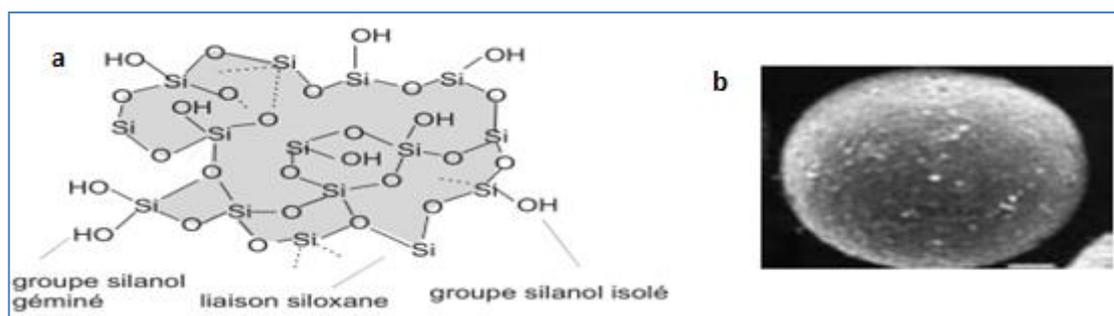


Figure 4 : a) représentation du réseau, correspondant à un maillage tridimensionnel, d'un gel de silice porteur de groupements silanols. b) image d'une particule sphérique de gel de silice issus d'un assemblage compact de sphères submicroniques.

### 13.2. 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). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H<sub>2</sub>O). 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.

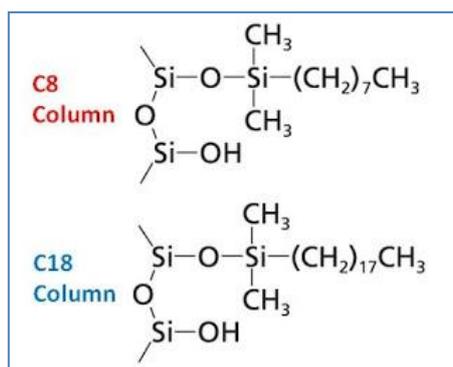


Figure 5. Gel de silice greffée

### 1.4. Phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;
- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse.

En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention  $k$  des composés. Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, 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. On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution). On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile. En plus du pouvoir d'élution le choix de la phase mobile dépend aussi d'un certain nombre de facteurs dont les plus importants sont la solubilité de l'échantillon, la compatibilité de la phase mobile avec le détecteur et la viscosité de la phase mobile. Aucun de ces paramètres n'est une variable indépendante et le meilleur solvant est donc celui qui donne une réponse optimale à toutes ces conditions.

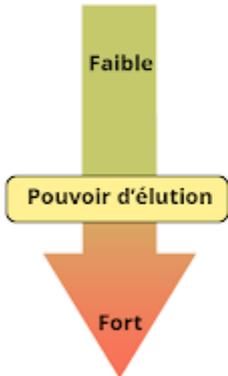
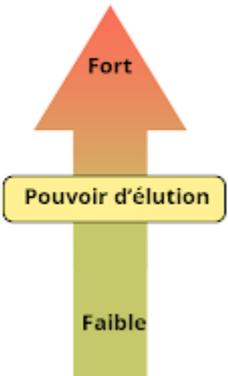
Phase stationnaire polaire	Solvants classés par polarité croissante	Phase stationnaire apolaire
	Hexane Toluène Trichloroéthane Dichlorométhane Éther Acétate d'éthyle Acétonitrile Méthanol Eau	

Figure 6 : Force d'élution des solvants utilisés comme phases mobiles.

### Domaines d'application de HPLC

Les domaines d'application de HPLC sont nombreux mais elle est particulièrement employée en :

- Biochimie pour l'analyse des constituants d'un composé.
- Séparation et identification des acides aminés, acides nucléiques, protéines, hydrocarbures, pesticides, glucides, antibiotiques, stéroïdes et d'innombrables autres substances organiques et inorganiques.

- Quantification des analytes présents
- Détermination de la pureté de l'échantillon
- Assurance qualité et contrôle.

## Chromatographie en phase gazeuse

### 1. Introduction

Le concept de chromatographie en phase gazeuse a été introduit par Archer Martin et Richard Synge (Anglais) en 1941. C'est une méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition.

Elle constitue la méthode la plus puissante et la plus fine pour séparer, identifier et quantifier les corps gazeux ou volatilisables. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges éventuellement très complexes dont les constituants peuvent différer de façon considérable par leur nature et leur volatilité. Elle constitue la méthode la plus puissante et la plus fine pour séparer, identifier et quantifier les corps gazeux ou volatilisables. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges éventuellement très complexes dont les constituants peuvent différer de façon considérable par leur nature et leur volatilité.

On distingue selon la phase stationnaire:

- **Chromatographie de partage** : La chromatographie gaz-liquide : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imbibition. Le soluté se partage entre le gaz vecteur et le liquide stationnaire. Plus un soluté est soluble dans la phase stationnaire, plus le  $R_F$  (distance parcourue par le soluté / distance parcourue par la phase mobile) est petit et le temps d'émergence élevé.
- **Chromatographie d'adsorption** : La chromatographie gaz-solide : la phase stationnaire est un solide poreux. Plus l'adsorption d'un soluté sur la phase stationnaire est élevée, plus le  $R_F$  est faible et le temps d'émergence élevé.

Dans les deux cas, le gaz vecteur est le gaz qui véhicule les solutés ; la phase mobile est constituée du gaz vecteur et des solutés gazeux.

### 2. Principe de la CPG

Le mélange à éluer est injecté à l'aide d'une seringue. Une fois vaporisés par l'injecteur, les composés sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur (le plus souvent He ou N<sub>2</sub>). Suivant l'affinité avec la phase stationnaire, les composés sont séparés avant d'être détectés en sortie de colonne. Les appareils de CPG sont fréquemment couplés avec un spectromètre de masse pour l'identification des composés au fur et à mesure de leur élution.

## 2. Appareillage

Quel que soit le chromatographe à gaz, on retrouve toujours les principales composantes suivantes :

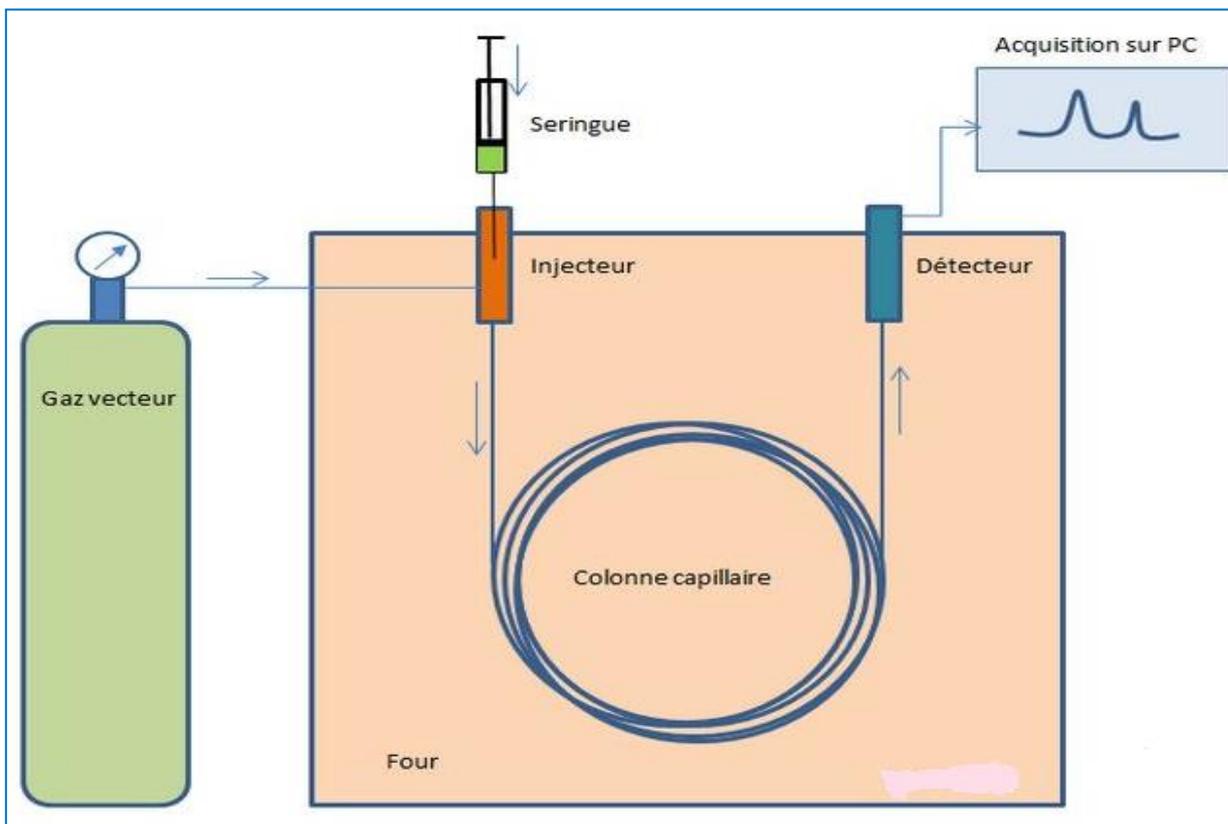


Figure 1 : schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.

### 2.1. Gaz vecteur

L'éluion 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.

### 2.2. Injecteur :

Le système d'injection permet l'introduction de l'échantillon dans le chromatographe, ainsi que la volatilisation des analytes. La température de l'injecteur doit être réglée de manière à entraîner la vaporisation de tous les analytes de l'échantillon : elle est généralement maintenue à 50°C au-dessus de la température d'ébullition de l'analyte le moins volatil. L'injection est faite :

- A l'aide d'une microseringue pour les liquides et les solutions.
- A l'aide d'une vanne à boucles pour les mélanges gazeux.

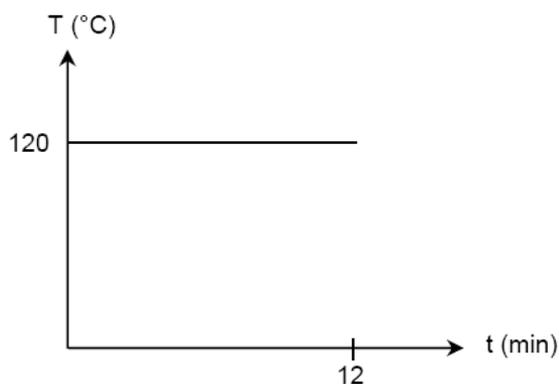
En règle générale, la chambre d'injection doit être à une température plus élevée que celle de la colonne pour faciliter l'évaporation des échantillons.

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).

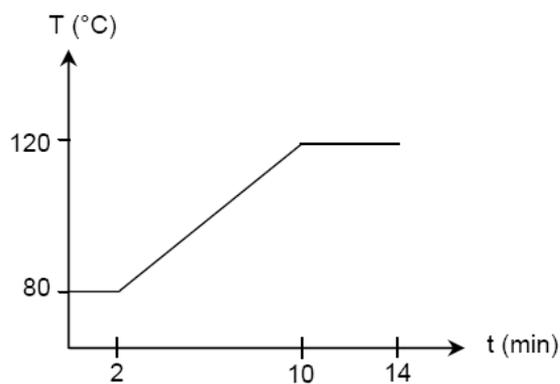
### 2.3. Four

Le four principal est un compartiment, placé entre la chambre d'injection et le détecteur, qui contient la colonne chromatographique. Il est muni d'éléments chauffants pouvant contrôler la température du four avec une très grande précision. Des contrôles permettent également de travailler à température programmée pour la séparation de mélanges de composés ayant des capacités de rétention très différentes sur la phase stationnaire.

Exemples de graphique :



Température isotherme



Température programmée

### 2.4. Colonne

Ils existent deux catégories de colonnes en CPG, les colonnes remplies et les colonnes capillaires.

#### 2.4.1. Colonnes remplies (à garnissage) :

Les colonnes à garnissage (les plus répandues) proprement dit, constituées d'une tubulure en verre, acier ou autre métal (les plus fréquentes sont en acier inoxydable), dont les dimensions varient de 2 à 6 mm pour le diamètre intérieur et de 1 à 10 m pour la longueur. Elles sont remplies d'un lit continu et homogène de granulés soit de produit absorbant, soit de produit

inactif appelé support imprégné d'un film mince du liquide lourd, à faible pression de vapeur saturante, appelé phase stationnaire.

### 2.4. 2. Colonnes capillaires

Les colonnes capillaires sont formées d'un tube de métal, de verre, de silice fondue ou de quartz, dont le diamètre intérieur du tube fabriquer ces colonnes varie de 100 à 530  $\mu\text{m}$  et son épaisseur est de 50  $\mu\text{m}$  et la longueur de 12 à 100 m enroulés en spirale. Ces colonnes sont rendues moins fragiles par revêtement extérieur d'un polymère thermiquement stable (polyamide,  $T_{\text{max}} = 370^\circ\text{C}$ ). La phase stationnaire recouvre la paroi interne sur une épaisseur contrôlée de 0.05 à 5  $\mu\text{m}$ .

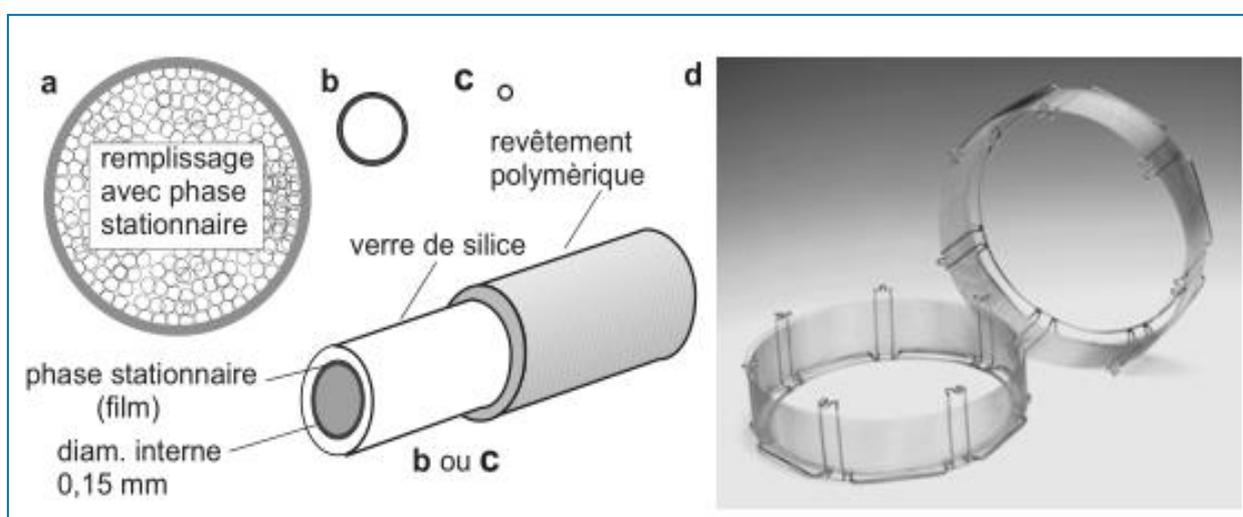


Figure.2 : Colonnes de CPG. Représentation à la même échelle des sections des trois types de colonnes. a) Colonne remplie de 2 mm de diamètre; b) colonne capillaire « 530 » de 0,53 mm; c) colonne capillaire de 0,1 mm; détail d'une colonne capillaire. À cette échelle, l'épaisseur de phase stationnaire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

### 2.5. Les échantillons :

Les échantillons liquides sont injectés dans la chambre de vaporisation à l'aide d'une microsiringue. La température est telle (c'est généralement celle du four) que la vaporisation est immédiate. Les limites de sensibilité sont, selon les appareils, de l'ordre du ng et même du pg. 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 estérifiés par le butanol, les acides gras estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés...

### 2.6. Détecteurs

Le détecteur du chromatographe à gaz est situé dans un compartiment immédiatement à la sortie de la colonne. Comme la chambre d'injection, la chambre à détection peut être chauffée à des températures très élevées. Son rôle est de détecter les composés à la sortie de la colonne et de transmettre l'information sous forme d'un signal électrique à l'enregistreur. Comme les pulsions électriques sont très faibles, un amplificateur est branché au détecteur pour multiplier ou diviser l'intensité des signaux d'un certain facteur, généralement des multiples de 10. Un détecteur est caractérisé principalement par sa sensibilité et sa capacité de donner une réponse proportionnelle à la concentration du composé détecté.

Les principaux détecteurs sont :

- Catharomètre
- Détecteur à Ionisation de Flamme (FID).
- Détecteur thermoionique.
- Détecteur à capture d'électrons.
- La spectrométrie de masse.

## Les techniques électrophorétiques

### 1.1. Histoire de l'électrophorèse:

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, Arne 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 ainsi obtenir sur le pôle + des protéines de charge très négative comme l'albumine et sur le pôle - des protéines de charge plus positive comme les globulines. Cette technique ne permet toutefois pas de séparer totalement les protéines. Il est néanmoins possible de mettre en évidence les frontières formées par des méthodes optiques comme la fluorescence, l'absorption des UV ou l'indice de réfraction.

**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 connue sous le nom **d'analyse immuno-électrophorétique**, qui permet d'analyser de manière précise 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. La méthode est rapidement utilisée dans de nombreux laboratoires médicaux pour des besoins de diagnostics.

**En 1955, O. Smithies** met au point la technique **d'électrophorèse en gel d'amidon**.

**En 1957, Joachim Kohn** sépare les différents 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.

### 1.2. Définition

Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Le préfixe « électro » fait référence à l'électricité et la racine « phorèse » vient du grec phoros, qui signifie « porter d'un côté à l'autre ».

L'électrophorèse est donc une technique d'analyse et de séparation basée sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champ électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ.

### 1.3. Principe

L'électrophorèse est une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également parfois pour purifier des molécules solubles. Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique ce qui entraîne la migration des molécules chargées. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules. A partir de ce principe général, il existe plusieurs variantes de cette technique adaptées à différentes situations.

### 1.4. Les différents types d'électrophorèses

Le choix du support est dicté par la nature des molécules à séparer et selon le support on distingue deux types d'électrophorèse :

**1.4. 1. L'électrophorèse libre, en veine liquide selon Tisélius** (1937), est réalisée dans un tube en U de section carrée (ceci afin de pouvoir réaliser des mesures optiques au travers du tube, comme avec une cuve de spectrophotomètre) : la séparation n'est pas totale, mais les frontières qui se forment sont mises en évidence par des méthodes optiques (absorption UV, indice de réfraction, fluorescence...). Cette méthode est utilisée en recherche pour mesurer la mobilité électrophorétique et pour vérifier la pureté des protéines.

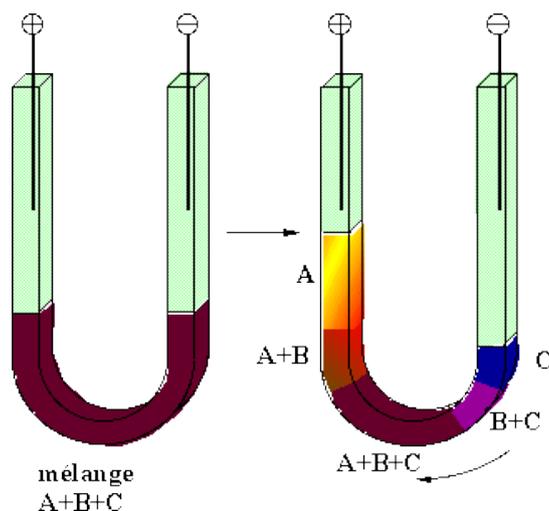


Fig 1 : appareillage pour l'électrophorèse libre, en veine liquide

#### 1.4. 2. L'électrophorèse sur supports poreux (électrophorèse de zone)

Ce type d'électrophorèse utilise un support poreux pour stabiliser la phase liquide. Le support doit être homogène, poreux et inerte. Différents types de support peuvent être utilisés.

##### Différents supports d'électrophorèse de zones :

Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support :

- papier
- acétate de cellulose
- semi-solide (gels)
- Différents types d'électrophorèse sur gel:
  - ✓ électrophorèse sur gel d'agarose
  - ✓ électrophorèse en champ pulsé
  - ✓ électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)
  - ✓ électrophorèse bi-dimensionnelle
  - ✓ Les électrophorèses peuvent aussi être réalisées en conditions dénaturantes (détergents type SDS ou urée).

##### a- Électrophorèse sur papier

Assez peu résolutive, cette technique d'électrophorèse est surtout destinée à séparer des molécules de petite taille, dont les acides aminés. Des phénomènes d'interférence liés à la charge des acides aminés et de la cellulose du papier interviennent de façon notable. Une goutte de solution contenant l'échantillon à analyser est déposée sur une bande de papier, puis séchée. La bande de papier est humidifiée avec un tampon convenablement choisi, puis les

deux extrémités de la bande sont plongées dans deux réservoirs contenant le tampon. Chaque réservoir est connecté à une électrode. Un champ électrique continu est appliqué, et les acides aminés se déplacent en fonction de leur charge nette. En fin d'électrophorèse, la bande de papier est séchée puis les acides aminés sont révélés par une réaction colorimétrique telle que celle à la ninhydrine.

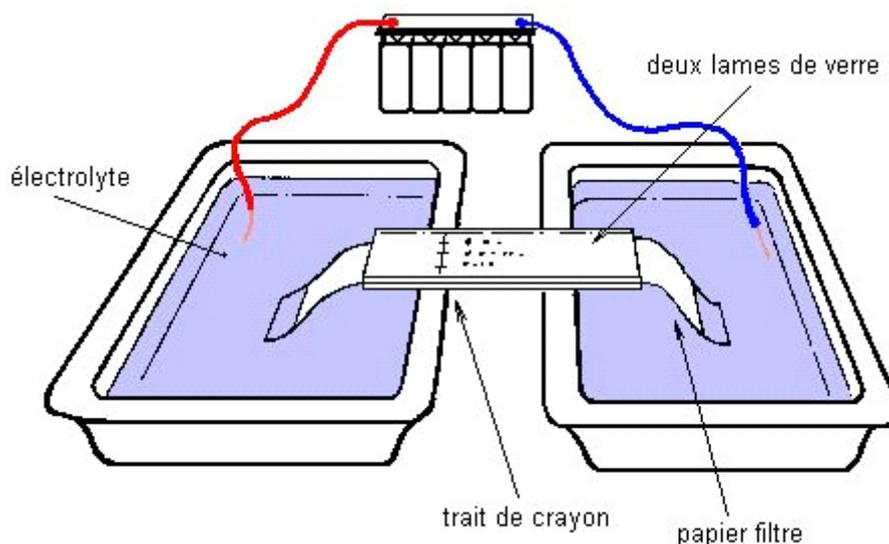


Fig 2 : appareillage pour l'électrophorèse sur papier.

### b-Électrophorèse sur acétate de cellulose :

L'électrophorèse se fait dans des conditions proches de celles de l'électrophorèse sur papier. Les bandes d'acétate de cellulose sont fragiles, mais elles limitent la diffusion des molécules à séparer. La révélation des protéines se fait également par une réaction colorimétrique (rouge de ponceau par exemple). Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement des groupes de protéines. Elle est peu coûteuse et permet une analyse rapide des protéines sériques.

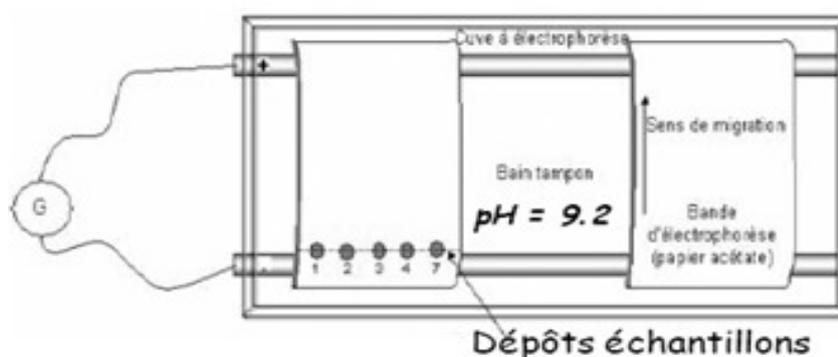


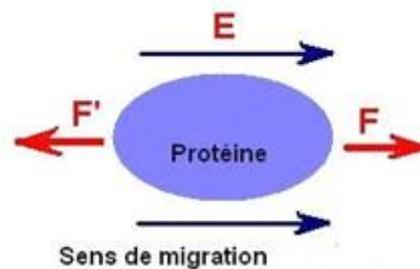
Fig 3 : appareillage pour l'électrophorèse sur les bandes d'acétate de cellulose.

### c-Électrophorèse sur gel d'amidon :

L'électrophorèse sur gel d'amidon est particulièrement utile l'analyse et la séparation des isoenzymes. Le principe de la technique repose sur une séparation électrophorétiques des protéines sur une matrice poreuse composée d'un gel d'amidon, de pH précis. Les enzymes présentes sont détectées en incubant le gel dans une solution contenant un substrat spécifique de l'enzyme donnant lieu à un produit coloré. Les profils obtenus sont désignés sous le nom de zymogrammes.

### d-Électrophorèse sur gel

Sous l'action d'un champ électrique, E, une protéine se déplace avec une vitesse(v) proportionnelle aux champs:



$V = \mu E$ , avec  $\mu$  appelée « **mobilité électrophorétique** »

$$\mu = v/E$$

$\mu$  en  $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$ ,  $v$  en  $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $E$  en  $\text{volt} \cdot \text{cm}^{-1}$

Le champ électrique (E) crée entre 2 électrodes, exerce une force, F, sur une protéine que l'on suppose sphérique et de charge q;

$$F = Q \cdot E$$

Les forces de frottement, F', dues à la viscosité ( $\eta$ ) vont s'opposer à la migration de la protéine et la freiner;

$$f = 6 \Pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$$

Il arrive un moment où ces deux forces s'équilibrent, et la particule se déplace alors à vitesse constante; on peut alors écrire :

$$Q \cdot E = 6 \Pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad \text{soit} \quad v = Q \cdot E / 6 \Pi \cdot \eta \cdot r$$

On définit pour chaque particule sa **mobilité  $\mu$** , de manière indépendante du champ électrique, par la relation suivante:

$$\mu = v/E \text{ (= vitesse de migration pour un champ électrique de 1 Volt/cm)}$$

$$\text{soit encore: } \mu = Q / 6 \Pi \cdot \eta \cdot r$$

Donc, la mobilité d'une particule migrant dans un champ uniforme dépend de 3 facteurs : q, ( $\eta$ ) et r.

Elle est proportionnelle à sa charge (q), inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du milieu ( $\eta$ ) et son rayon (r). La mobilité est une caractéristique de chaque particule, il est donc possible d'effectuer une séparation en se basant sur cette propriété.

#### d.1. **Électrophorèse sur gel d'agarose :**

L'[électrophorèse](#) sur gel d'agarose est une méthode utilisée en [biochimie](#) et en [biologie moléculaire](#) :

- Soit à des fins analytiques: pour séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité,
- Soit à des fins préparatoires, pour purifier un fragment d'ADN de taille connue. La taille des fragments qu'il est possible de séparer est comprise entre 0,2 et 50 kb.

Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BEI). On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng).

L'électrophorèse en gel d'agarose est donc une technique très sensible; elle est de plus rapide et simple à mettre en œuvre.

L'agarose est un polyside hautement purifié extrait de l'agar. Ce polymère linéaire est constitué de la répétition d'un motif de type diholoside.

L'agarose est une poudre blanche qui se dissout dans l'eau à ébullition. La solution d'agarose reste à l'état liquide tant que la température est supérieure à 40-45 °C (sulfusion) Quand la température devient inférieure à 40°C, la solution se solidifie en un gel stable qui ne fond pas tant que la température reste inférieure à 100 °C.

D'une manière générale, l'agarose forme des gels dont la réticulation est assez faible, permettant la séparation de molécules de très hautes masses moléculaires. Ils sont principalement utilisés pour séparer des molécules d'ADN ou d'ARN. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

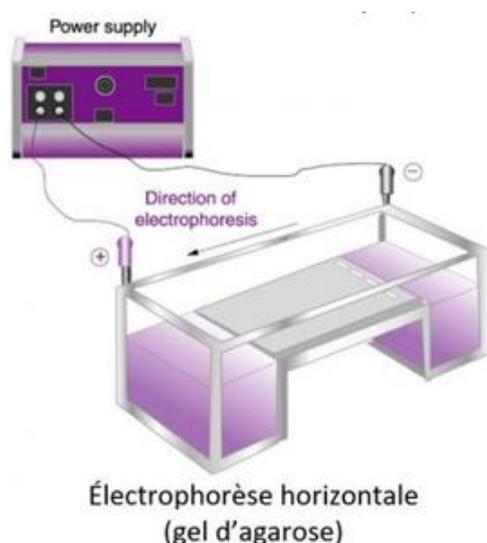


Fig 4 : appareillage pour utilisés pour l'électrophorèse en gel d'agarose.

## d.2. Sur gel de polyacrylamide

### d.2.1. L'électrophorèse en conditions non dénaturantes

Cette technique aussi appelé PAGE (pour PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est très utilisée en immunologie, dans l'étude des protéines et également utilisée pour le séquençage de l'ADN.

Le gel de polyacrylamide est constitué d'**acrylamide** (extrêmement neurotoxique par ingestion ou contact avec la peau) qui est l'unité de base et de **bisacrylamide** qui est l'agent portant. En faisant varier les taux de ces 2 substances on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel.

La polymérisation est réalisée grâce à l'ajout de 2 réactifs: le **TEMED** (N,N,N',N' tetra-méthyl-éthylènediamine) et **l'ammonium persulfate** qui deviennent des anions hyperactifs en présence de lumière.

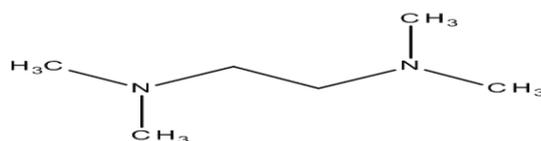


Fig 5: Structure chimique du TEMED.

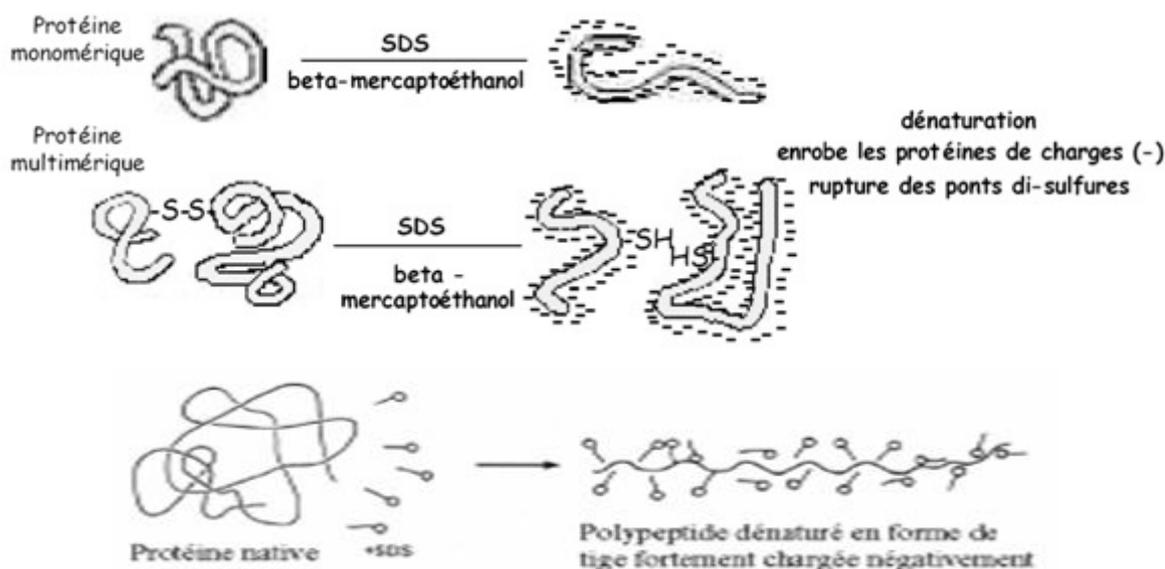
Plus que le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus que la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. Par conséquent, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer. Donc, plus que la masse moléculaire du composé est élevée, plus que la migration est lente.



### d.2.2. L'électrophorèse en conditions dénaturantes

Une variante de cette technique consiste à utiliser du **SDS (Sodium Dodécylsulfate)** qui est un détergent anionique fort. Il a la propriété de défaire la structure spatiale en se fixant sur les protéines et de les charger de la même façon permettant ainsi de les séparer uniquement en fonction de **leur masse moléculaire**. Les protéines sont dites dénaturées: elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native.

Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, on utilise un agent réducteur, le  **$\beta$ -mercaptoéthanol** qui réduit les ponts disulfures des protéines les rendant ainsi sous forme monomérique. **La forte charge négative globale apportée par le SDS masque la charge intrinsèque des protéines**

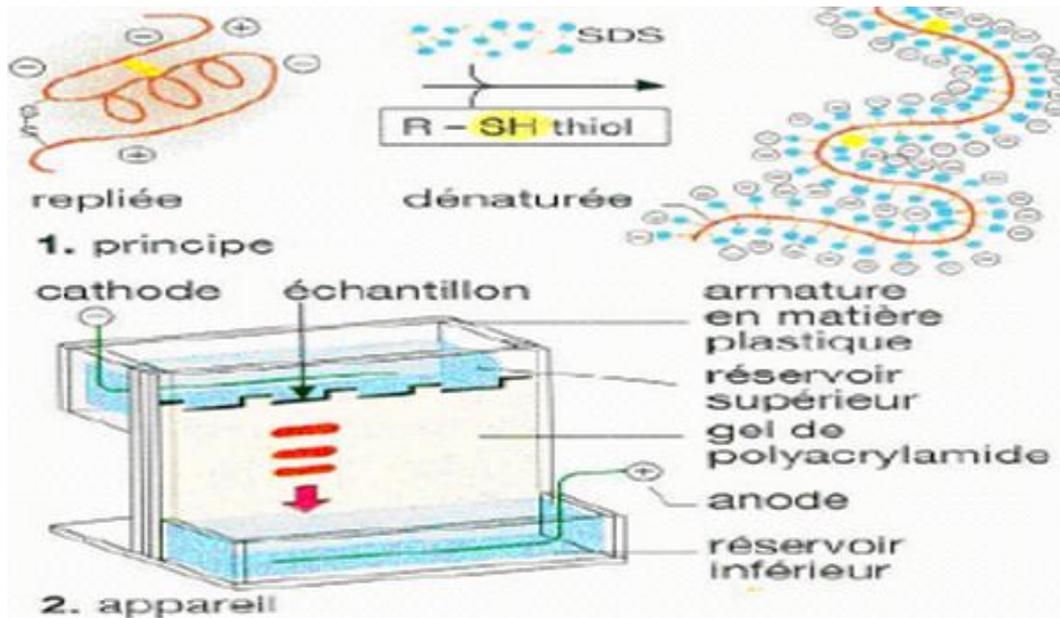


Par conséquent le rapport charge/masse sera le même pour toutes les protéines de même masse et la séparation électrophorétique du gel avec du SDS dépendra uniquement du phénomène de gel-filtration par les pores du gel.

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.

- cette méthode possède deux grands avantages par rapport à l'électrophorèse ordinaire :

- l'utilisation de SDS dissout les agrégats et les particules insolubles qui peuvent causer des problèmes en bloquant les pores du gel
- la mobilité électrophorétique possède une relation directe avec le poids moléculaire



### d.3. Visualisation des protéines dans les gels

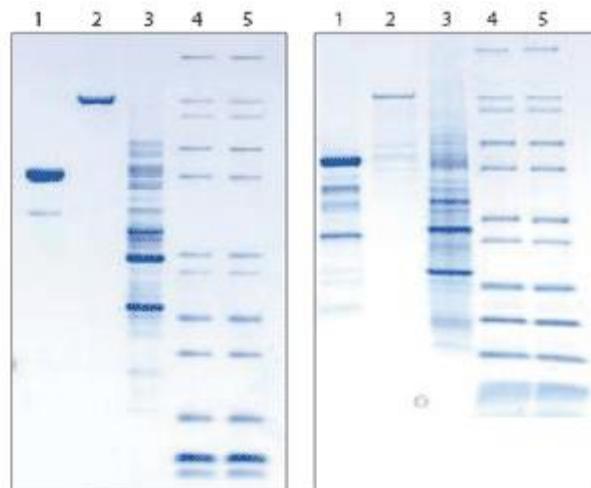
Une fois que la migration des protéines dans le gel est terminée, il faut visualiser les bandes obtenues par les protéines

- les différentes approches sont:

- la coloration avec le bleu de Coomassie brillant
- la coloration au nitrate d'argent.
- Le bleu noir naphthol.

- une approche plus spécifique consiste à détecter la protéine d'intérêt avec un

Exemple de gel après coloration au bleu de Coomassie :



### e.1.Électrophorèse bidimensionnelle

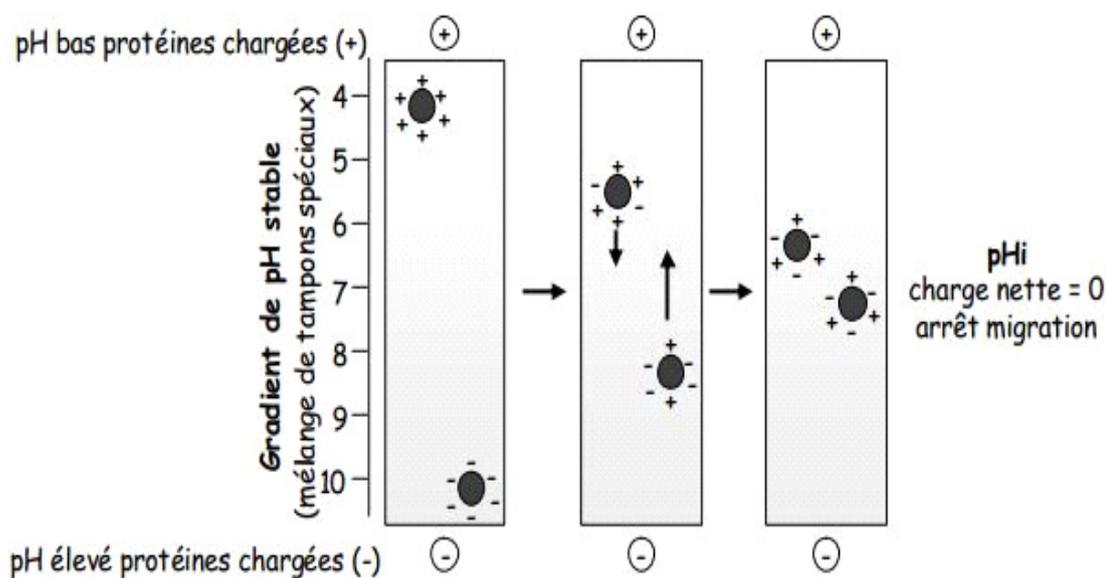
Lorsqu'il est existé des bandes protéiques très proches, on a un chevauchement. Par les méthodes unidimensionnelles la résolution est bon pour moins de 50 protéines. Grâce à l'électrophorèse bidimensionnelle, on combine deux modes de séparation différents. La résolution peut être appliquée pour plus de 1000 protéines différentes.

- **DIMENSION 1**

Séparation des protéines en fonction de la charge par Focalisation Isoélectrique (FIE).

La migration est effectuée dans un gradient de pH, chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pHi. On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration. Le gradient de pH est généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication : on utilise un mélange de telles molécules, possédant des pHi dans une certaine gamme (gamme large ex :3-9, ou plus ou moins étroite ex : 4-5 ou 5-6.5)

On réalise une électrophorèse dans un tube étroit de gel polyacrylamide où un gradient de pH est établi. On soumet alors à un fort courant électrique



Les protéines migrent vers la position du gradient = pHi et s'y immobilisent.

- **DIMENSION 2**

Séparation en fonction de la taille des protéines : SDS-PAGE Le gel étroit de protéines séparées par FIE est soumis à une SDS-PAGE dans une direction perpendiculaire.

