

La chromatographie liquide

La chromatographie

Introduction

Le mot chromatographie vient du grec *chroma* qui signifie (couleur):

Quelques dates...

1903, Séparation pigments colorés (Tswett)

1938, chromatographie sur couche mince

1941, chromatographie de partage

1954, séparation d'aa par chromatographie d'échange d'ions

1959, CPG

1968, CLHP

Chromatographie: Principe

En chromatographie les séparations sont fondées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles:

- Une phase stationnaire
- Une phase mobile

Chromatographie: Principe

- La phase stationnaire peut être disposée:
 - Soit **dans une colonne**, la phase mobile percole celle-ci: c'est ***la chromatographie sur colonne***
 - Soit **en couche mince** sur un support plan (plaque de verre, film plastique...) et la phase mobile se déplace par capillarité: c'est ***la chromatographie planaire***

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

☞ La chromatographie en phase gazeuse (CPG), la phase mobile est un gaz (gaz vecteur).

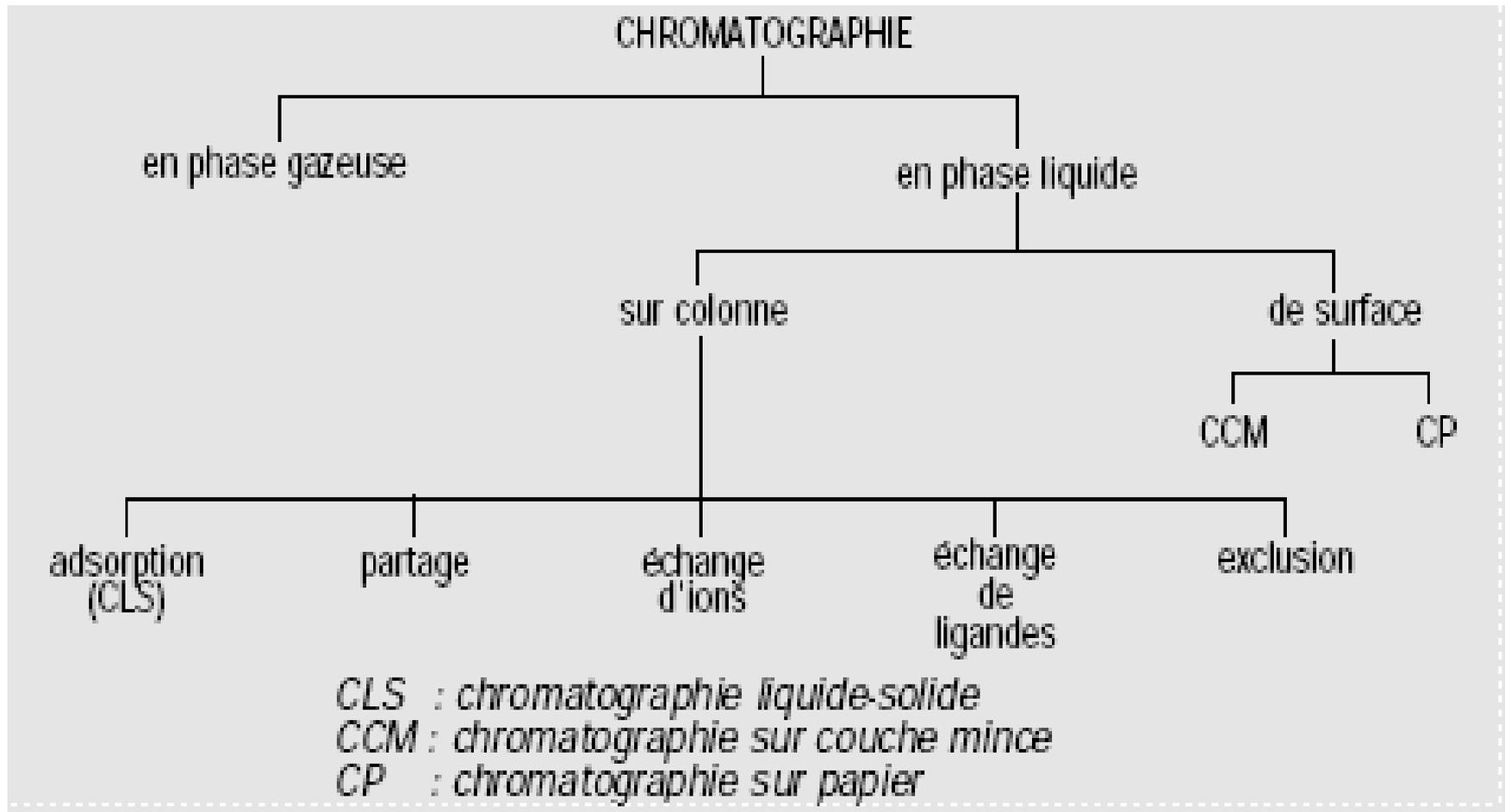
☞ La chromatographie en phase liquide (CPL), la phase mobile est constituée d'un solvant pur ou d'un mélange de solvants.

☞ La chromatographie en phase supercritique (CPS), la phase mobile est un fluide supercritique, c'est-à-dire porté à des t° et des pressions $>$ à celles du point critique

La chromatographie en phase gazeuse: Généralités

- ☞ ne permet de séparer que 20 % des molécules organiques
- ☞ interactions des solutés uniquement avec la phase stationnaire
- ☞ le gaz vecteur n'a que peu d'influence sur la qualité de la séparation
- ☞ les solutés doivent être volatils

Classification des méthodes chromatographiques



La chromatographie en phase liquide

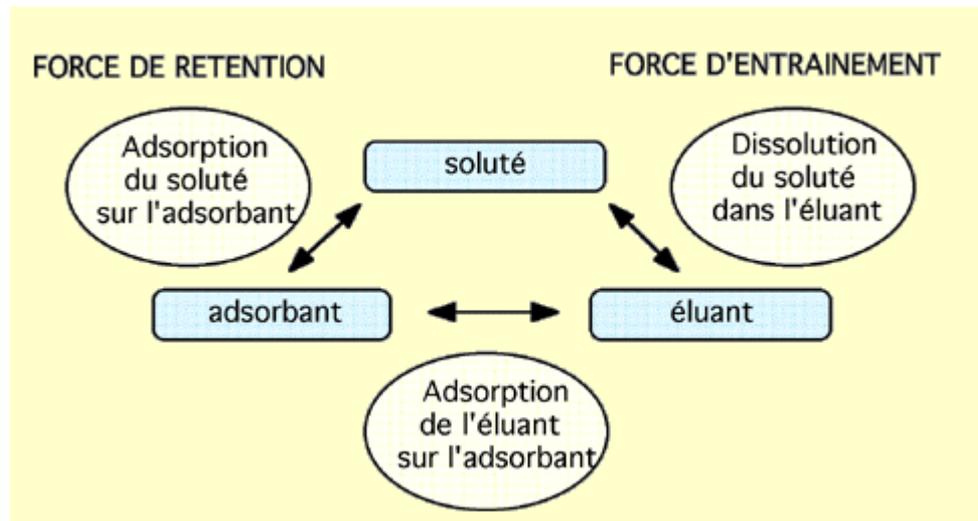
- Définition: Technique physicochimique de séparation. L'échantillon à analyser est en solution, les constituants du mélange à séparer sont appelés solutés.
- La séparation résulte d'un équilibre de partage des solutés entre deux phases:
 - - une phase fixe solide appelée phase stationnaire
 - - et une phase mobile appelée éluant

La chromatographie en phase liquide

- Un **éluant** est un ***solvant ou mélange de solvants*** utilisé pour entraîner les solutés à travers une phase stationnaire.
- L'éluion est un processus au cours duquel des solutés sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile.

La chromatographie en phase liquide et supercritique: Généralités

☞ interactions tripartites entre soluté, phase stationnaire et phase mobile



☞ pas de limitation en ce qui concerne la nature des solutés (permet l'analyse des espèces thermosensibles et d'espèces ionisées donc non volatiles)

☞ qualité de la séparation est régie par la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile

Classification des méthodes chromatographiques

Selon la finalité, on distingue:

- 👉 la chromatographie analytique
- 👉 la chromatographie préparative
- 👉 l'analyse de traces et traitement de l'échantillon (SPE, SPME...)

Classification des méthodes chromatographiques

La chromatographie analytique:

- 👉 objectif: séparer, identifier et/ou quantifier les constituants du mélange
- 👉 l'aire du pic observé est proportionnelle pour chaque soluté à la quantité injectée

Classification des méthodes chromatographiques

La chromatographie préparative:

☞ *objectif: séparer et récupérer* les constituants du mélange

- quelques milligrammes à quelques dizaines de milligrammes (échelle semi-préparative) pour la mise en œuvre de méthodes physicochimiques.

- quelque centaines de milligrammes à quelques grammes (échelle préparative) pour tests cliniques dans le cas notamment de médicaments.

Chromatographie: Grandeurs fondamentales

Pour un système chromatographique donné, on caractérise la distribution de chaque soluté entre les deux phases par le coefficient de distribution (ou coefficient de partage) K

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

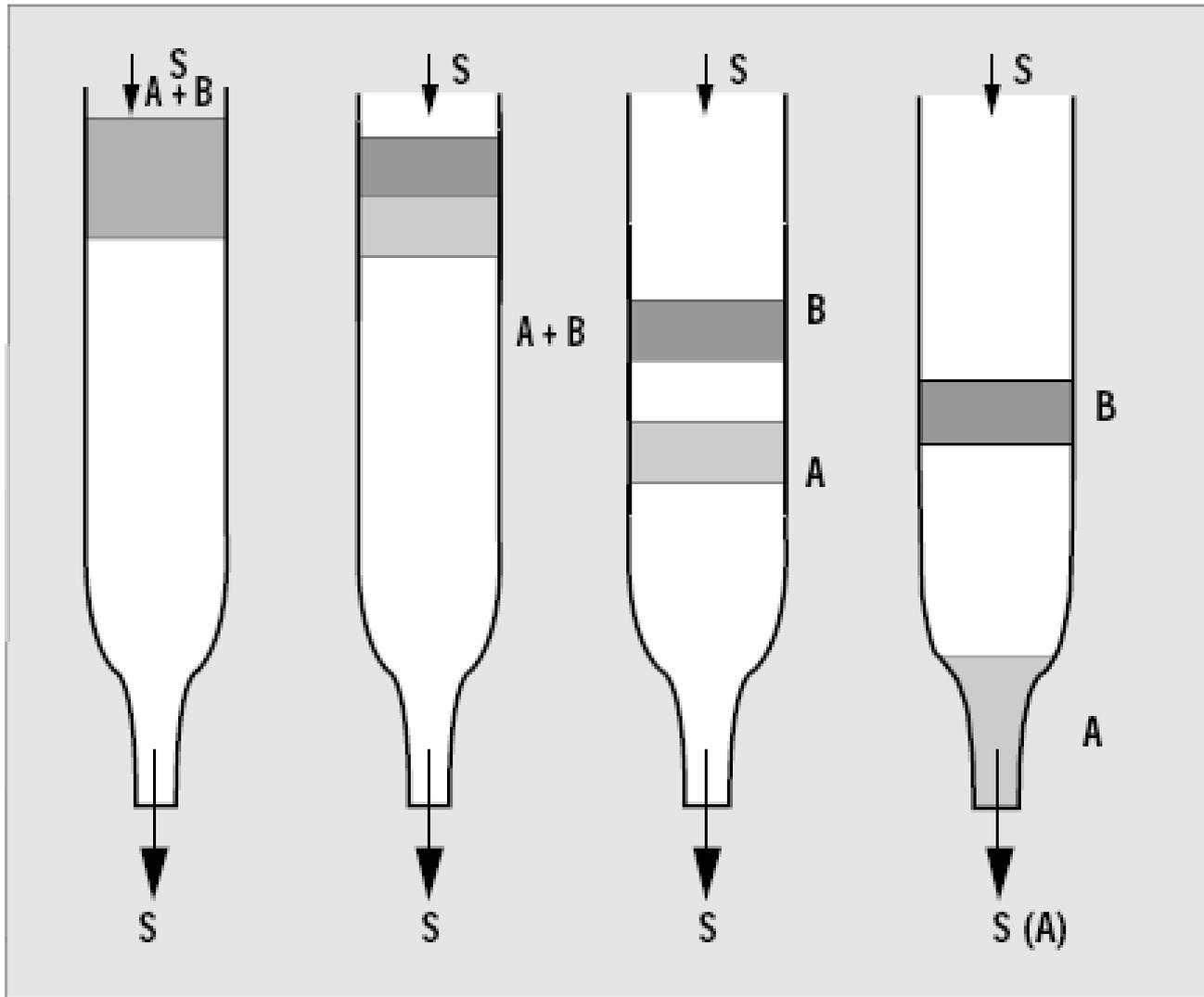
C_s et C_m désignant respectivement, les concentrations du soluté à l'équilibre dans les phases stationnaire et mobile

Chromatographie: Grandeurs fondamentales

Les divers constituants d'un mélange ayant des affinités différentes pour chacune des deux phases, migreront à des vitesses différentes et pourront donc être séparés.

Le coefficient de partage est fonction de ***trois types d'affinité*** :

- le soluté et la phase mobile
- le soluté et la phase stationnaire
- les phases stationnaire et mobile.



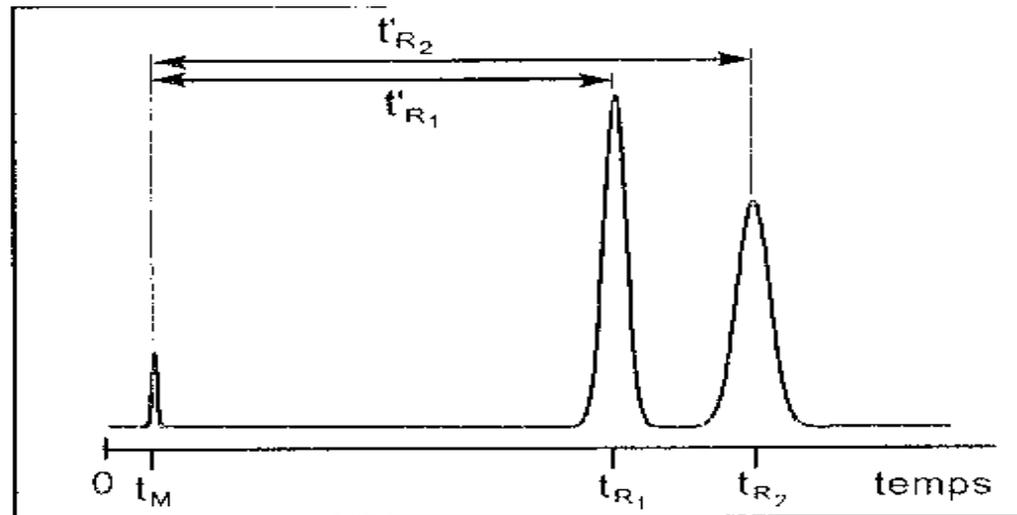
Chaque soluté est soumis à deux effets antagonistes:

- un effet d'entraînement par la phase mobile
- un effet de rétention par la phase stationnaire

- Si les quantités injectées sont suffisamment faibles, on observe en sortie de détecteur des pics symétriques et gaussiens.
- Une bonne séparation implique que:
 - ☞ les divers constituants du mélange soient retenus dans la colonne (présentent une certaine affinité pour la phase stationnaire).
 - ☞ les différents pics soient bien séparés.
 - ☞ l'analyse soit aussi rapide que possible.

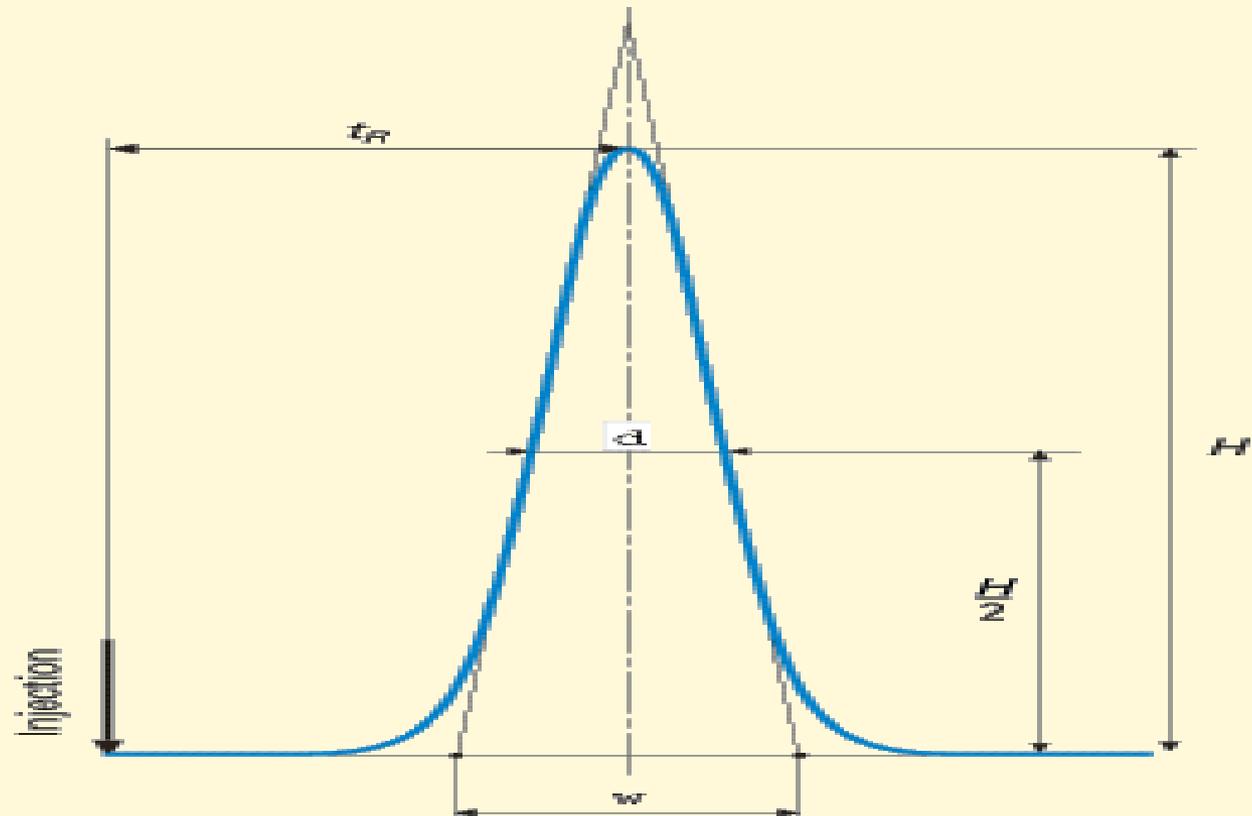
Chromatogramme :

Un chromatogramme est un diagramme à deux dimensions montrant l'évolution, en fonction du temps, d'un paramètre (absorbance, fluorescence...) qui dépend de la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne.



- Si la quantité d'échantillon injecté est **suffisamment petite**, on obtient, sur le chromatogramme pour chaque composé élué un ***pic symétrique et gaussien***.
- *L'aire du pic est proportionnelle à la concentration. Il doit apparaître sur le chromatogramme autant de pics que de produits.*

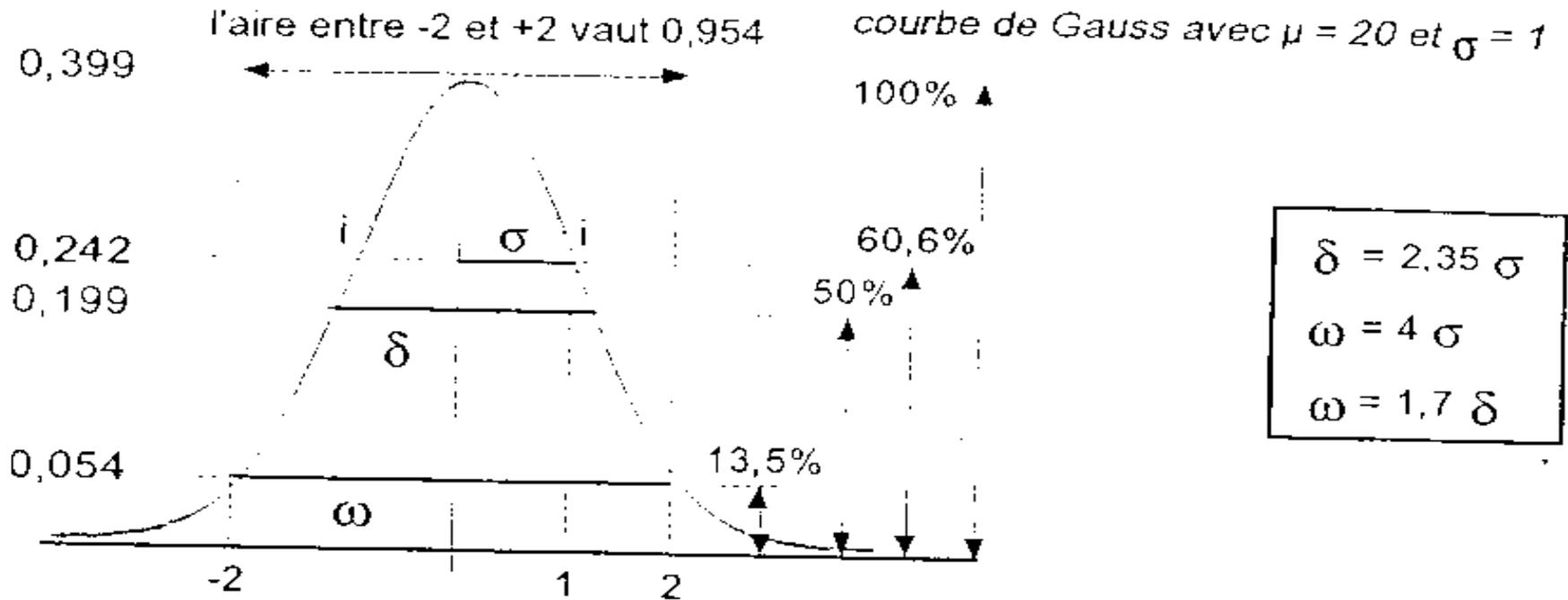
Chromatographie: Grandeurs fondamentales



H hauteur du pic
 t_R temps de rétention

w largeur à la base
 d largeur à mi-hauteur

Paramètres importants en chromatographie

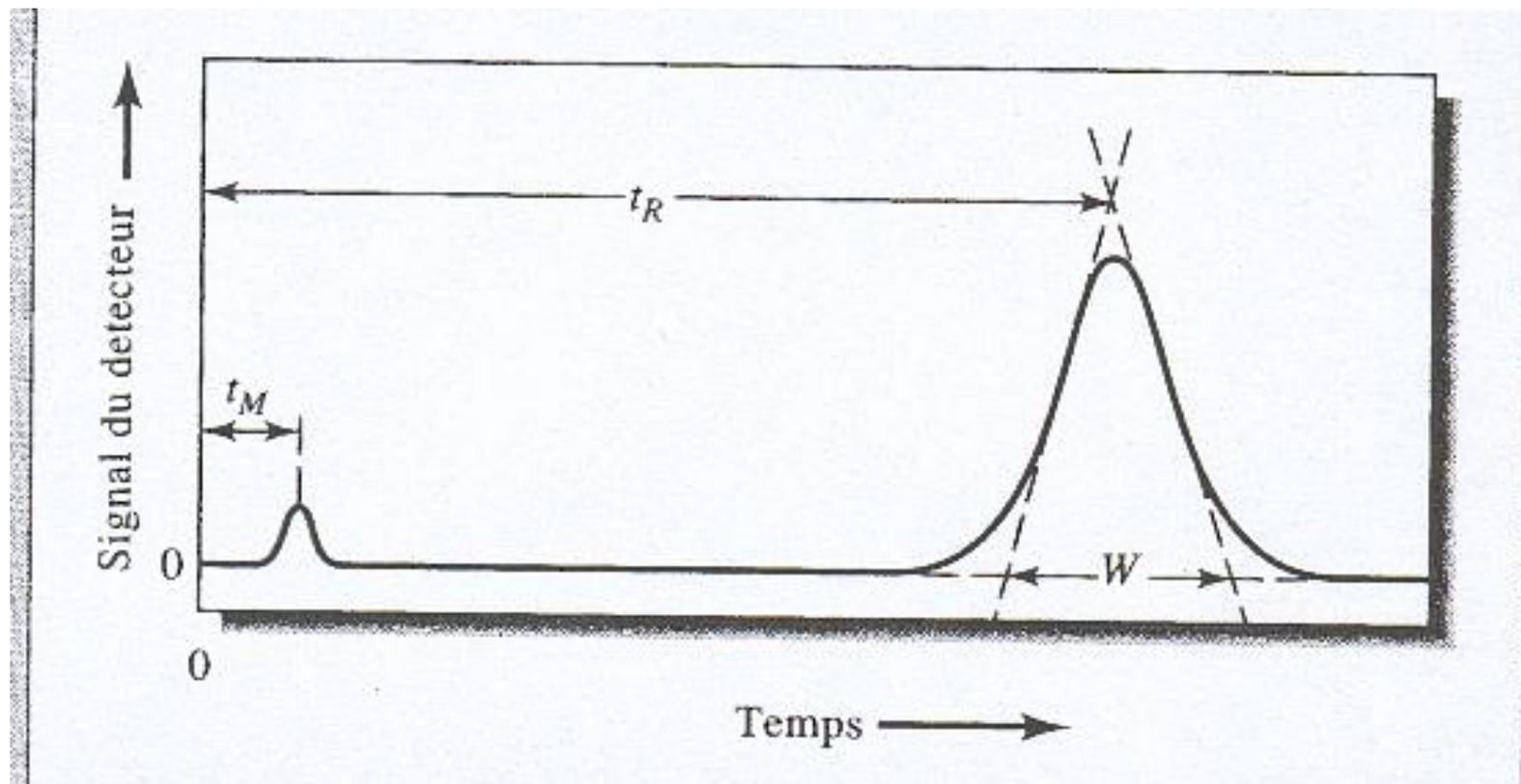


ω = largeur du pic à la base (tangentes aux pentes de pics jusqu'à la ligne de base)

δ = largeur du pic à mi-hauteur

σ = l'écart-type (exprimé en cm)

Méthode des tangentes



Chromatographie: Grandeurs de rétention

Le **temps mort** (t_m) est le temps mis par un soluté non retenu par la phase stationnaire pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne (temps passé dans la phase mobile)

Le **temps de rétention réduit** (t'_r) est le temps passé par les solutés dans la phase stationnaire

Le **temps de rétention** (t_r) est le temps d'élution au sommet du pic, temps mesuré à partir de l'injection. t_r est indépendant de la quantité injectée

$$t_r = t'_r + t_m$$

Chromatographie: Grandeurs de rétention

Le **volume de rétention V_r** représente le volume de phase mobile nécessaire pour éluer chaque composé.

$$V_r = t_r D$$

D étant le débit de la phase mobile

Remarque: le temps de rétention ainsi que le volume de rétention sont des grandeurs caractéristiques de chaque composé dans des conditions chromatographiques données.

Chromatographie: Grandeurs de rétention

Le **volume mort (Vm)** correspond au volume permettant d'éluer une substance non retenue par la phase stationnaire. On peut l'exprimer en fonction du débit de la phase mobile.

$$V_m = t_m * D$$

C'est le volume de phase mobile contenu dans la colonne.

$$V_m = V_i + V_p$$

V_i = volume interstitiel et V_p volume poreux

Chromatographie: Grandeurs de rétention

On appelle **V_s**, le volume de phase stationnaire contenu dans une colonne.

Le volume de rétention est relié directement au coefficient de distribution K par la relation:

$$V_r = V_m + K V_s$$

Chromatographie: vitesse linéaire moyenne

Vitesse moyenne linéaire de la phase mobile

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M}$$

ou L = longueur de la colonne

Vitesse moyenne linéaire du soluté

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

Chromatographie: Grandeurs de rétention

Afin de s'affranchir des paramètres géométriques de la colonne, on utilise pour caractériser la rétention d'un composé **le facteur de capacité k'** défini comme le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m}$$

En effet, $K = C_s / C_m$

Chromatographie: Grandeurs de rétention

Soit:

$$k' = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

k' est le rapport du temps passé par le soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile. k' peut être déterminé expérimentalement.

Si $k'=0$, $t_R=t_m$, la substance n'est pas retenue sur la phase stationnaire

Si $k' < 1$, composé très peu retenu sur la colonne

Si $1 < k' < 5$, domaine optimal de séparation

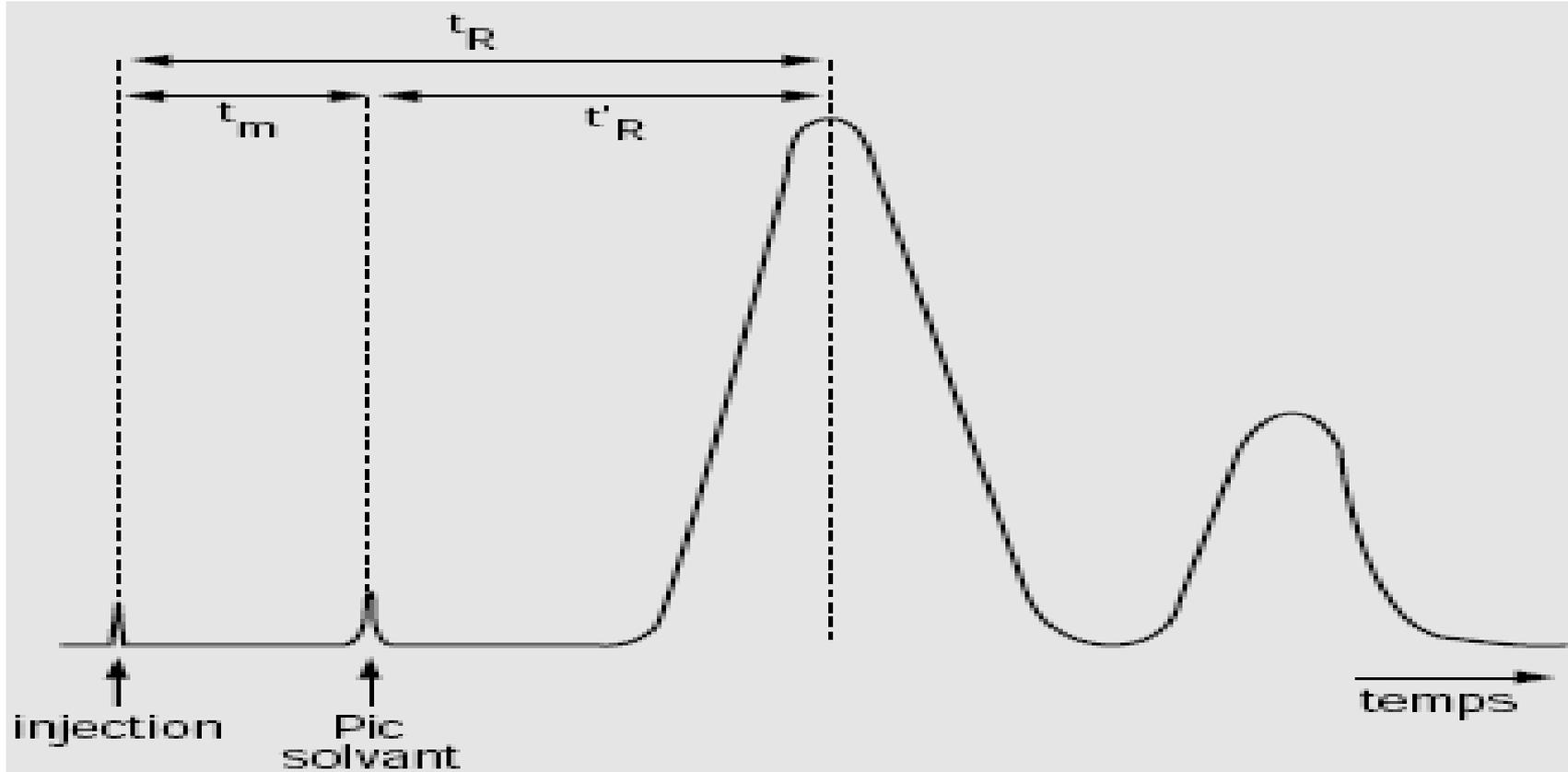
Démonstration

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + k'_A}$$

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \times \frac{1}{1 + k'_A}$$

Cette équation peut être reformulée en :

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$



Facteur de capacité

$$k' = \frac{t'_R}{t_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

Chromatographie: Grandeurs de rétention

Le temps de rétention est ainsi lié au facteur de capacité par la relation:

$$t_R = t_m(1 + k')$$

u étant la vitesse de la phase mobile:

$$t_R = \frac{L}{u}(1 + k')$$

Chromatographie: Qualité de la séparation

Plusieurs critères en chromatographie permettent d'évaluer la qualité d'une séparation:

-  la sélectivité α
-  Le nombre de plateaux théoriques
-  La résolution

Chromatographie: Sélectivité

La sélectivité α (ou rétention relative) permet d'évaluer la différence de rétention entre deux composés 1 et 2.

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_m}{t_{R_1} - t_m} = \frac{K'_2}{K'_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

- 👉 La séparation est évidemment possible que si $\alpha \neq 1$
- 👉 α peut être déterminé expérimentalement
- 👉 Toute variation de phase mobile et de phase stationnaire influe α

Chromatographie: Sélectivité

La sélectivité α mesure la différence de distribution thermodynamique des deux solutés, on a:

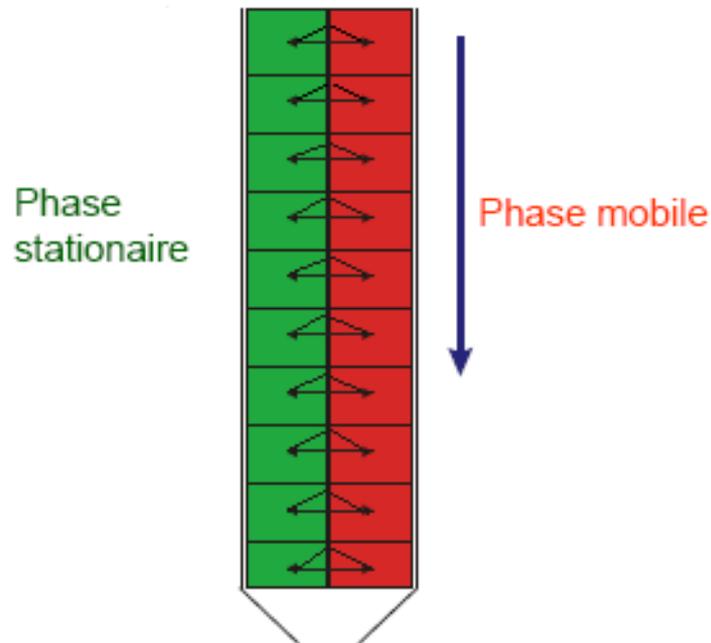
$$\ln \alpha = \ln \frac{K_2}{K_1} = - \frac{\Delta(\Delta G^0)}{RT}$$

avec $\Delta(\Delta G^0)$ différence des enthalpies libres de distribution des deux composés : $\Delta(\Delta G^0) = \Delta G_2^0 - \Delta G_1^0$,
 R constante molaire des gaz (= $8,31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$),
 T température (K).

La différence $\Delta(\Delta G^0)$ résulte des interactions spécifiques auxquelles sont soumis les solutés de la part de la phase stationnaire et de la phase mobile

Chromatographie: Efficacité d'une colonne (N = nombre de plateaux théoriques)

- Fictivement on assimile la colonne chromatographique à une suite de plateaux sur lesquels s'établit l'équilibre du soluté entre les phases stationnaires et mobiles.



Chromatographie: Efficacité d'une colonne

 N dépend de la nature des solutés, de la nature de la phase mobile et de la nature de la phase stationnaire.

 Plus grand est le nombre de plateaux, meilleure sera la séparation, plus fins seront les pics.

 Plus N est grand, plus la colonne est efficace.

 N peut atteindre des valeurs de l'ordre de 100000.

Chromatographie: Efficacité d'une colonne

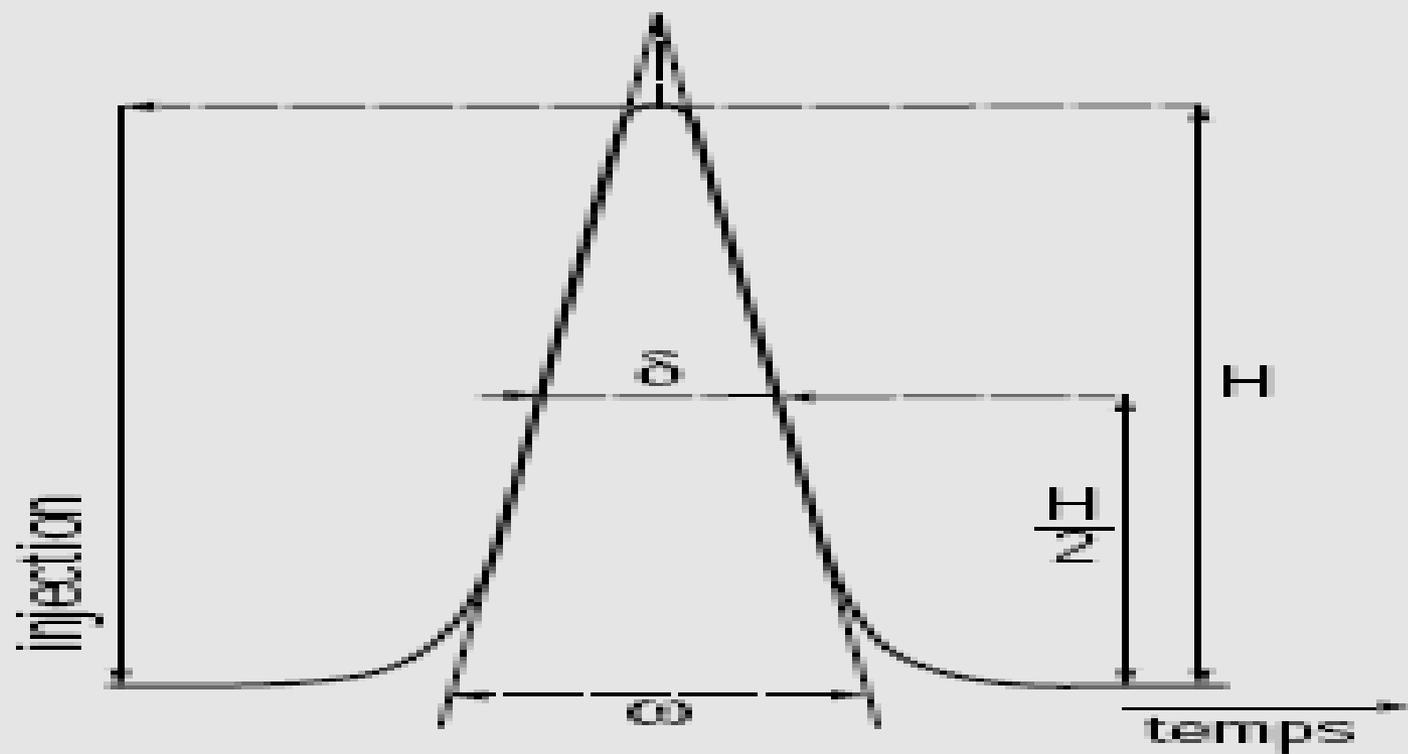
L'efficacité d'une colonne, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque soluté, par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne.

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

avec ω largeur du pic à la base, définie comme la distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion avec la ligne de base,
 δ largeur du pic à mi-hauteur.

 N dépend de la nature des solutés, de la nature de la phase mobile et de la nature de la phase stationnaire

 Plus grand est le nombre de plateaux, meilleure sera la séparation, plus fins seront les pics.



Nombre de plateaux
théoriques :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

Chromatographie: Efficacité d'une colonne

Influence de la taille des particule sur N

Diamètre des particules	N
10 μm	5000
5 μm	9000
3 μm	15000

Chromatographie: Efficacité d'une colonne

On peut améliorer l'efficacité d'une colonne en augmentant la longueur de la colonne, mais on augmente les temps d'analyse, mieux vaut jouer sur la granulométrie, la nature de la phase stationnaire, mobile...

Pour pouvoir comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, on définit **la hauteur équivalente à un plateau théorique** (HEPT ou H):

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

avec L, longueur de la colonne

Chromatographie: Efficacité d'une colonne

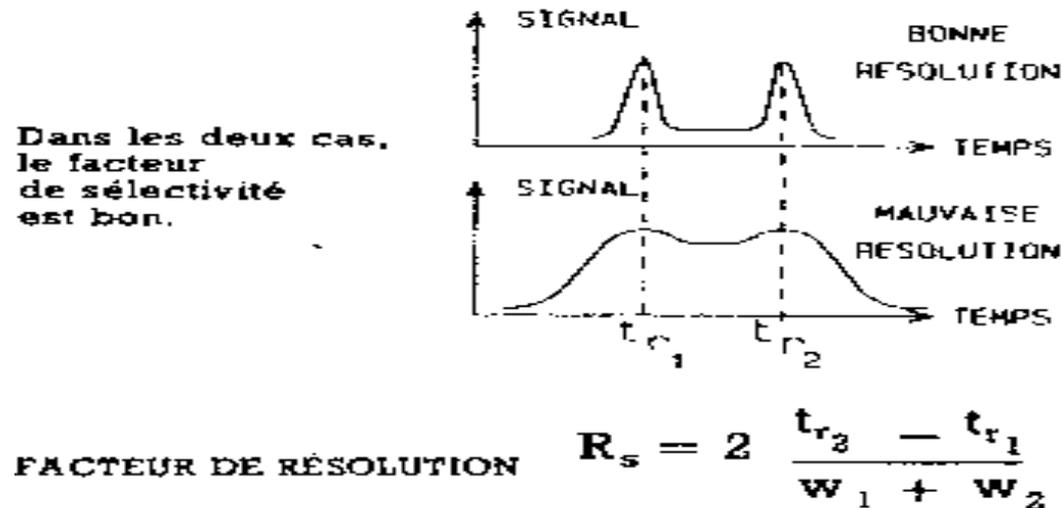
- On définit également le nombre de plateaux effectifs:

$$N_{\text{eff}} = 16 \cdot (t'_r / \sigma)^2$$

le nombre de plateaux effectifs dépend uniquement du temps passé par le soluté dans la phase stationnaire.

Chromatographie: La résolution

- ➡ La sélectivité α n'est pas suffisante pour juger de la qualité de la séparation. En effet, pour une même valeur de α , la séparation peut être bonne ou incomplète.



- ➡ La largeur des pics (w) a donc une importance fondamentale

Chromatographie: La résolution

La résolution mesure d'aptitude d'une colonne chromatographique à séparer deux solutés:

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{w_B + w_A}$$

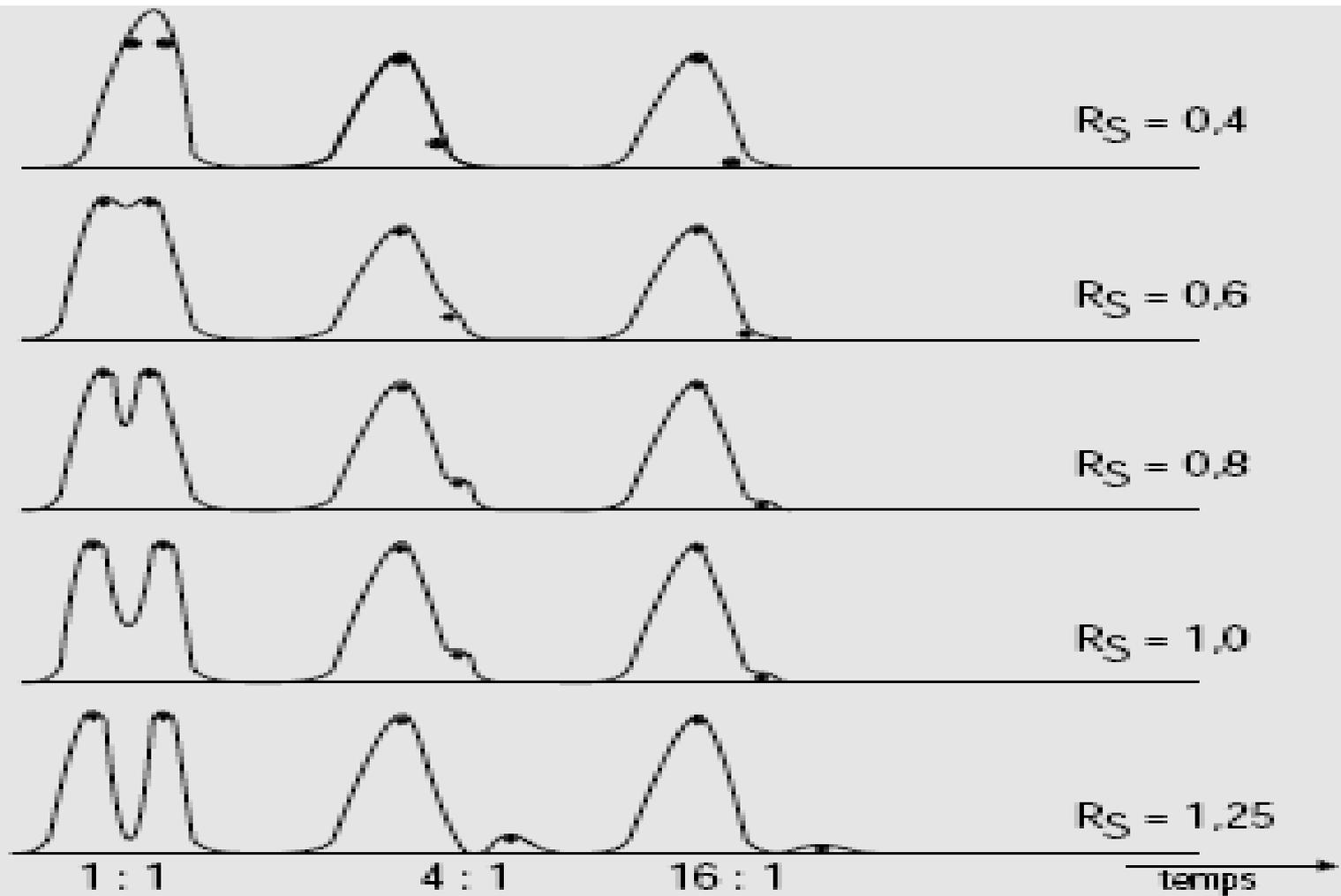
Chromatographie: La résolution

La résolution R_s entre deux pics est définie par la relation:

$$R_s = 2 \frac{(t_{R_2} - t_{R_1})}{\omega_2 + \omega_1}$$

ω_1 et ω_2 étant la largeur des pics à la base

- ➡ Plus les pics sont fins, meilleure est la résolution.
- ➡ Pour deux solutés conduisant à des surfaces voisine:
Si $R_s < 0.8$, les pics se chevauchent, la séparation est insuffisante
Si $1.4 < R_s < 1.6$ résolution optimale



Résolution entre 2 pics :

$$R_S = 2 \frac{(t_{R_2} - t_{R_1})}{q_2 + q_1}$$

avec :

t_R : temps de rétention

q : largeurs des pics à la base

Chromatographie: La résolution

La résolution R_s peut être exprimée par la relation:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) (N_2)^{1/2}$$

**l'indice 2 se rapportant au soluté le plus retenu*

On peut améliorer la résolution en jouant soit sur la sélectivité, soit sur le facteur de capacité, soit sur le nombre de plateaux théoriques.

Chromatographie:

Perte de charge et facteur de résistance à l'écoulement

La perte de charge à l'écoulement d'une colonne chromatographique est donnée par la **loi de Darcy**:

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L u}{(d_p)^2}$$

avec d_p (cm) diamètre moyen des particules,
 L (cm) longueur de la colonne,
 ΔP (Pa) perte de charge (10^{-6} bar $\approx 10^{-6}$ atm $\approx 10^{-1}$ Pa),
 u ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) vitesse linéaire de la phase mobile,
 η ($\text{Pa} \cdot \text{s}$) viscosité dynamique de la phase mobile,
 Φ (sans dimension) facteur de résistance à l'écoulement.

 La valeur de Φ dépend de la forme des particules, de la texture de la phase stationnaire et de la qualité de remplissage, $500 < \Phi < 1000$

Chromatographie: Capacité disponible

La capacité disponible C_D d'une phase stationnaire est la quantité de soluté qui provoque la saturation de la phase stationnaire. On l'exprime en nombre de millimoles de solutés par gramme de phase stationnaire:

$$C_D = \frac{Q_S}{m}$$

avec Q_S quantité de soluté fixée à l'équilibre (à saturation) par la phase stationnaire,
 m masse de phase stationnaire contenue dans la colonne.

Chromatographie: Théorie de l'élargissement des pics

L'étalement d'une bande de soluté a trois origines:

la dispersion des molécules par **diffusion longitudinale**

l'existence de chemins multiples dus au remplissage

(**diffusion turbulente, A, diffusion d'Eddy**)

la résistance au transfert de masse dans chacune des deux phases

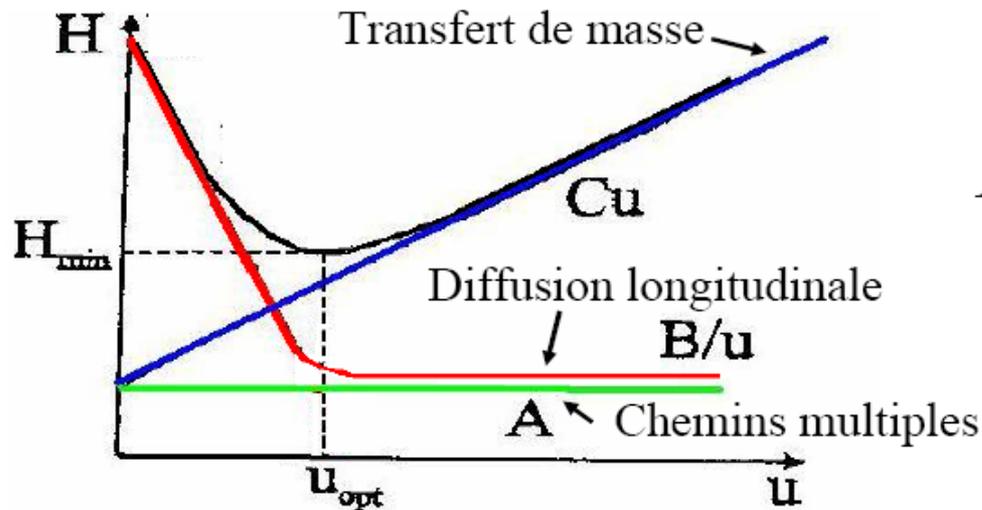
$H = A + B/u + C u$ (équation de Van Deemter)

$$H = \sum_i H_i = H_{\text{diff. long.}} + H_{\text{flux}} + H_{\text{transfert de masse}}$$

Rq: Pour que N soit grand, il faut que H soit petit ($N = L/H$)

□ Équation de van Deemter :

Équation qui lie les effets de diffusion turbulente (chemins multiples), de diffusion longitudinale et de résistance au transfert de masse à la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), et donc à l'élargissement des pics



$$H = A + \frac{B}{u_x} + Cu_x$$

u_x : vitesse linéaire, (cm/min)

Chromatographie:

Théorie de l'élargissement des pics

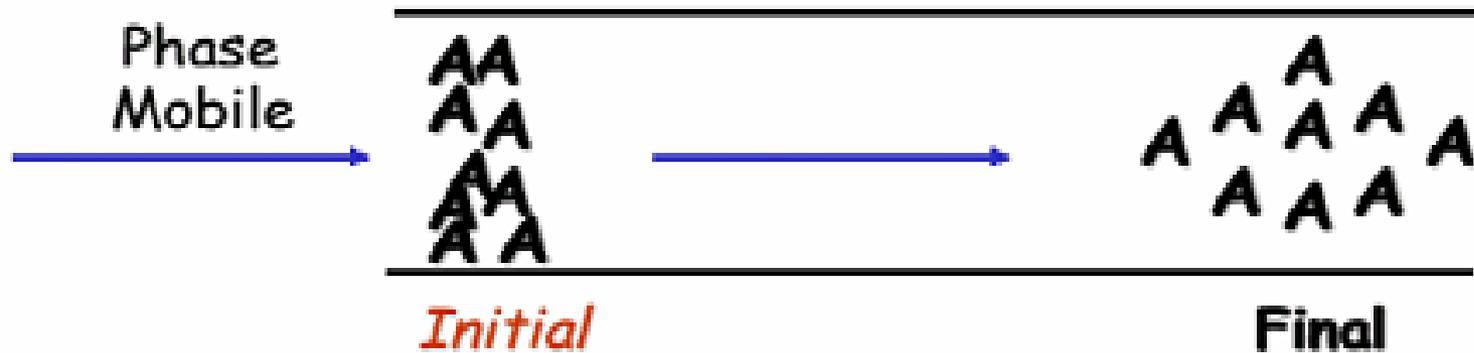
La diffusion longitudinale

La diffusion longitudinale: $h_{\text{diff. long.}} = B/u$

Elle résulte de la tendance du soluté à se déplacer dans une direction parallèle à l'axe de la colonne du centre de sa bande où sa concentration est la plus élevée vers les régions plus diluées situés en amont et en aval (c'est-à-dire dans le sens de l'écoulement et dans le sens contraire).

- ➡ c'est la cause principale de l'élargissement des pics
- ➡ Elle est d'autant plus importante que le débit de la phase mobile est faible

Diffusion longitudinale



$$\frac{B}{u} = \frac{2D_m L \gamma}{u}$$

L : longueur de la colonne

γ : facteur de tortuosité

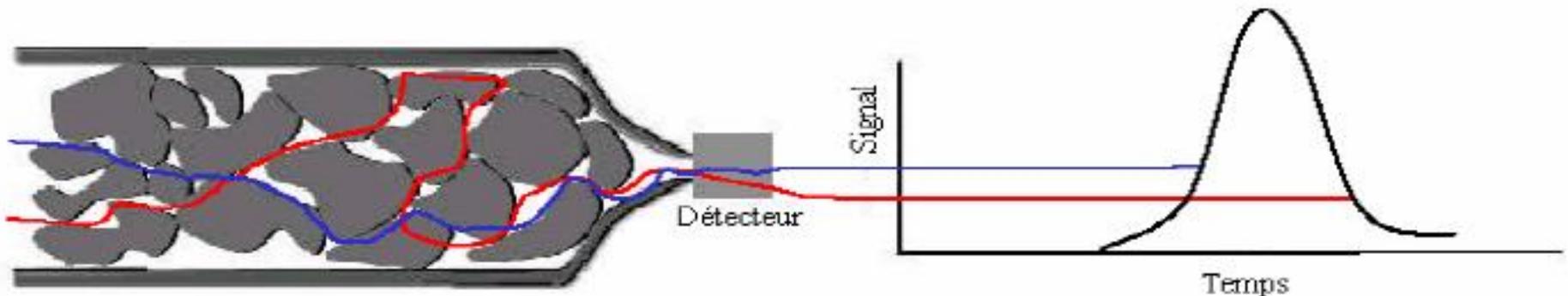
D_m : coefficient de diffusion (phase mobile)

Chromatographie:

Théorie de l'élargissement des pics

La diffusion turbulente (diffusion d'Eddy)

- L'élargissement dû à la diffusion turbulente est expliqué par le fait qu'il existe différents chemins parcourus par les molécules d'un même soluté. La longueur des chemins n'étant pas la même, elles ne mettent pas toutes le même temps pour traverser la colonne ; le pic s'élargit.



Chromatographie:

Théorie de l'élargissement des pics

La diffusion turbulente

- Ce phénomène est appelé anisotropie d'écoulement (diffusion d'Eddy) et est symbolisé par la lettre A.
- $H_{\text{turbulente}} = A$ (équation de Van Deemter)

$$A = 2L\lambda d_p$$

L : longueur de la colonne
 λ : facteur géométrique de remplissage
 d_p : diamètre des particules

- Plus la taille des particules est petite, plus l'efficacité augmente. A est donc fonction de la nature des particules et de la régularité du remplissage de la colonne A est compris entre 0.5 et 1. Si $A > 3$, mauvais remplissage.

Chromatographie:

Théorie de l'élargissement des pics

La diffusion turbulente

La diffusion turbulente est partiellement compensée par la diffusion ordinaire qui permet de faire passer les molécules d'un chemin à l'autre.

La diffusion ordinaire dépend de la vitesse de la phase mobile.

☞ Si la vitesse est faible, les molécules de solutés passent aisément d'un chemin à l'autre.

☞ Si la vitesse est élevée, la diffusion ordinaire n'a pas le temps de se faire, on observe un élargissement des pics dû aux différentes longueurs de trajets.

Chromatographie:

Théorie de l'élargissement des pics

Résistance au transfert de masse

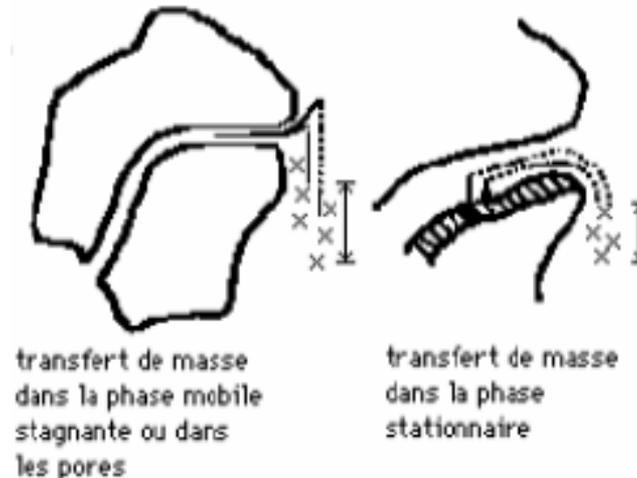
- Ce terme **C_u** représente la résistance au transfert du soluté entre les phases mobiles et stationnaires, cette résistance empêche l'établissement de l'équilibre entre **le soluté la phase stationnaire et la phase mobile**
- Il se produit aussi bien dans la phase stationnaire que dans la phase mobile

Chromatographie:

Théorie de l'élargissement des pics

Résistance au transfert de masse

- Ce phénomène est dû au fait que certaines molécules stagnent entre les grains de phase stationnaire ou dans les pores de la phase stationnaire.

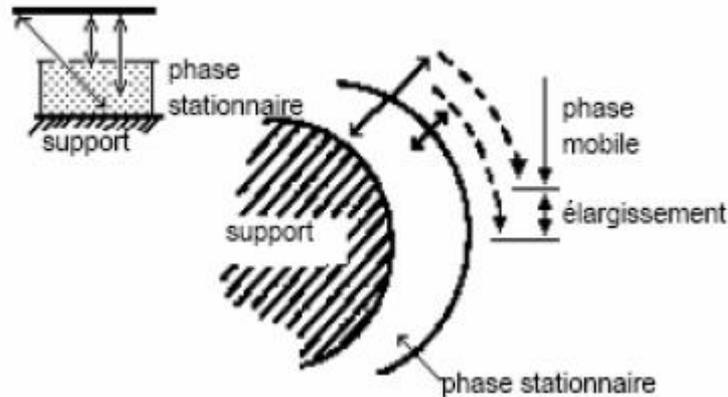


- Il faut augmenter le temps passé par le soluté au sein de la colonne (diminuer la vitesse de la phase mobile) afin d'atteindre l'équilibre

- Les pores des particules de phase stationnaire contiennent une certaine quantité de phase mobile stagnante au niveau de laquelle les solutés doivent diffuser avant de rejoindre la phase stationnaire pour s'y adsorber. Ils doivent y diffuser à nouveau pour retourner dans la phase mobile et se déplacer avec elle. Les molécules qui diffusent en profondeur dans les pores de phase stationnaire sont retardées d'avantage que les molécules de même nature qui s'adsorbent après un parcours de diffusion limité.

Chromatographie: Théorie de l'élargissement des pics Résistance au transfert de masse

- $h_{\text{transfert de masse}} = C u = (c_m + c_s) u$



Le coefficient de transfert de masse du soluté dans la phase stationnaire (C_s) et mobile (c_m)

Chromatographie:

Théorie de l'élargissement des pics

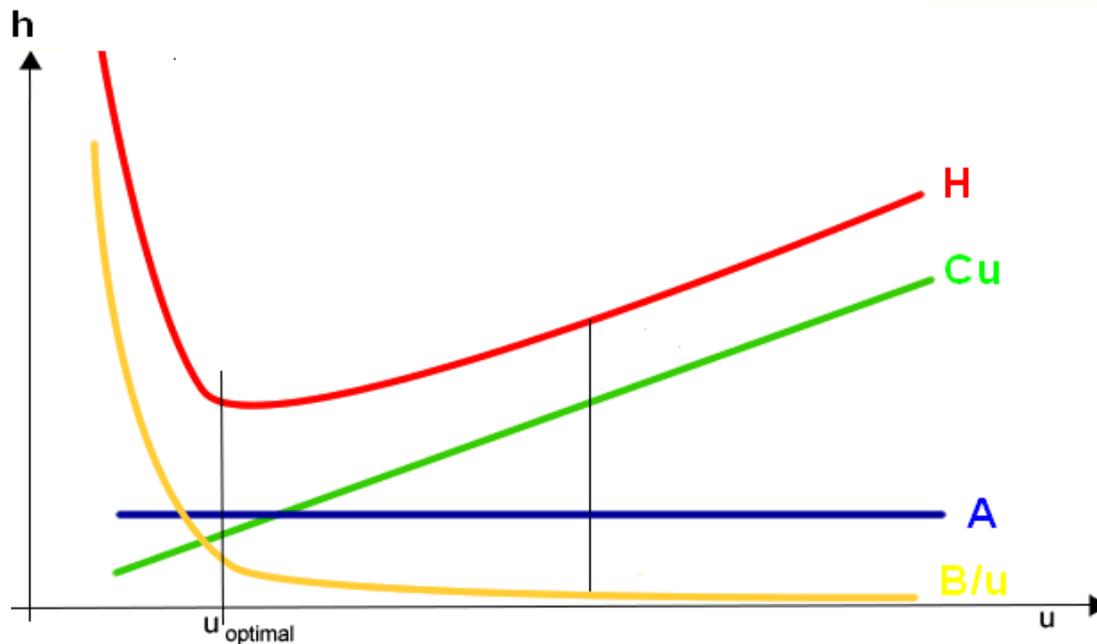
Résistance au transfert de masse

- Plus la couche de phase stationnaire est épaisse, plus long est le trajet que les molécules doivent parcourir pour atteindre l'interface.

Chromatographie:

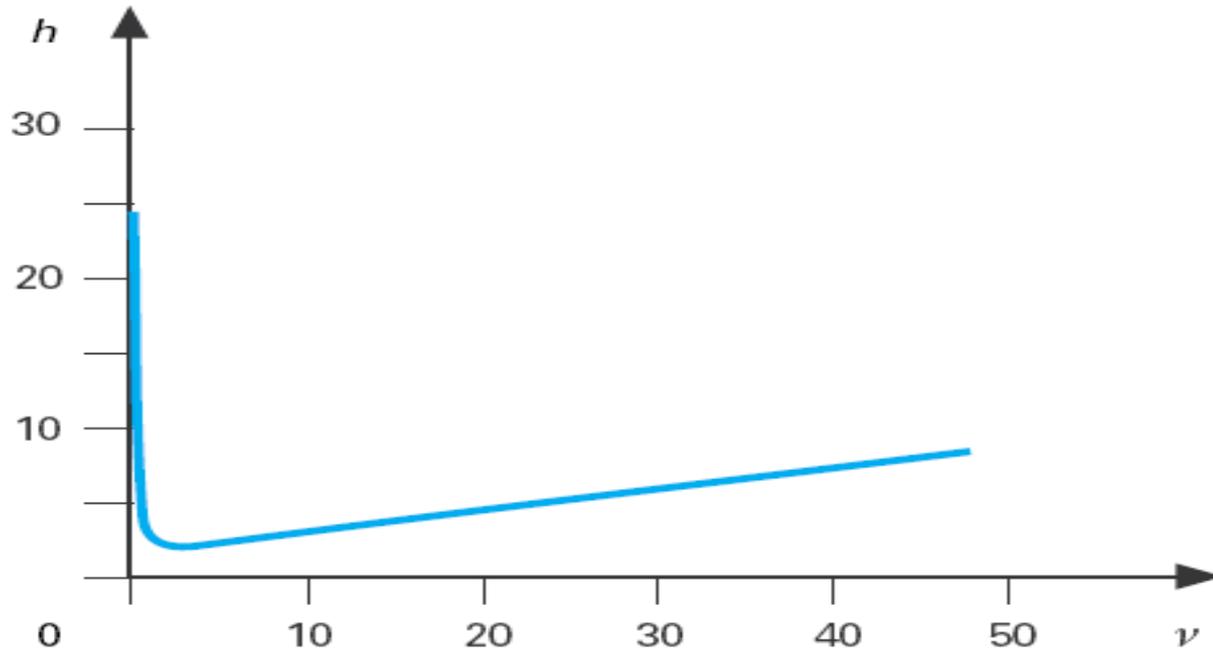
Théorie de l'élargissement des pics

- Variation de h en fonction de u



☞ Pour de faibles valeurs de u , le terme B/u prédomine et explique la perte d'efficacité vers les très faibles vitesses. Pour de grandes vitesses, le terme Cu prédomine et explique la perte d'efficacité aux très grandes vitesses. Dans la région intermédiaire c'est A qui prédomine.

Chromatographie: Théorie de l'élargissement des pics



☞ dans cette zone intermédiaire u est optimum (2.7), la valeur de H varie peu, cependant seules les valeurs de u supérieures à 2.7 (de l'ordre de 10) présentent un intérêt (cf durée de la séparation).

Chromatographie:

Théorie de l'élargissement des pics

Tous les phénomènes conduisant à un élargissement des pics sont d'autant plus importants que:

☞ Le débit de la phase mobile est rapide, il faut donc diminuer le débit de la phase mobile (débit optimum)

Pour réduire H:

☞ Il faut diminuer les distances à parcourir dans chacune des deux phases, en réduisant le diamètre des particule, l'épaisseur de la phase stationnaire

☞ Utiliser des colonnes régulièrement remplies et bien tassées

Choix du procédé chromatographique

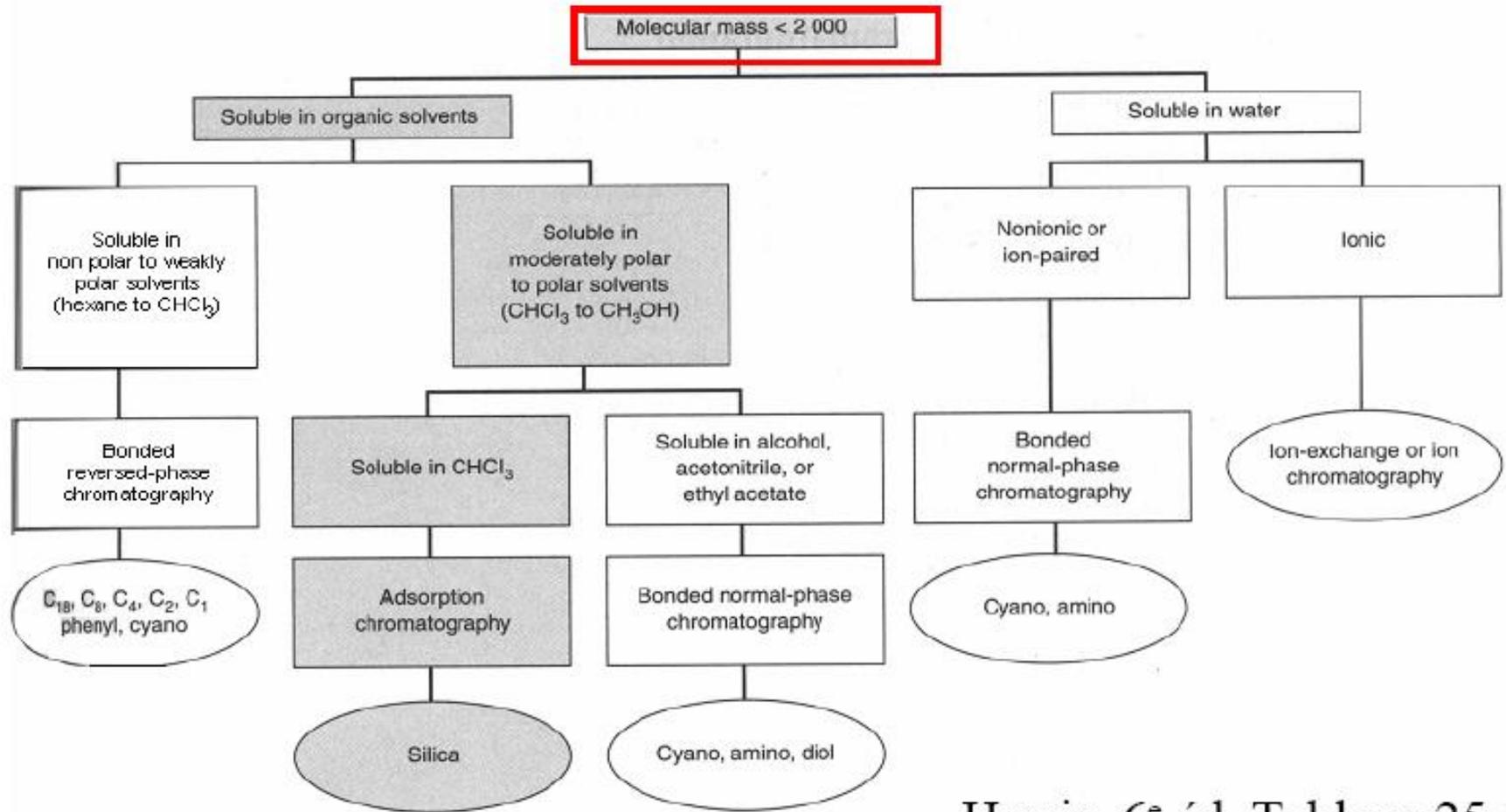
La connaissance des poids moléculaires, des polarités et des caractères ioniques des solutés va orienter le choix du procédé chromatographique à mettre en œuvre pour réaliser leur séparation.

Substance de PM > 2000 ⇒ Chromatographie d'exclusion

Substance de PM < 2000

- échantillon soluble en milieu organique ⇒ chromatographie d'adsorption (silice)
- échantillon soluble en milieux aqueux
- (si ionisable ⇒ appariement d'ions, échange d'ions), (si non ionisable ⇒ phase inverse)

Choix du procédé chromatographique



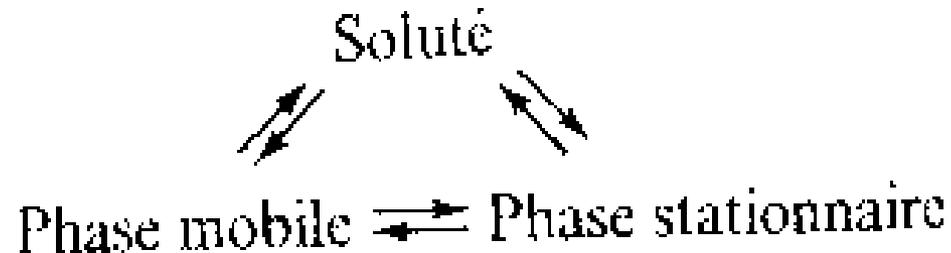
Harris, 6^e éd. Tableau 25.12

Les paramètres physico-chimiques sur lesquels reposent les principes de séparation

paramètres	type de chromatographie	domaine d'application
la charge électrique	échange d'ions	<ul style="list-style-type: none"> • protéines • polypeptides • acides aminés • acides nucléiques • sucres
la taille et la forme (en fait, le volume)	exclusion ou gel de filtration	<ul style="list-style-type: none"> • protéines • polypeptides • acides nucléiques • sucres • lipides
l'existence de structures particulières qui permettent d'établir des liaisons spécifiques	affinité	<ul style="list-style-type: none"> • protéines
la polarité et/ou l'hydrophobicité	<p>polarité de phase inversée</p> <p>ou phase reverse</p>	<ul style="list-style-type: none"> • protéines • polypeptides • acides aminés • acides nucléiques • sucres • acides gras
	interactions hydrophobes	<ul style="list-style-type: none"> • protéines

Les interactions mises en jeu en chromatographie

Quelque soit le mode chromatographique (adsorption, partage, échange d'ions), à l'exception de la chromatographie d'exclusion, la rétention d'un soluté résulte de trois interactions



interactions soluté/phase stationnaire

interactions soluté/phase mobile

interactions phase mobile/phase stationnaire

Les différents types de liaisons

Les interactions diélectriques ou ioniques :

Ces interactions sont relativement fortes. Les forces entre les ions de même charge sont répulsives. Elles sont attractives entre les ions de charge opposée. Ces effets sont très importants en chromatographie ionique.

Les liaisons hydrogène :

Elles peuvent se former entre un atome d'H et (un oxygène, un fluor et un azote). Ces liaisons sont relativement fortes mais moins fortes qu'une liaison covalente ou ionique.



Les différents types de liaisons

Les forces de VAN DER WAALS:

Trois autres types de forces interviennent dans la polarité d'une molécule. Elles sont connues sous le nom de forces de Van der Waals. Ce sont les forces de LONDON, de DEBYE et de KEESOM. Ce sont des forces relativement faibles, comparées aux forces de la liaison hydrogène ou aux interactions diélectriques.

Notion de polarité

Ces **cinq forces** jouent un rôle fondamental lors des interactions entre molécules. Plus la molécule est capable d'agir par l'intermédiaire de ces forces, plus la molécule est **polaire**.

Règle utilisée en chromatographie:

Qui se ressemble s'assemble
(entre soluté et phase stationnaire)

Notion de polarité

- Si la phase stationnaire est **polaire**, les **composés polaires** seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est **apolaire**, les **composés apolaires** seront plus retenus que les composés polaires.

Notion de polarité

De manière pratique, on utilise la notion de polarité comme une donnée comparative entre molécules.

On dit que tel composé est plus polaire qu'un autre.

hydrocarbure aliphatiques < alcènes < hydrocarbures aromatiques < halogénures < éthers < ester-aldéhydes-cétones < alcools-amines < amides < acides carboxyliques < eau.

Notion de polarité

Chaque séparation nécessite une polarité de phase mobile (force éluante) bien définie.

Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en mélangeant plusieurs solvants miscibles.

- **mode isocratique** (la force éluante du solvant est constante durant toute la durée de l'analyse), solutés de polarité voisine
- **mode gradient** (on fait varier la force éluante du solvant au cours de l'analyse), solutés de polarité très différente

LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

*Chromatographie d'exclusion stérique encore appelé **filtration sur gel** lorsque la **phase mobile est aqueuse** et **perméation de gel** si la **phase mobile est organique**.*

Technique introduite en 1950 par les biologistes pour caractériser les molécules d'intérêt biologique (ex: protéines).

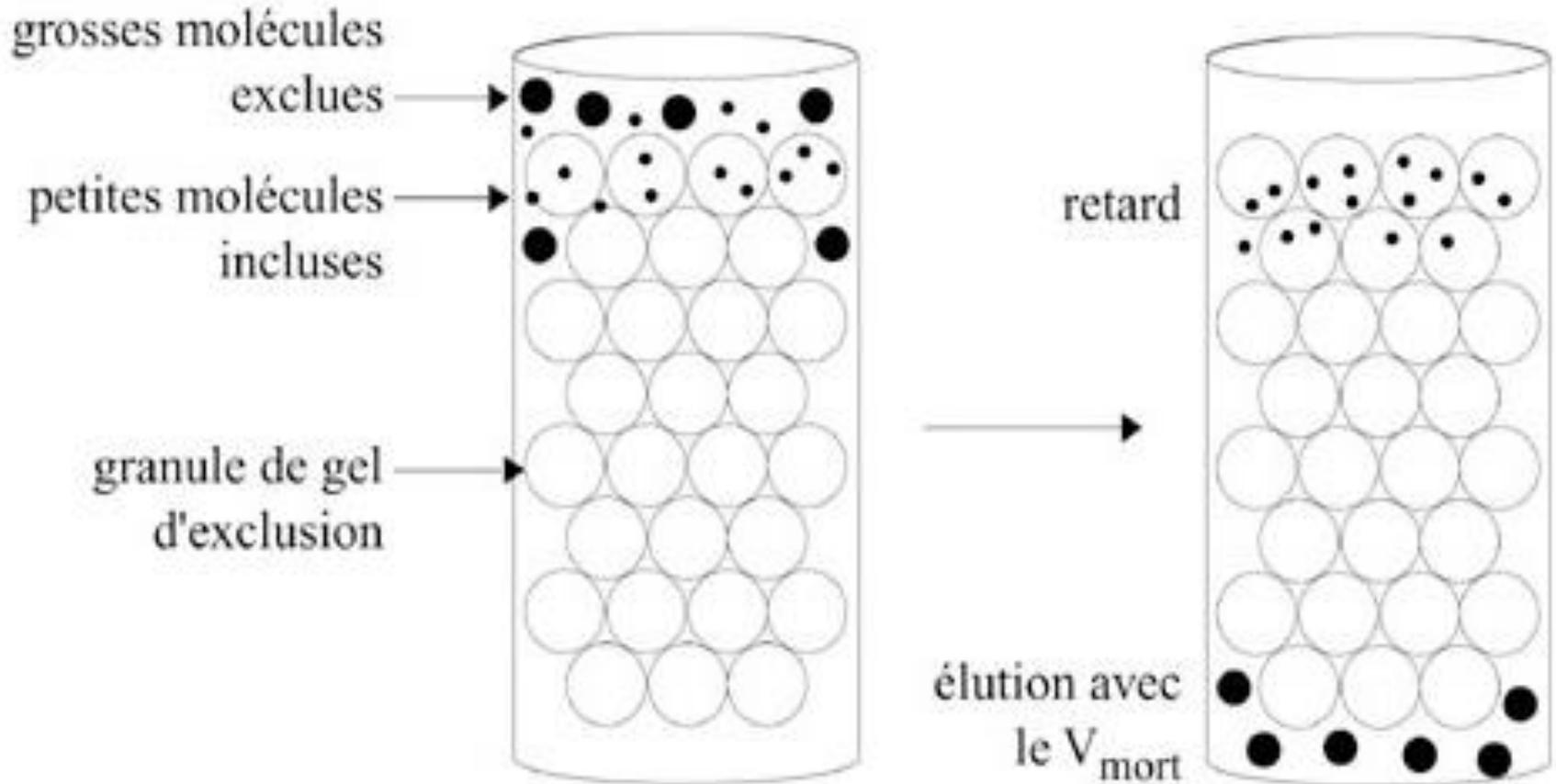
CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- Cette technique a pour objectif de séparer les molécules suivant leur taille.
- Il n'y a pas d'interaction entre la phase mobile et la phase stationnaire.
- La phase stationnaire est constituée de billes poreuses gonflées par la phase mobile. L'ensemble constitue un gel (réseau tridimensionnel).

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- Les molécules **selon leur taille** diffusent à l'intérieur des pores des grains ou en sont exclues.
- **Les grosses molécules migrent très rapidement. Les petites molécules pénètrent à l'intérieur des pores et sont éluées plus lentement.**

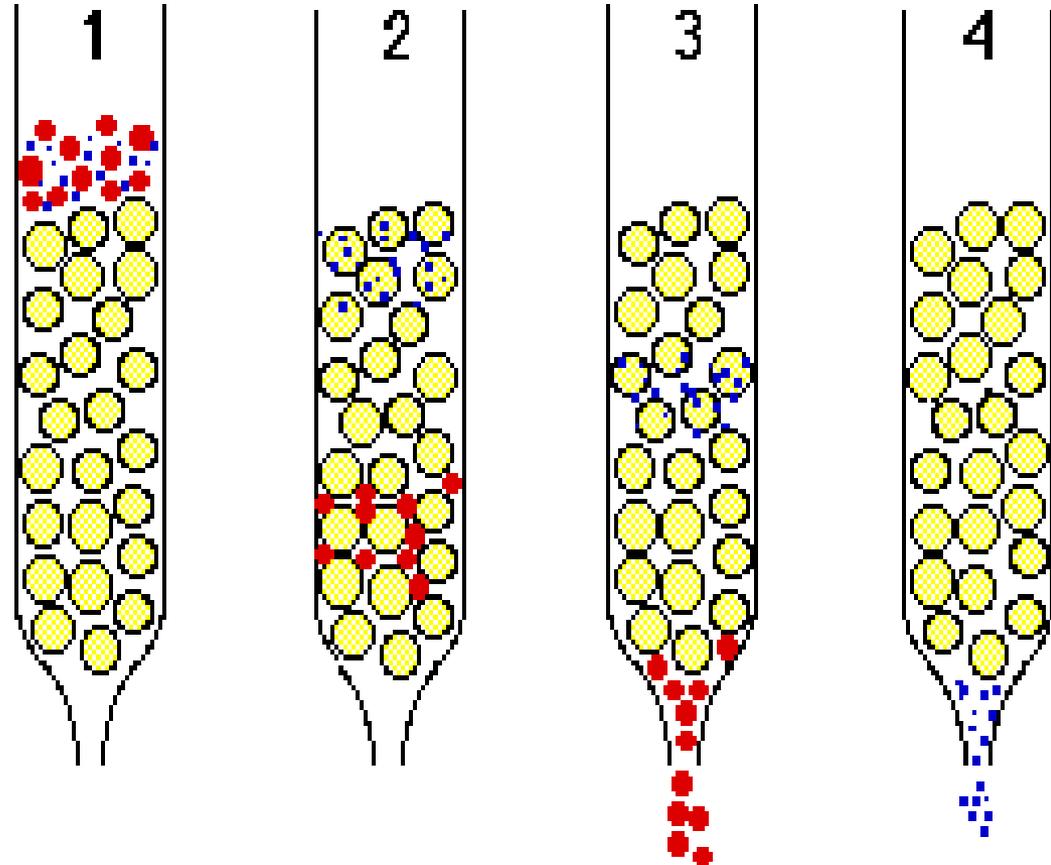
CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

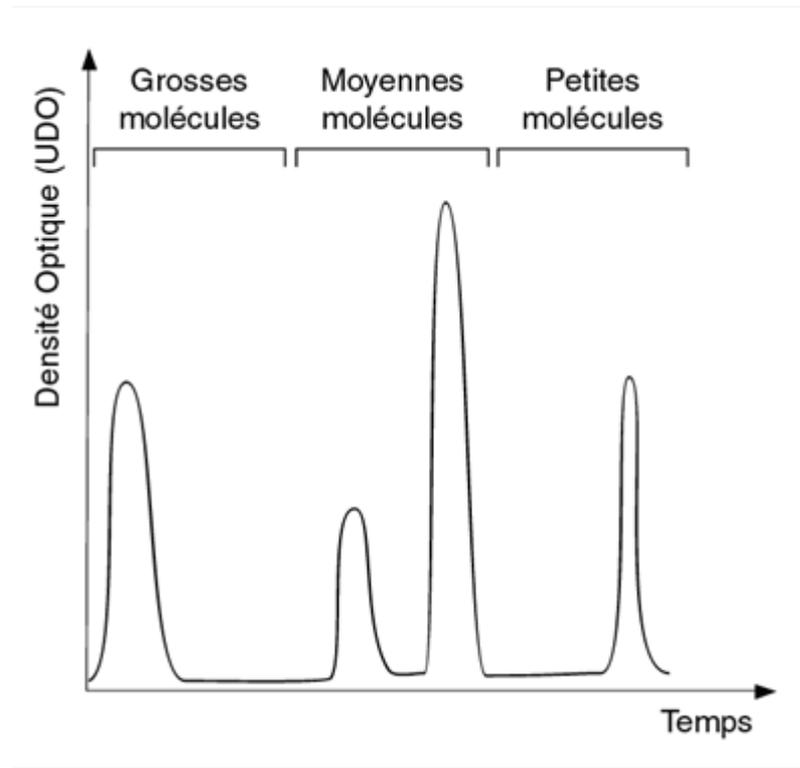
Mélange de molécules
de tailles différentes →

Colonne remplie de
billes de porosité
contrôlée (Séphadex) →



CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.



CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- La chromatographie d'exclusion constitue un outil de choix pour appréhender **la masse moléculaire des solutés**
- Suivant les gels, le diamètre des pores est compris entre quelques dizaines et quelques milliers d'Angströms ($1\text{\AA} = 10^{-10}\text{m}$)

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Etude théorique et différents paramètres:

Coefficient de diffusion:

La répartition d'une substance entre deux phases est régie pour un gel donné par une constante K_d qui est le coefficient de diffusion.

$$K_d = C_s / C_m$$

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

C_s = concentration de la substance dans la phase *intra granulaire* considérée comme *phase stationnaire*.

C_m = concentration de la même substance dans le liquide *extra-granulaire* considéré comme *phase mobile*. **$0 < K_d < 1$**

Si les molécules sont totalement exclues de la phase stationnaire **$C_s = 0$ donc $K_d = 0$**

Si les molécules diffusent parfaitement, elles se répartissent de manière identique entre les deux phases : **$C_s = C_m$, donc $K_d = 1$**

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Volume de rétention ou volume d'élution:

$$V_M = V_i + V_p$$

V_M = volume de phase mobile dans la colonne

V_i = volume interstitiel (volume situé à l'extérieur des pores)

V_p = volume situé dans les pores.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Donc V_i représente le volume de phase mobile nécessaire pour transporter une grosse molécule exclue des pores

$V_M = V_i + V_p$ le volume de phase mobile pour une petite molécule ayant pu rentrer dans tous les pores.

Le volume de rétention V_R pour une molécule X de taille intermédiaire :

$$V_R = V_i + K V_p$$

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Il y a deux cas limites :

$K=0$ (grosses molécules, exclues des pores)

$V_R = V_i$ (V_i est appelé volume d'exclusion totale)

V_i est déterminé en injectant une substance de masse moléculaire suffisamment grande (ex: sulfate de dextrane ou DNA)

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

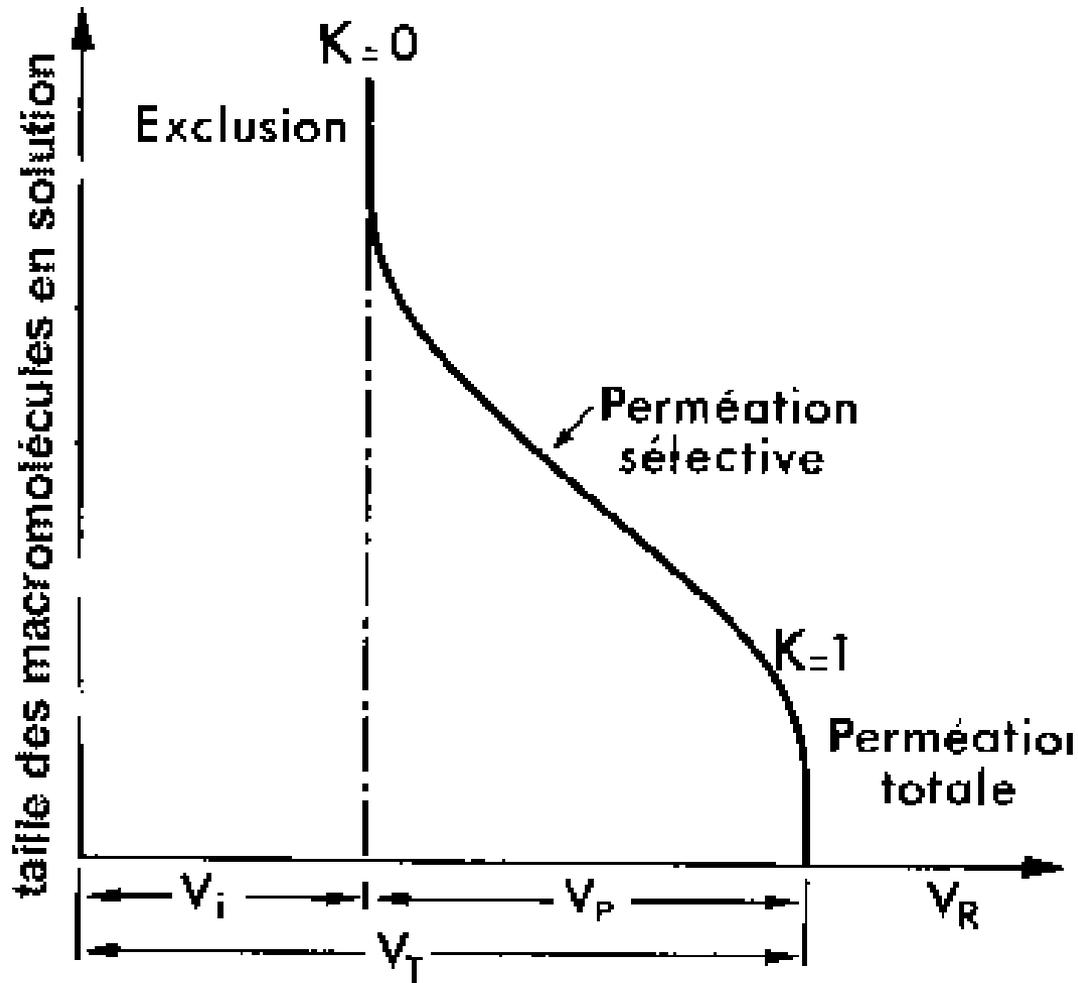
K=1 (petite molécule)

Tous les pores de la phase fixe sont accessibles aux molécules considérées:

$$V_R = V_i + V_p = V_T$$

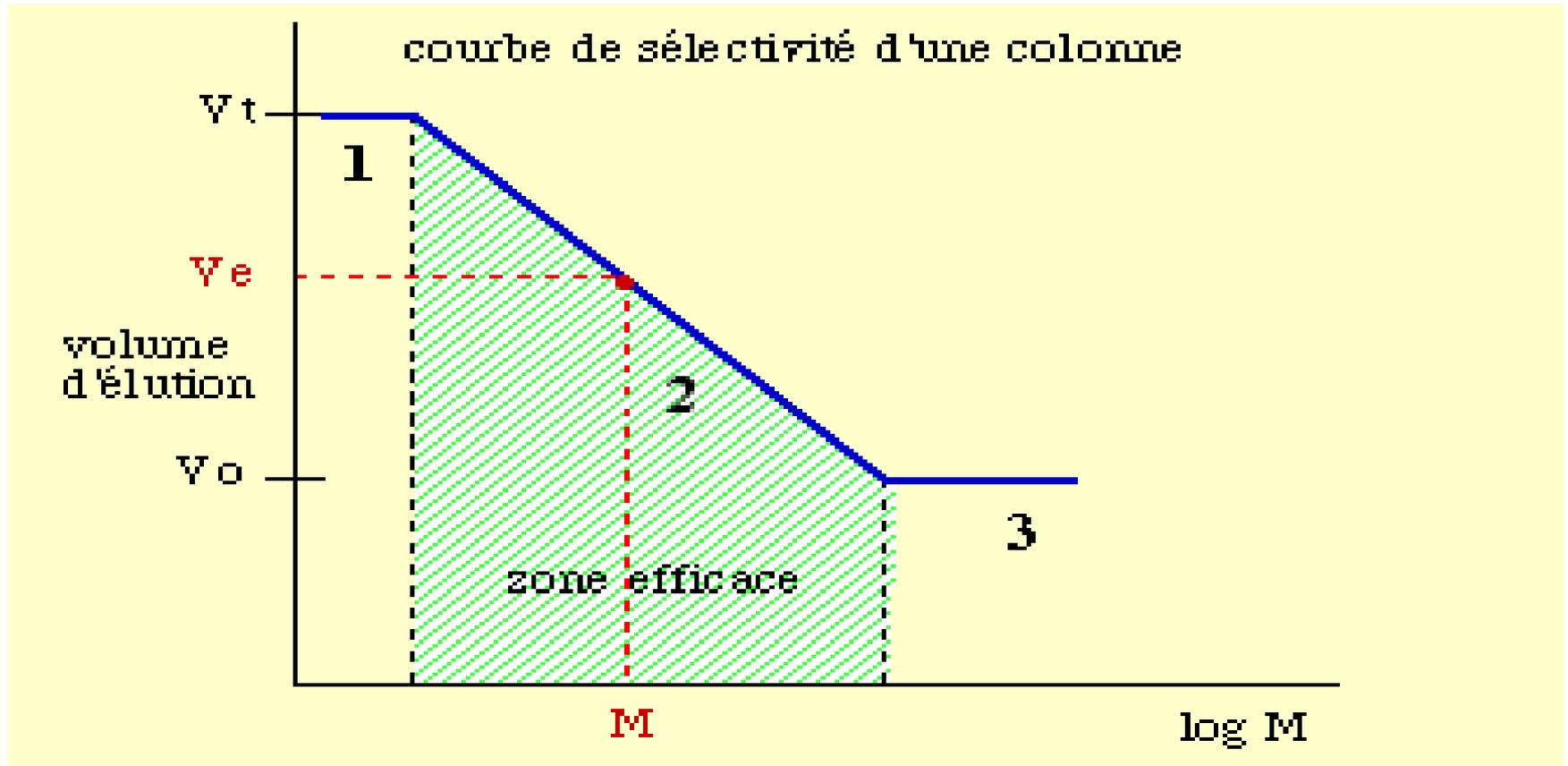
(V_T est appelé volume de perméation totale), il est déterminé en injectant une molécule de faible masse (ex : D_2O)

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



La courbe obtenue présente généralement une partie linéaire

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



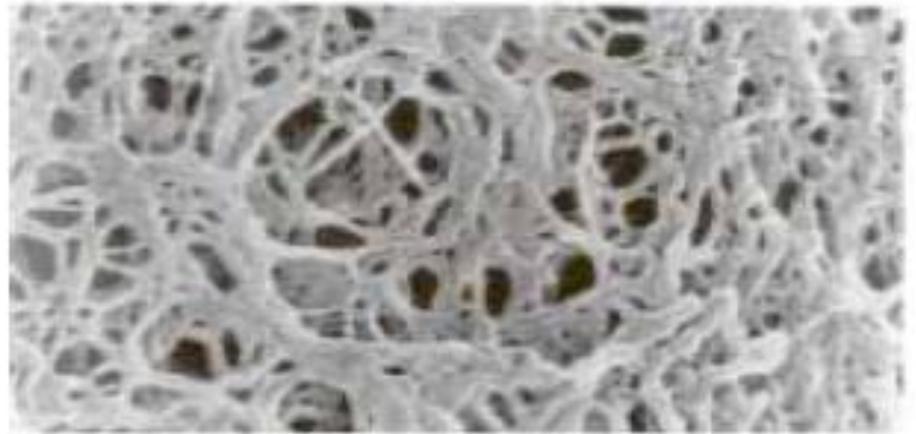
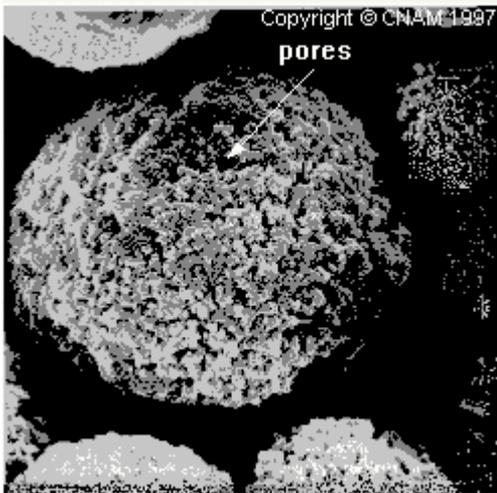
A chaque valeur du volume de rétention correspond une taille de particule donc une masse moléculaire .

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- Remarque: Si $V_R > V_T$ cela implique que $K > 1$ c'est à dire pas de la chromatographie d'exclusion pure mais (autre phénomène ex: adsorption, des interactions hydrophobes ou de l'échange d'ions).
- En général, on recherche des phases stationnaires pour lesquelles ces rétentions secondaires sont aussi faibles que possible.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- La phase stationnaire



Structure de polyacrylamide

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Les phases stationnaires utilisées sont soit:

- en milieu organique des gels hydrophobes
- en milieu aqueux des gels hydrophiles

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Les gels peuvent varier selon :

le diamètre des pores: il est soigneusement défini. Les gels sont plus ou moins poreux selon leur capacité de gonflement;

La capacité de gonflement est la **quantité de solvant capable d'être absorbée par gramme de gel sec.**

Elle s'exprime par un chiffre d'autant plus élevé que les pores sont plus grands.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

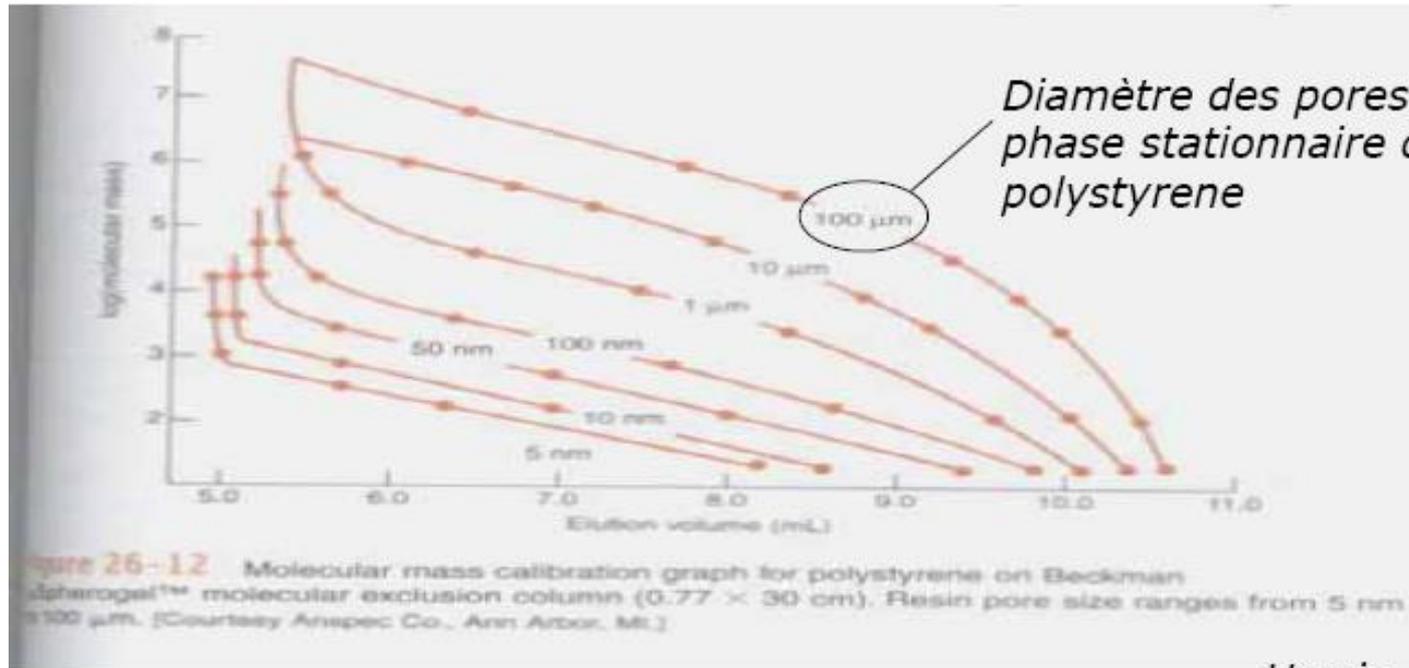
Exemple : *Sephadex G10* a des pores très étroits, il n'absorbe que 1 ml d'eau par gramme de gel sec, alors que le *Sephadex G200* dont les pores sont plus grands absorbe 20 ml.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

La taille et la forme des particules: Il s'agit de petites perles de forme sphérique dont le diamètre peut varier de **40 à 120 μm** , pour les *gels Sephadex*, de **60 à 300 μm** pour les *gels d'Agarose*.

Mais en chromatographie haute performance ou en chromatographie sur couche mince, **les tailles sont plus réduites (20 à 80 μ)**.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



Harris, 6^e Ed. p. 653

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

La consistance:

- **les gels mous** : structures faiblement réticulées et capables d'absorber dans leurs pores de grandes quantités de solvant. inconvénient: Ils se déforment sous leur propre poids et sous l'effet des vitesses élevées des éluants
- **les gels semi-rigides**: les plus utilisés
- **les gels rigides** sont utilisés lorsqu'on désire opérer avec des débits élevés ou sous fortes pressions

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Inertie :

Les gels ne doivent pas réagir avec les solvants

Affinité des gels pour les substances dissoutes :

Elle doit être extrêmement réduite afin d'éviter les phénomènes d'adsorption qui se superposeraient aux phénomènes de diffusion

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- Exemple de gels commercialisés:

<i>P.M. séparés</i>		<i>P.M. séparés</i>	
<i>Sephadex</i>		<i>Agarose</i>	
G 10	jusqu'à 700	10 %	10.000 à 250.000
G 15	jusqu'à 1.500	8 %	25.000 à 700.000
G 25	100 à 5.000	6 %	50.000 à 2.000.000
G 50	500 à 10.000	4 %	200.000 à 15.000.000
G 75	3.000 à 70.000	2 %	500.000 à 150.000.000
G 100	4.000 à 150.000		
G 150	5.000 à 400.000		
G 200	5.000 à 800.000		
<i>Biogel</i>		<i>Styragel</i>	
P-2	200 à 2.000	60	800
P-4	500 à 4.000	100	2.000
P-6	1.000 à 5.000	400	8.000
P-10	5.000 à 17.000	1×10^3	20.000
P-30	20.000 à 50.000	5×10^3	100.000
P-60	30.000 à 70.000	10×10^3	200.000
P-100	40.000 à 100.000	30×10^3	600.000
P-150	50.000 à 150.000	1×10^5	2.000.000
P-200	80.000 à 300.000	3×10^5	6.000.000
P-300	100.000 à 400.000	5×10^5	10.000.000
		10×10^5	20.000.000

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

La phase mobile doit:

- dissoudre l'échantillon
- gonfler le gel
- être compatible avec le système de détection (le réfractomètre différentiel).

Exemple de solvants utilisés : chloroforme, Diméthylformamide, tétrahydrofuranne, toluène...
eau et solution tampon)

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Remarque:

En chromatographie d'exclusion, on travaille souvent à des températures supérieures à la température ordinaire, car la solubilité des macromolécules est souvent faible et la viscosité des solutions élevée.

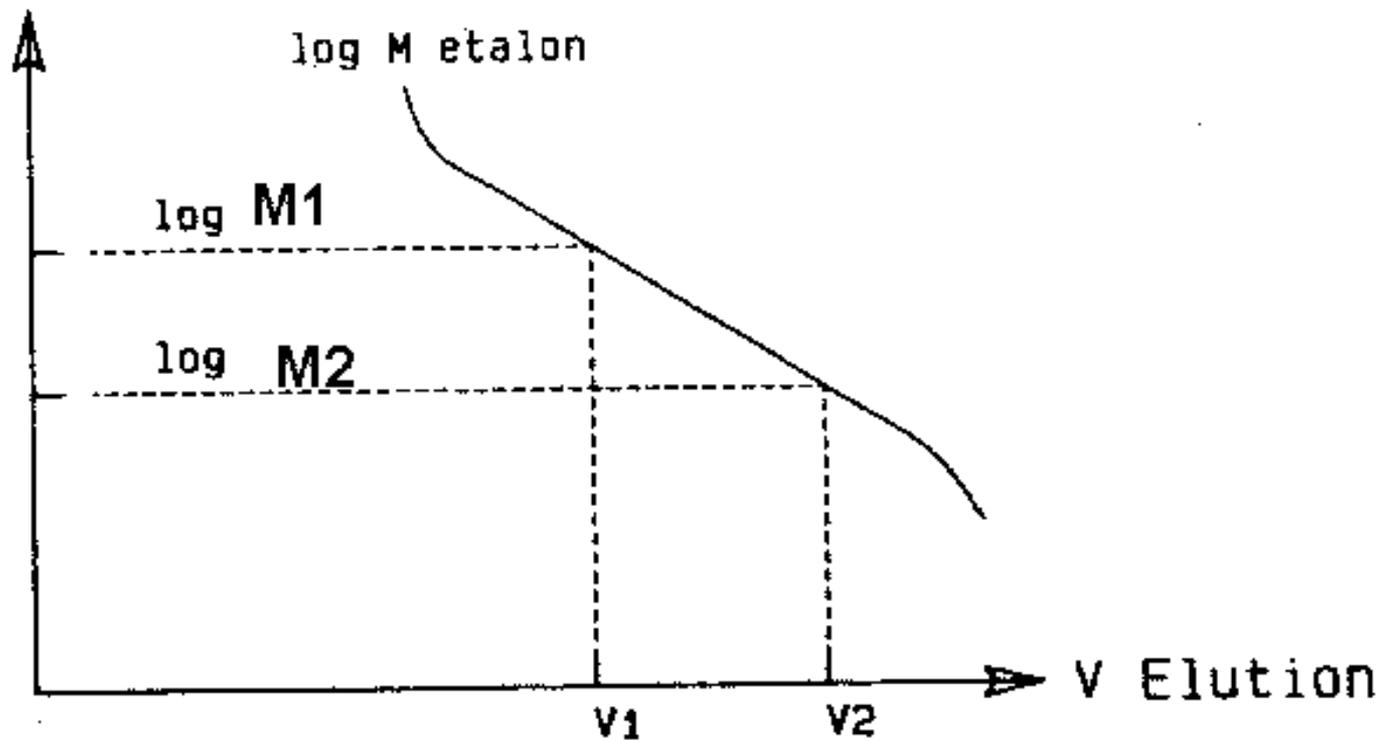
CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Étalonnage:

L'étalonnage est fait lors de la mise en route d'une nouvelle colonne ou lorsque les caractéristiques de la colonne ont évolué.

On injecte un étalon de masse moléculaire M_1 , il sera élué au volume V_1 . On reprend l'opération avec un second étalon de masse M_2 . L'étalon sera élué au volume V_2 , et ainsi de suite... On obtient ainsi la courbe d'étalonnage.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Les étalons utilisés:

Ces étalons sont en général des polymères à distribution très étroite. Les étalons commercialisés couvrent une plage allant de 100 à 10^7 Daltons.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Remarque: La calibration peut être indispensable

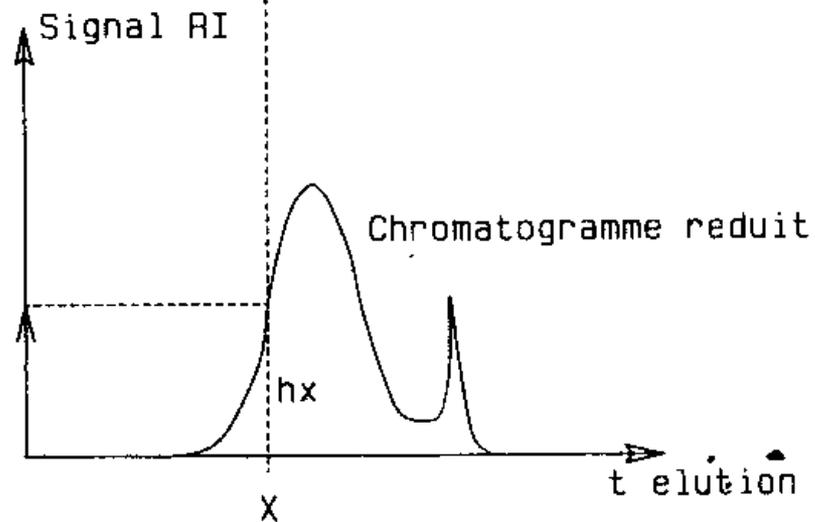
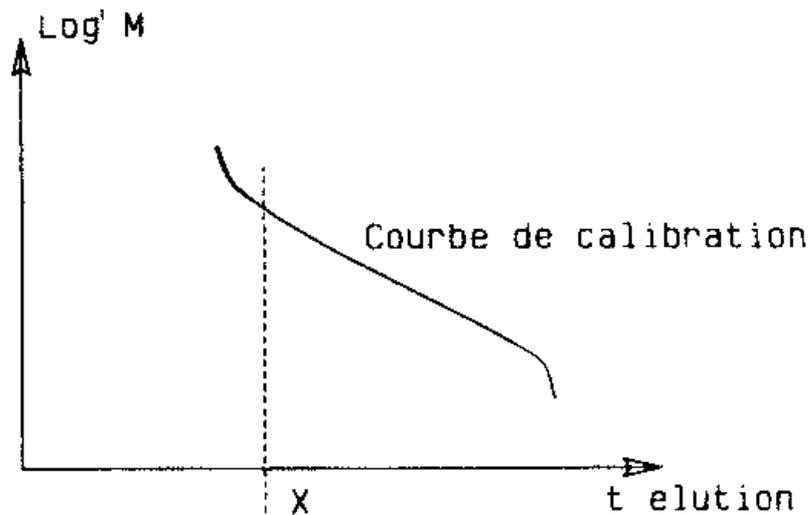
Une molécule de polysaccharide est beaucoup plus allongée et plane qu'une protéine de masse identique, qui est généralement globulaire et relativement compacte.

Il faut donc calibrer les colonnes avec le même type de molécule que les inconnues dont on veut déterminer la masse.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- A partir du chromatogramme et de la courbe de calibration, il est possible de déterminer la masse de macromolécules.
- A un temps d'élution X correspond une masse M_x .

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Dans le cas d'un échantillon contenant plusieurs espèces ayant des masses moléculaires très différentes, il est nécessaire d'utiliser plusieurs colonnes en série dont chacune contient une phase dont la limite d'exclusion est différente.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Exemple : Soit un mélange de quatre échantillons de polystyrène, de masses moléculaires : 4500, 91800, $1.8 \cdot 10^6$ et $3 \cdot 10^6$ daltons. On dispose de différents colonnes dont les domaines de masses moléculaires sont les suivants:

$$A : 7 \cdot 10^4 - 4 \cdot 10^5$$

$$B : 10^5 - 1.2 \cdot 10^6$$

$$C : 10^6 - 4 \cdot 10^6$$

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- Il suffira d'utiliser deux colonnes en série, l'une remplie de phase A, l'autre de phase C.
- Sur la première, les polystyrènes $1.8 \cdot 10^6$ et $3 \cdot 10^6$ sont exclus alors qu'ils seront séparés sur la colonne C. Le polystyrène 91800 sera retenu sur la colonne A mais moins que celui de masse moléculaire 4500 qui sera élué au volume de perméation totale d'où le chromatogramme

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

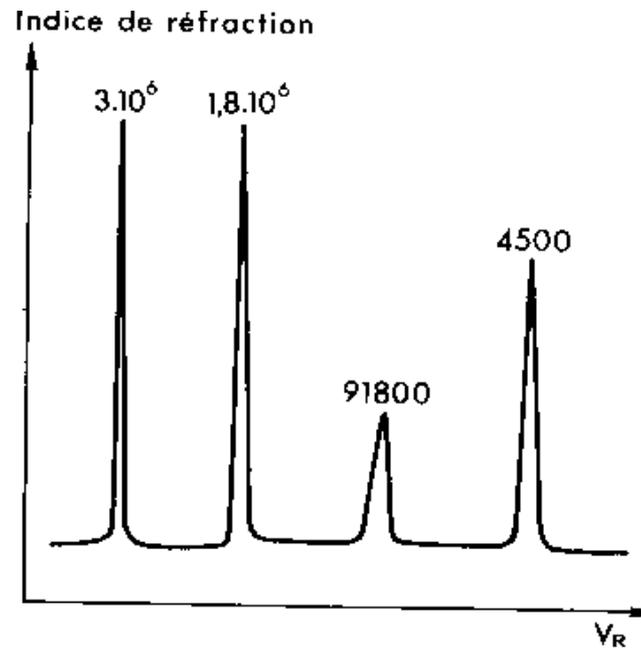


Figure 5 Séparation par chromatographie d'exclusion de polystyrènes. Les masses moléculaires sont indiquées sur chaque pic.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- *Applications:*
 - **Purification** de protéines, peptides, polysaccharides, hormones, cofacteurs, acides nucléiques...
 - Détermination **de masse moléculaire**
 - **Dessalage**
 - **Concentration** des substances de hauts poids moléculaire

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Dessalage

On se sert de cette technique pour éliminer des contaminants (sels, détergents, etc.) d'une préparation. Cette approche peut avantageusement remplacer la dialyse.

Exemple: on peut produire du lait sans lactose, pour les personnes intolérantes à ce produit, en dessalant du lait.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Détermination du poids moléculaire

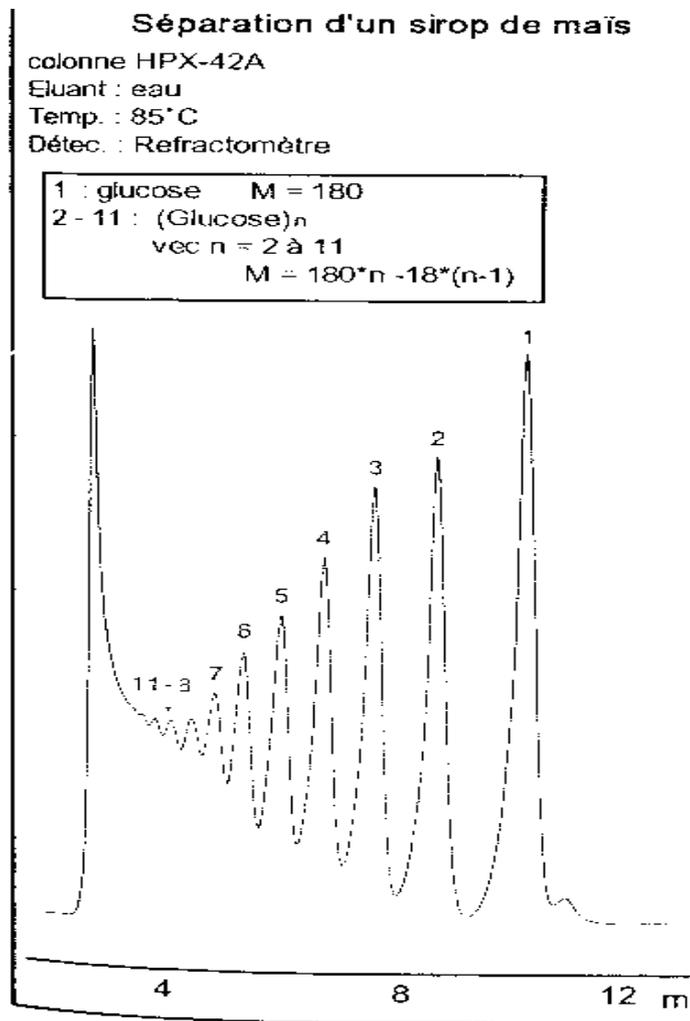
Les gels de filtration sur gel sont abondamment utilisés en biochimie pour déterminer le poids moléculaire des protéines. Cette technique est généralement très fiable même si elle est relativement simple d'exécution. Elle nécessite évidemment l'emploi d'une colonne de gel de haute qualité et très soigneusement calibrée.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Purification de protéines

Comme toutes les chromatographies, la filtration sur gel peut servir comme une étape de la purification d'une protéine. Les filtrations sur gel sont souvent la dernière étape d'une purification de protéines car, pour être efficaces, elles nécessitent une préparation relativement "propre" ayant un petit volume.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



Exemple d'application :
séparation d'un sirop de maïs

Chromatographie d'adsorption

Généralités



ABSORPTION



ADSORPTION

Chromatographie d'adsorption

Généralités

- ☞ La plus ancienne des méthodes chromatographiques
- ☞ Les phases stationnaires ont des propriétés adsorbantes (gels de silice et d'alumine)
- ☞ Chromatographie liquide-solide
- ☞ Molécules comportant des groupements polaires (exemples: lipides, pigments, médicaments, oses et oligosides, acides aminés et oligopeptides...) et les isomères de position
- ☞ Molécules solubles en milieu organique

Chromatographie d'adsorption

les phases stationnaires

Les adsorbants les plus utilisés:

- ☞ silice SiO_2
- ☞ gel de silice (silice hydratée 4% d'eau)
- ☞ Alumine Al_2O_3 ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n \text{H}_2\text{O}$)

Autres types d'adsorbants:

Papier, cellulose, Carbonate de sodium, Oxyde de magnésium, Charbon activé

Chromatographie d'adsorption

les phases stationnaires

Caractéristiques des adsorbants:

- doivent être insolubles dans les solvants (phase mobile) utilisés.
- Inertie chimique vis-à-vis des substances à chromatographier.
- surface spécifique importante (comprise entre 200 et 600 m² g⁻¹)

Chromatographie d'adsorption

la surface spécifique

- La surface spécifique S_p d'un solide poreux est égale à la somme des **surfaces externes S_e** et **interne S_i** .
- On peut négliger la surface externe des particules devant la surface interne des pores de la phase stationnaire.
- Le volume de phase mobile adsorbée est proportionnel à la surface spécifique du support.

Chromatographie d'adsorption la surface spécifique

D'une façon générale, plus la surface spécifique d'un adsorbant est grande, plus le soluté est retenu. **La S_p augmente** quand le diamètre des pores diminue.

Il peut être intéressant de disposer d'un support ayant une **grande surface spécifique**, pour **diminuer la longueur des colonnes chromatographiques**. Cela peut permettre **d'améliorer la résolution d'une séparation**.

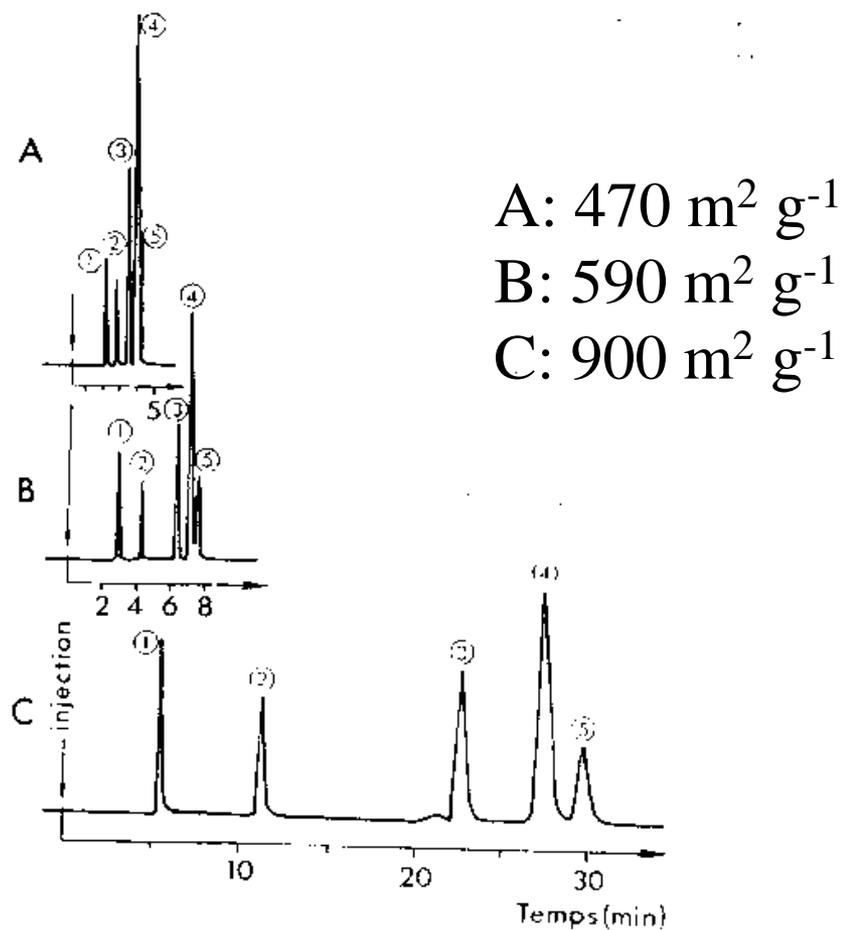


FIG. VI. 1. — Influence de la surface spécifique d'une silice Spherosil sur la séparation d'un mélange d'hydrocarbures aromatiques.

Colonne : longueur, 10 cm ; diamètre intérieur, 4 mm. Phase stationnaire : silice de type Spherosil expérimental de $5,6 \mu\text{m}$ et de surfaces spécifiques variées :

A : $470 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; B : $590 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; C : $900 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$

Phase mobile : hexane sec. Débit : $0,9 \text{ ml min}^{-1}$. Température : ambiante. Échantillon : nature des solutés : 1 : toluène ; 2 : naphthalène ; 3 : biphenyle ; 4 : anthracène ; 5 : phenanthrene (d'après [5]).

Chromatographie d'adsorption

la surface spécifique

- Une faible surface spécifique est préférable pour les solutés ayant une forte énergie d'adsorption.
- Une grande surface spécifique convient mieux pour des solutés ayant une faible énergie d'adsorption.
- Une diminution des pores induit une augmentation de la surface spécifique et une augmentation des silanols liés au dépend des silanols libres.

Chromatographie d'adsorption

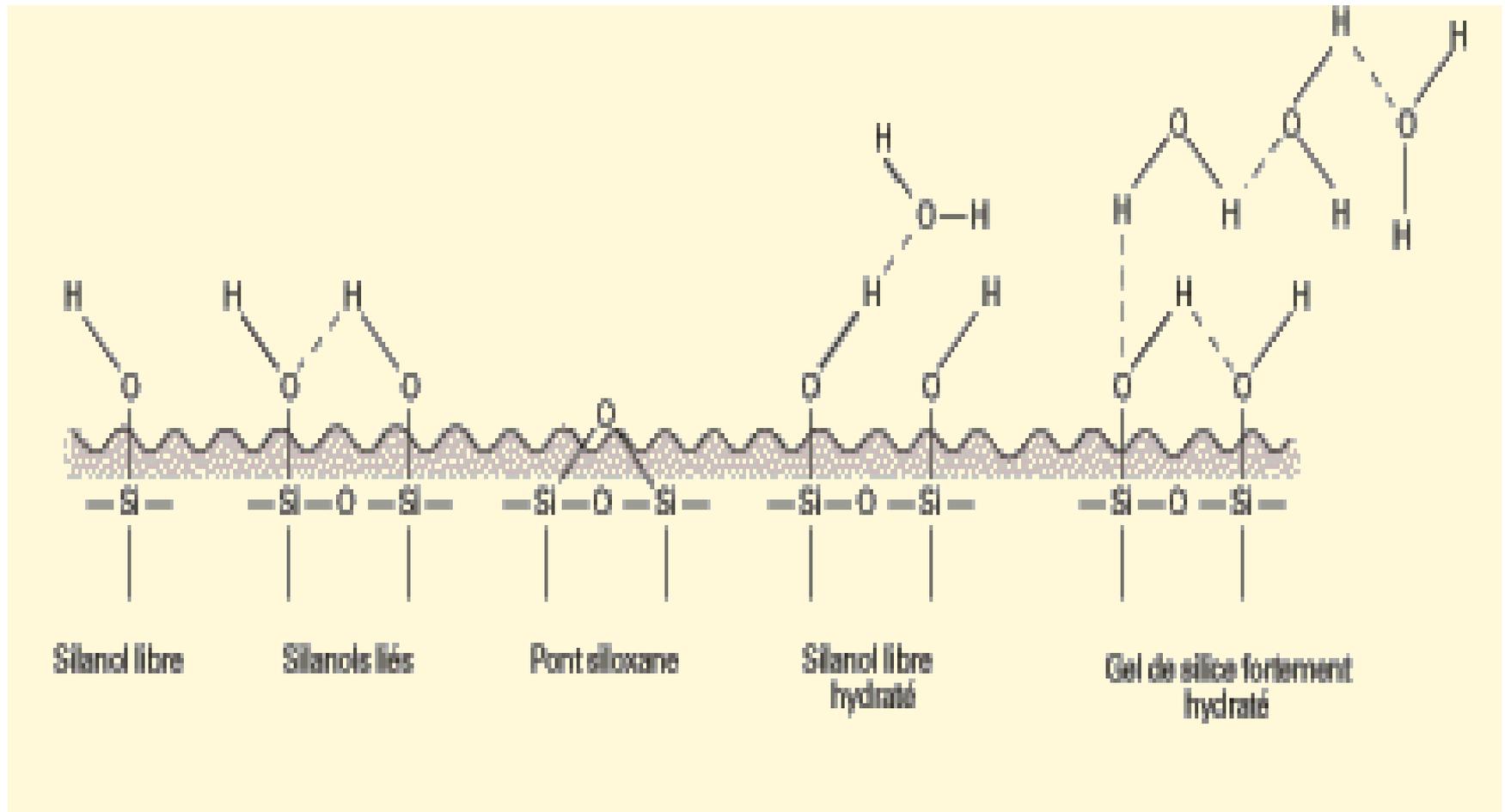
la surface spécifique

Tableau 3 – Variation du nombre de sites OH libres en fonction de la surface spécifique du support [19]

Nature du support	Surface spécifique ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Nombre total de sites OH par nm^2	Nombre de sites libres par nm^2 (OH libres)
Lichrosorb Si 100..	309	4,6	2,95
Partisil 5.....	412	4,6	2,80
Lichrosorb Si 60....	482	4,6	2,20

Chromatographie d'adsorption

Schéma simplifié de la surface d'un gel de silice



Chromatographie d'adsorption

Les phases stationnaires

- ☞ Ce sont les groupements silanols qui confèrent à la silice ses propriétés adsorbantes.
- ☞ D'un point de vue chromatographique, trois types de sites participent (à des degrés divers) au mécanisme de rétention.
 - les groupements silanols libres SiOH
 - les silanols liés par liaison hydrogène
 - les silanols libres recouverts par une mol d'eau
 - les groupements siloxane

Chromatographie d'adsorption

Les phases stationnaires



La silice est un support polaire, caractère acide. Il retient donc fortement les composés à caractère basique. Ses sites acides pourront être partiellement masqués en les traitant par une base, soude ou potasse, ou en incorporant aux éluants de petites proportions d'amines ou d'ammoniac.

Chromatographie d'adsorption

Les phases stationnaires

- ➡ La solubilité de la silice dépend peu du pH entre 2 et 8, mais elle augmente rapidement en milieu basique. On ne peut donc pas utiliser des phases mobiles dont le pH est $>$ à 7.5
- ➡ Les mécanismes d'adsorption varient avec la nature des silanols (selon qu'ils sont libres ou liés)
- ➡ La capacité d'adsorption et la polarité varient en fonction du taux d'hydratation

Chromatographie d'adsorption

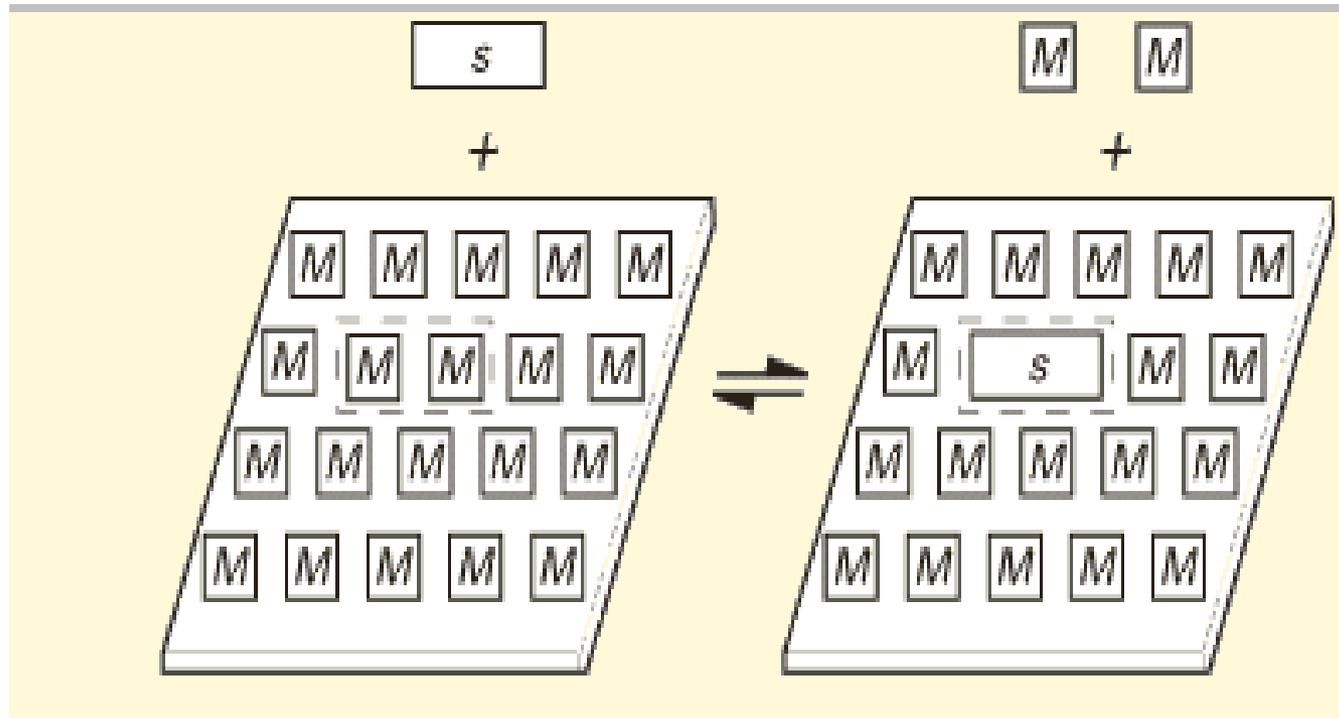
Les phases stationnaires

L'alumine, Al_2O_3 , $n\text{H}_2\text{O}$

- Adsorbant très utilisé car il présente de très **bonnes propriétés d'adsorption**.
- Obtenue par précipitation des sels d'aluminium par des bases fortes, elle renferme toujours des **impuretés basiques** et doivent être traitées spécialement lorsqu'on désire chromatographier des substances acides.

Chromatographie d'adsorption

Principe de la séparation

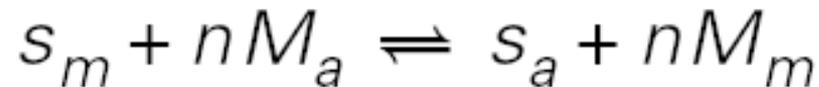


Il y a adsorption des molécules de soluté au niveau de la phase stationnaire. Cette adsorption doit être réversible

Chromatographie d'adsorption

Principe de la séparation

L'éluion ou désorption consiste à extraire la substance adsorbée à l'aide de la phase mobile. Il y a ainsi rupture des liaisons entre le soluté et l'adsorbant. Les molécules de soluté sont remplacées par des molécules de solvant



s désigne le soluté et M la phase mobile

☞ La valeur de n dépend de la taille relative des molécules de soluté et de solvant à la surface de l'adsorbant.

Chromatographie d'adsorption

Phase mobile

Force éluante de la phase mobile:

- Solvant pur:

L'énergie libre d'adsorption des molécules de phase mobile ε_0 (force éluante), permet de contrôler la rétention des solutés.

Plus la force éluante est élevée et plus les facteurs de capacité sont faibles. Une variation de 0.05 unité de ε_0 entraîne une variation de k' d'un facteur 2 à 4.

Chromatographie d'adsorption

Phase mobile

Solvant	Force éluante ϵ_0		Viscosité (cP) à 20 °C	Indice de réfraction à 20 °C	Longueur d'onde minimale (nm)	Point d'ébullition (°C)
	silice	alumine				
Hexane	0	0	0,31	1,375	190	68,7
Isooctane	0,01	0,01	0,50	1,391	190	99,2
Tétrachlorure de carbone	0,11	0,18	0,97	1,460	263	76,8
Éther isopropylique	0,22	0,28	0,37	1,368	220	69
Chlorure d'isopropyle	0,22	0,29	0,33	1,378	230	34,8
Chloroforme	0,26	0,40	0,57	1,446	245	61,2
Chlorure de méthylène	0,32	0,42	0,44	1,424	233	39,8
Tétrahydrofurane	0,35	0,45	0,55	1,408	212	66
Acétate d'éthyle	0,38	0,58	0,45	1,372	256	77,1
Dioxanne	0,49	0,63	1,32	1,422	218	101,3
Acétonitrile	0,50	0,65	0,37	1,344	190	81,6
Isopropanol	0,63	0,82	2,3	1,378	190	82,4
Méthanol	0,73	0,95	0,6	1,329	190	64,7
Eau	> 0,73	> 0,95	1	1,333		100
Acide acétique	> 0,73	> 0,95	1,22	1,372		117,9

(*) La force éluante des solvants est mesurée par rapport au pentane pour lequel on a fixé arbitrairement une force éluante nulle. Certains alcanes fluorés (peu utilisés) ont une force éluante négative.

Chromatographie d'adsorption

Phase mobile

- **l'hexane ou isooctane** comme *solvant non polaire*
- **le dichlorométhane ou dichloroéthane et éther isopropylique** comme solvants de *polarité moyenne*
- **l'acétonitrile et le méthanol** comme *solvant polaires.*

Chromatographie d'adsorption

Phase mobile

- **Mélange de solvants:**
 - Il est rare qu'un solvant unique permette d'aboutir à des valeurs de facteur de capacité convenables et surtout à une résolution convenable, on utilise souvent un mélange de solvants.
 - Cette recherche du solvant de force éluante convenable peut s'effectuer soit directement sur colonne, soit par chromatographie sur couche mince en ayant soin d'utiliser la même phase stationnaire que celle de la colonne.

Chromatographie d'adsorption

Phase mobile

- Pb quand on mélange un *solvant apolaire* comme l'isooctane et un *solvant polaire* comme le méthanol car ces deux solvants ne sont pas miscibles en toute proportions.
- On ajoute *un troisième solvant* miscible aux deux premiers. On réalise un mélange ternaire avec un solvant *de force éluante intermédiaire* tel l'éther isopropylique, le dichlorométhane et, éventuellement, l'acétate d'éthyle.

Chromatographie d'adsorption

Phase mobile

- Pb: Ces solvants de force éluante moyenne ont toujours une absorption dans l'ultraviolet plus grande que les solvants apolaires et polaires ils doivent toujours être en même proportion dans le mélange.

MISCIBILITE DES SOLVANTS

		acide acétique	acétone	acétonitrile	benzène	n-butanol	chloroforme	cyclohexane	dichlorométhane	DMSO	eau	éthanol	éther éthylique	éthyle acétate	hexane	iso-octane	méthanol	2-propanol
acide acétique																		
acétone																		
acétonitrile																		
benzène																		
n-butanol																		
chloroforme																		
cyclohexane																		
dichlorométhane																		
DMSO																		
eau																		
éthanol																		
éthyle acétate																		
éther éthylique																		
hexane																		
iso-octane																		
méthanol																		
2-propanol																		

TABLE DE MISCIBILITE DES SOLVANTS

Miscible
 Non-miscible

Chromatographie d'adsorption

Energie d'adsorption des solutés

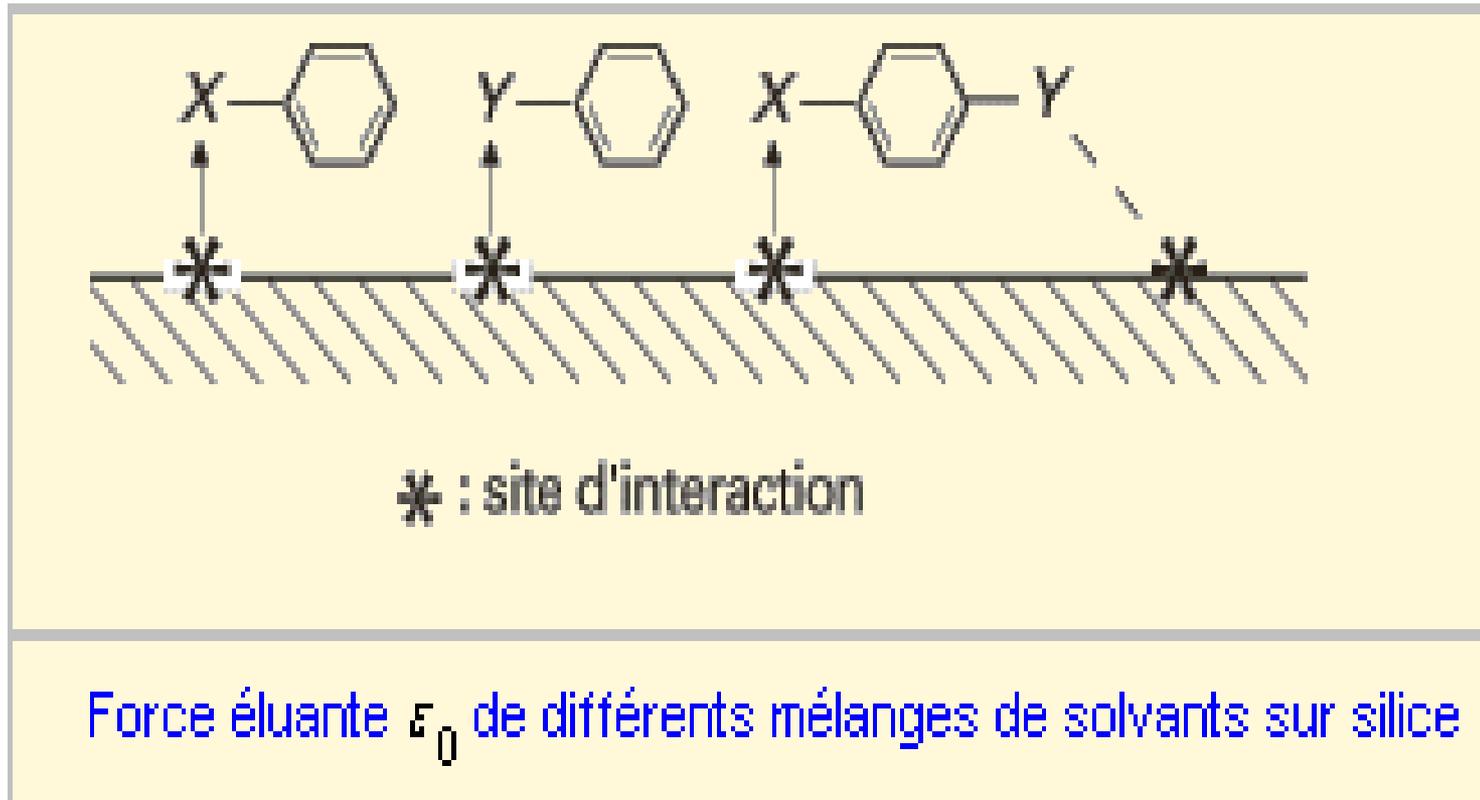
- L'énergie d'adsorption d'une molécule de soluté sur les sites actifs de la phase stationnaire est égale à la somme des énergies d'adsorption des différents groupements qui constituent la molécule.

$$E_0 = \sum_{i=1}^{i=n} Q_i^0$$

Q_i^0 étant l'énergie libre d'adsorption d'un groupement i .

Chromatographie d'adsorption

Energie d'adsorption des solutés



Chromatographie d'adsorption

Energie d'adsorption des solutés

Tableau 5 – Énergies réduites d'adsorption de différents groupements déterminées sur de l'alumine ou sur de la silice à faible diamètre de pore

Groupement	Q_i^0						Groupement	Q_i^0					
	Alumine			Silice				Alumine			Silice		
	X, Y = ar	X = al, Y = ar	X, Y = al	X,Y = ar	X = al, Y = ar	X,Y = al		X, Y = ar	X = al, Y = ar	X, Y = al	X,Y = ar	X = al, Y = ar	X,Y = al
X-CH ₃	0,06		-0,03	0,11		0,07	X ₂ -N-Y.....		2,48	4,40		2,52	≈ 5,8
X-CH ₂ -Y.....	0,12	0,07	0,02	0,07	0,01	-0,05	X-CHO.....	3,35		4,73	3,48		4,97
-C = aromatique ou carbone éthylénique	0,31	0,31	0,31	0,25	0,25	0,25	X-NO ₂	2,75		5,40	2,77		5,71
X-F.....	0,11		1,64	-0,15		1,54	X-C≡N.....	3,25		5,00	3,33		5,27
X-Cl.....	0,20		1,82	0,20		1,74	X-CO ₂ -Y.....	4,02	3,40	5,00	4,18	3,45	5,27
X-Br.....	0,33		2,00	0,17		1,94	X-CO-Y.....	4,36	3,74	5,00	4,56	4,69	5,27
X-I.....	0,51		2,00	-0,15		1,94	X-OH.....	7,40		6,50	4,20		5,60
Y-SH.....	8,70		2,80	0,67		1,70	X-CH=N-Y....	4,14	4,46	6,00			
X-S-S-Y.....		≈ 1,1	2,70		0,94	1,90	X-NH ₂	4,41		6,24	5,10		8,00
X-S-Y.....	0,76	1,32	2,65	0,48	1,29	2,94	X-SO-Y.....		4,0	6,70		4,2	7,2
X-O-Y.....	1,04	1,77	3,50	0,87	1,83	3,61	X-COOH.....	19		21	6,1		7,6
							X-CONH ₂	6,2		8,9	6,6		9,6

ar = radical aromatique al = radical aliphatique

Chromatographie d'adsorption

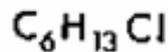
Energie d'adsorption des solutés

- L'énergie d'adsorption d'un groupement varie selon qu'il est substituant **dans un composé aliphatique ou dans un composé aromatique.**
- D'une façon générale, on constate que **l'énergie d'adsorption est plus grande lorsque le substituant est attaché à une chaîne aliphatique.**

Chromatographie d'adsorption

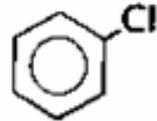
Energie d'adsorption des solutés

De ce fait, il peut arriver que des composés qui paraissent à priori très différents, aient en réalité des énergie d'adsorption très voisines.



$$Q^{\circ}Cl = 1,82$$

$$E_o = 1,94$$



$$Q^{\circ}Cl = 0,2$$

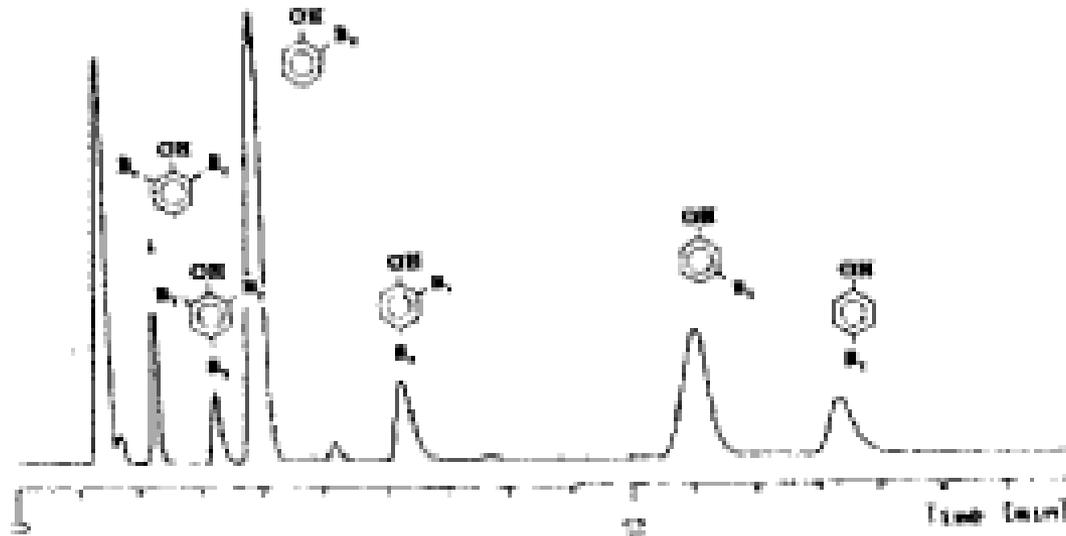
$$E_o = 2,06$$

Les groupements
aliphatiques
s'adsorbent très peu

Il en résulte que la séparation de ces deux dérivés chlorés, qui pouvait paraître aisée en raison des différences de structure sera difficile.

Chromatographie d'adsorption

Applications



Phase stationnaire : silice 5 μm

Phase mobile :

heptane - Isopropanol (99 : 1)

Détection UV à $\lambda = 280 \text{ nm}$

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

- De toutes les méthodes de chromatographie en phase liquide, la plus utilisée est la chromatographie de partage.
- On greffe sur les fonctions silanols de la silice diverses fonctions organiques plus ou moins polaires.
- La phase stationnaire greffée se comporte comme **un liquide**, On parle de **chromatographie liquide-liquide**. La séparation met en jeu des **coefficients de partage et non plus d'adsorption**. Les solutés se partagent entre la phase greffée et la phase mobile.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

On distingue :

- ***la chromatographie de partage classique (normal phase chromatography)*** dans laquelle les molécules greffées sur le gel de silice ont un groupement polaire (-CN, -NH₂), la phase mobile est peu polaire (hexane pur ou en mélange avec un peu de méthanol ou d'acétonitrile).

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

- ***la chromatographie de partage à polarité de phases inversée (reversed phase chromatography)*** où les molécules greffées sont apolaires, principalement des chaînes hydrocarbonées ; la phase mobile est polaire (mélange eau-méthanol, eau-acétonitrile).

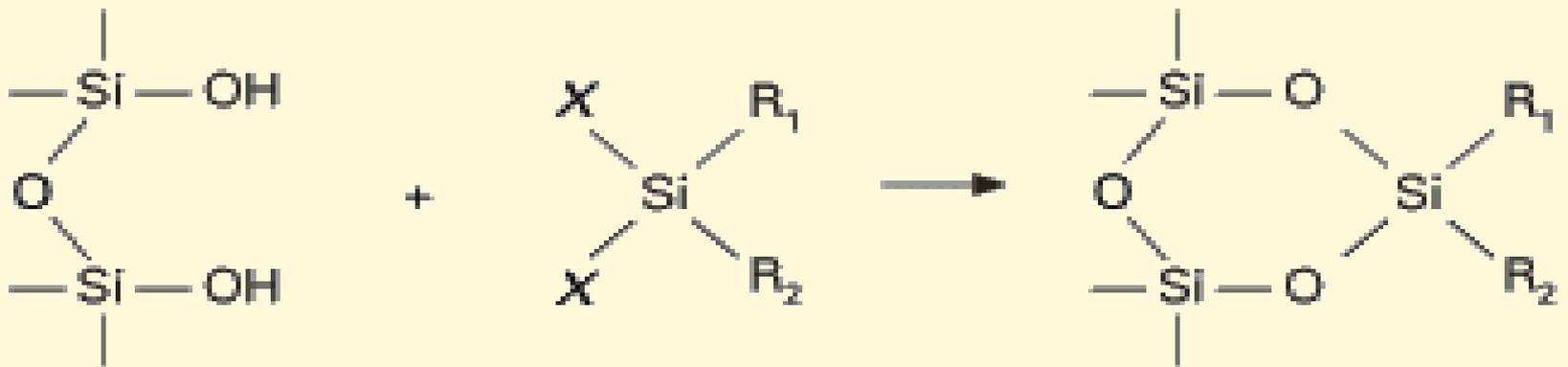
Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

- La silice du fait de ses propriétés (grande surface spécifique, résistance à la pression...) constitue le matériel de base pour la synthèse des phases stationnaires greffées.
- La méthode de greffage consiste à faire réagir la silice avec un silane mono, di ou trifonctionnel (chloro ou alkoxysilane). On obtient ainsi des liaisons Si-O-Si-C stables.

Réactions de silanisation de la silice

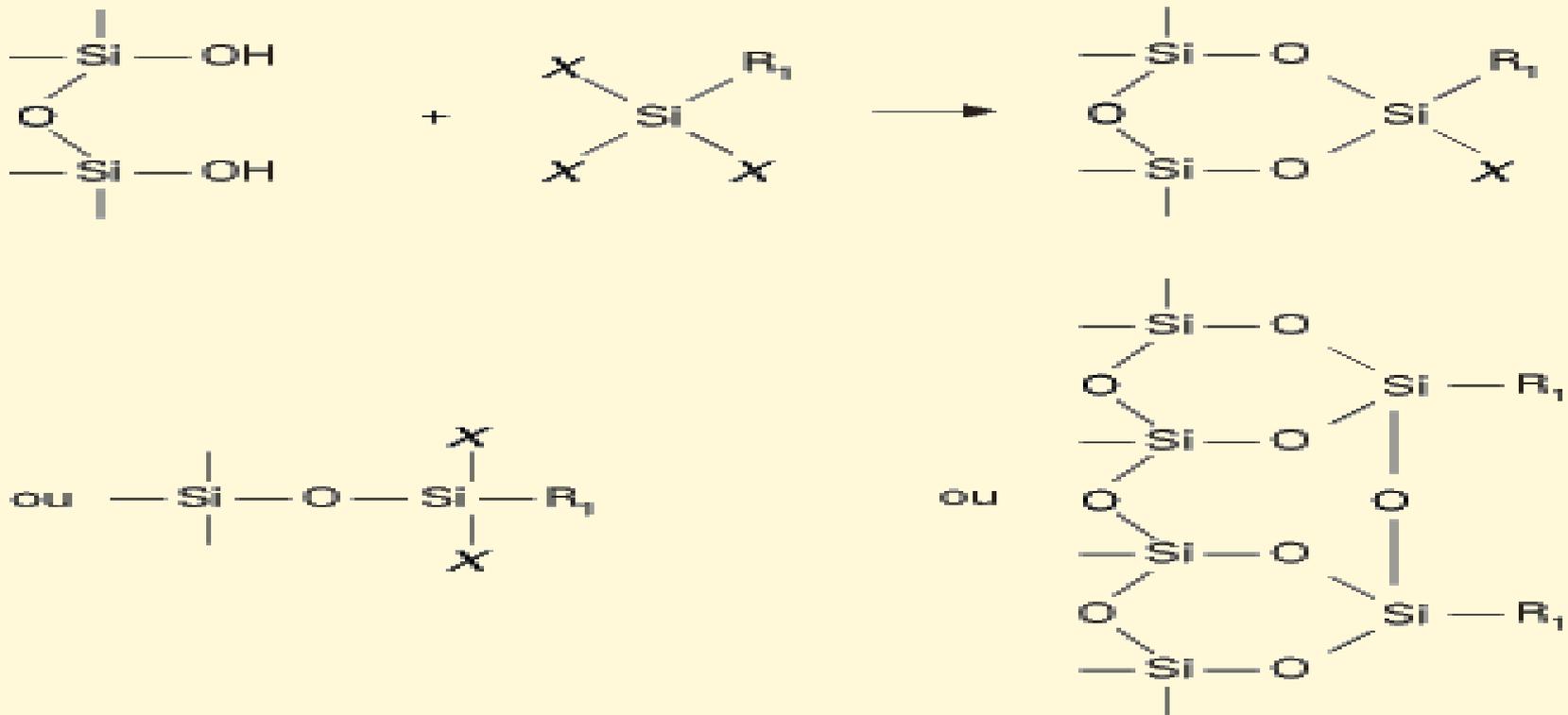


a silane monofonctionnel



Réactions de silanisation de la silice

b silane difonctionnel

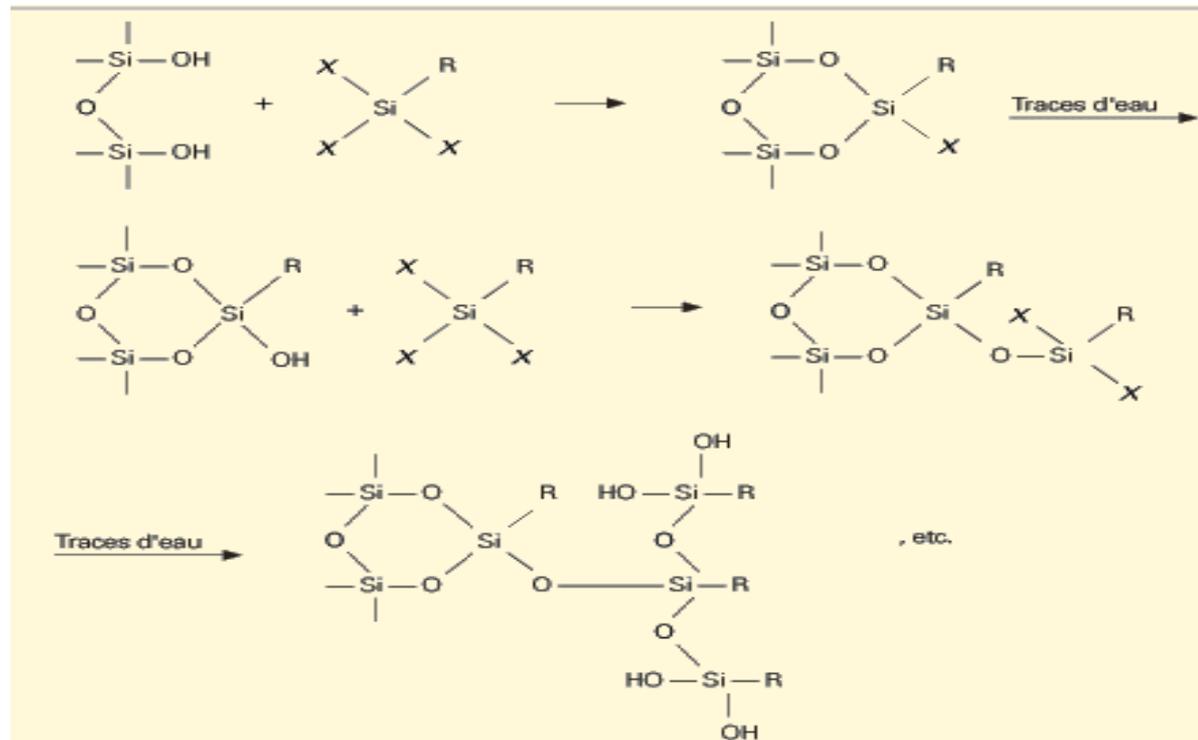


c silane trifonctionnel

$X = \text{Cl}, \text{CH}_3\text{O}, \text{C}_2\text{H}_5\text{O}, \text{etc.}$

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

Le groupement X résiduel peut conduire par hydrolyse à la formation de groupements SiOH qui pourront réagir avec un silane résiduel.



Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase polaire

- Les principales phases stationnaires polaires:
 - Aminopropyle: $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$
 - Paranitrobenzyle: $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$
 - Alkylnitrile $-(\text{CH}_2)_n\text{-CN}$
 - Glycopropyle (diol) $-(\text{CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase polaire

Mécanisme de partage sur phases stationnaires polaires
(exemple phase greffée aminopropyle)

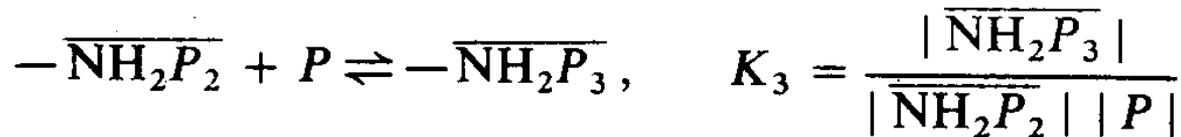
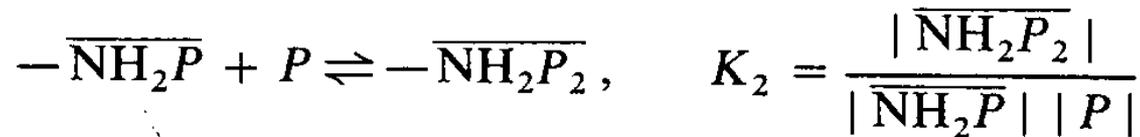
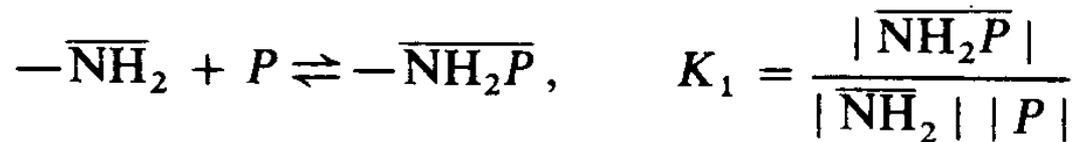
Phase mobile: solvant apolaire (hexane) auquel on ajoute de faibles quantités de solvants polaires (dichlorométhane ou acétonitrile, méthanol...). Ce solvant polaire est appelé modificateur polaire P

Il y a solvataion des greffons polaires par le solvant le plus polaire contenu en faible quantité dans la phase mobile

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase polaire

Il a été démontré que les molécules du modificateur interagissent avec les groupements amino $-\text{NH}_2$ selon des équilibres du type :



Les espèces surlignées sont présentes sur la phase stationnaire

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

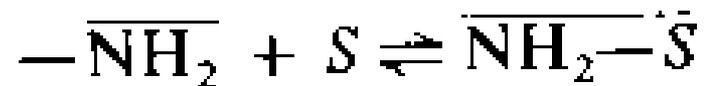
la chromatographie de partage sur phase polaire

- Lorsque le modificateur est peu polaire (chloroforme, dichlorométhane) seul le premier équilibre intervient : chaque groupement amino fixe au plus une molécule de P.
- Lorsque le modificateur est très polaire (méthanol, éthanol) chaque groupement amino peut fixer jusqu'à trois molécules de P.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase polaire

Lorsque la phase mobile contient **un soluté S**, il y a compétition entre la solvataion des groupements $-NH_2$ par le modificateur polaire P et par le soluté :



De même, il y a solvataion dans la phase mobile de S par P :



Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase polaire

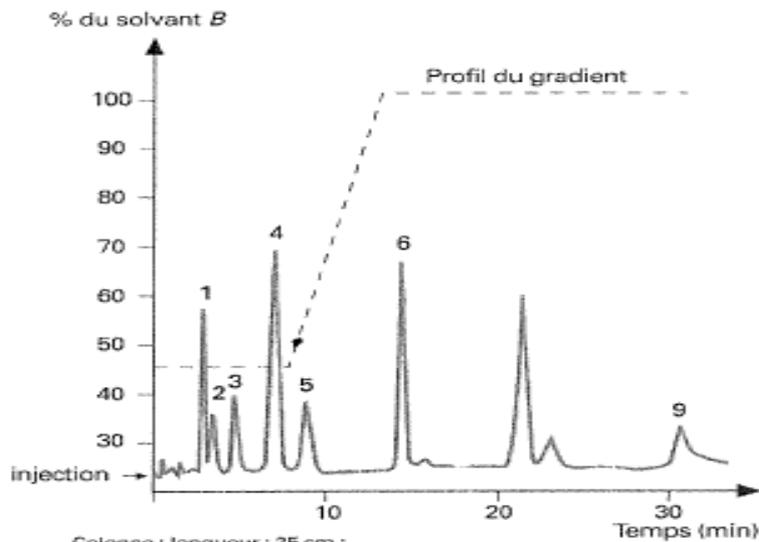
La rétention de S dépend:

- *des constantes* de ces différents équilibres
- de la concentration totale en *groupement amino*
- de la *concentration de P* dans la phase mobile.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase polaire

- Application: séparation d'un antalgique (bénorilate, ester) et de ses impuretés



Colonne : longueur : 25 cm ;
diamètre intérieur : 2,1 mm.
Phase stationnaire : silice greffée alkylnitrite
de type Micropak CN, 10 µm.
Phase mobile : solvant A,
hexane-dichlorométhane-acide acétique
(84,8 : 5 : 0,2 v/v) ;
solvant B, hexane-dichlorométhane-méthanol-acide acétique
(89,8 : 5 : 5 : 0,2 v/v)
Le profil du gradient est représenté sur le chromatogramme.
Débit : 1,5 mL min⁻¹.
Perte de charge : 70 bar.
Détection : UV à 254 nm.
Échantillon : volume injecté 3 µL.

b chromatogramme obtenu

		N° du pic chromatographique	Concentration en solution dans le dichlorométhane
2-Acétoxybenzoate de 4-acétamidophényl (bénorilate)	<chem>CC(=O)Oc1ccccc1C(=O)c2ccc(NC(=O)C)cc2</chem>	6	0,5 mg mL ⁻¹
Anhydride acétylsalicylique	<chem>CC(=O)Oc1ccccc1C(=O)OC(=O)c2ccccc2</chem>	1	1 mg mL ⁻¹
Acide acétylsalicylique (aspirine)	<chem>CC(=O)Oc1ccccc1C(=O)O</chem>	2	1,5 mg mL ⁻¹
Acide acétylsalicylsalicylique	<chem>CC(=O)Oc1ccccc1C(=O)OC(=O)c2ccccc2C(=O)O</chem>		1,5 mg mL ⁻¹
2-Hydroxybenzoate de 4-acétamidophényl ou salicylate de N-acétyl-p-aminophénol	<chem>CC(=O)Oc1ccccc1C(=O)c2cc(O)cc(O)cc2</chem>		0,5 mg mL ⁻¹
2-Acétoxybenzoate de 4-aminophényle (ester acétylsalicylique du p-aminophénol)	<chem>CC(=O)Oc1ccccc1C(=O)c2ccc(N)cc2</chem>	5	1 mg mL ⁻¹
N-acétyl-p-aminophénol (paracétamol)	<chem>CC(=O)Nc1ccc(O)cc1</chem>	7	0,5 mg mL ⁻¹
p-aminophénol	<chem>Nc1ccc(O)cc1</chem>	9	1,5 mg mL ⁻¹
Impureté non identifiée		8	

a impuretés éventuelles du bénorilate

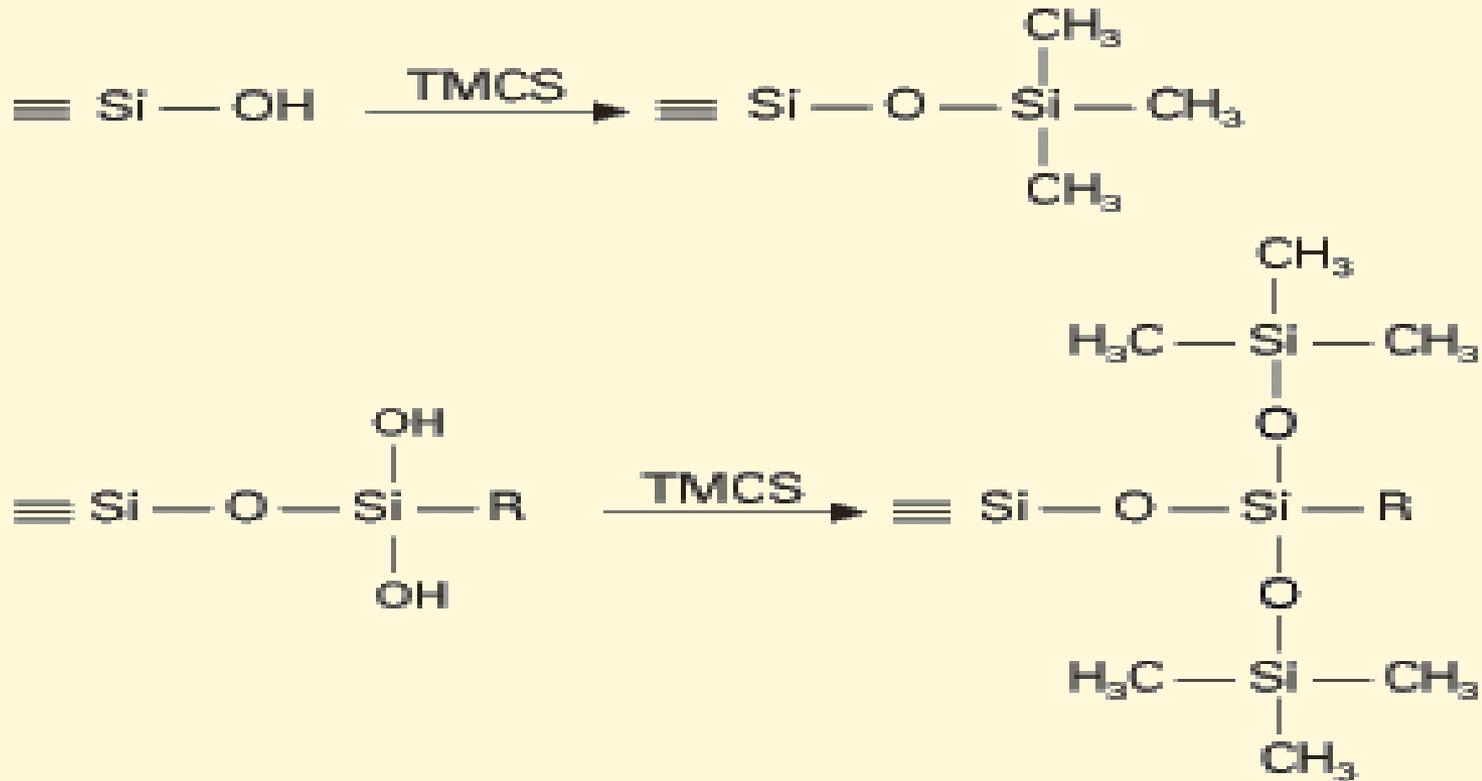
Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

- 80% des séparations sont réalisées avec des phases stationnaires apolaires
- La phase mobile est constituée d'un mélange eau-méthanol ou eau-acétonitrile.
- Les phases stationnaires les plus utilisées sont des silices greffées alkyle (C8 ou C18). Elles sont obtenues par la même méthode de greffage que celle mise en œuvre pour les phases polaires. Mais lors de la dernière étape, les silanols résiduels sont éliminés par du triméthylchlorosilane (TMCS): end capping

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire



Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

- Les phases stationnaires à base de silice ne peuvent être utilisés si $\text{pH} > 7.5$ (attaque du réseau siliceux par les ions OH^-), utilisation de polymères organiques (exemple: polymère styrène-divinylbenzène (pH 0-14) ou de phase à base de carbone graphite poreux

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

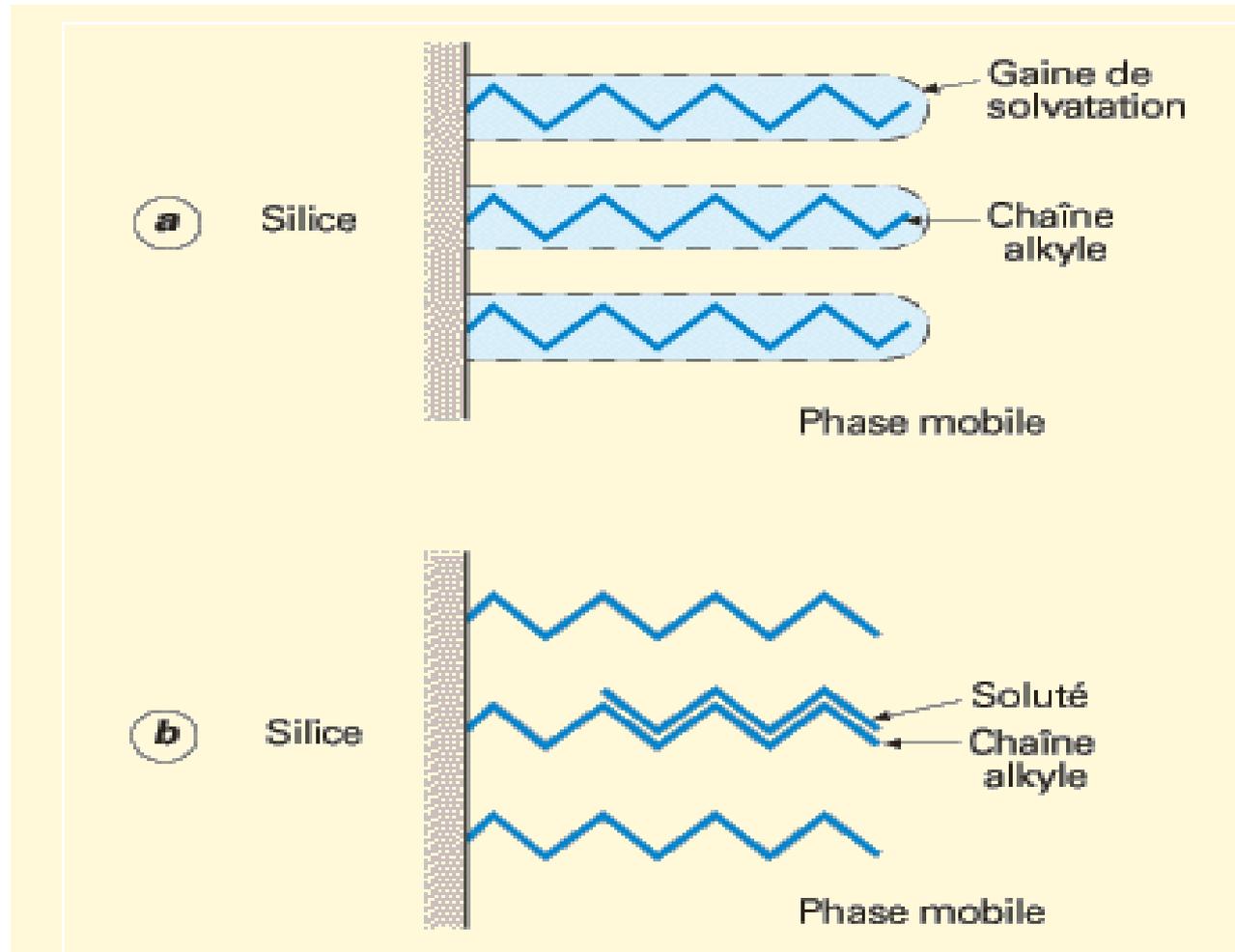
Les lois de rétention sont l'inverse de celles observées sur phase stationnaire polaire. Les composés polaires sont élués avant les composés apolaires.

Deux mécanismes de rétention:

- le solvant organique de la phase mobile se fixe préférentiellement à la surface des greffons apolaires. Il y a alors partage des solutés entre la phase mobile et la phase liquide adsorbée
- la rétention est une conséquence de l'effet hydrophobe. Il y a association réversible du soluté avec les greffons.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire



Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

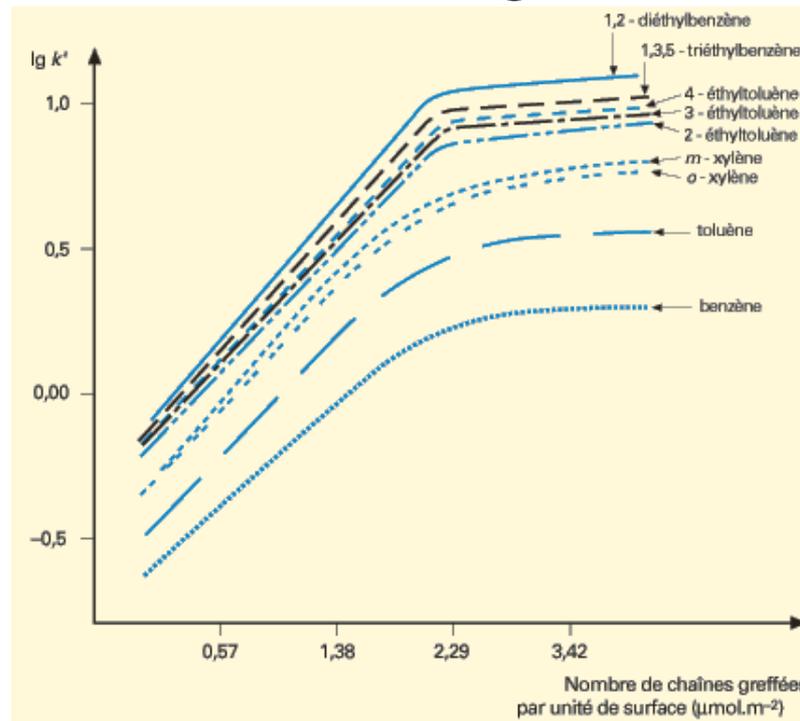
la chromatographie de partage sur phase apolaire

- L'importance relative de ces deux mécanismes dépend de la nature des solutés (caractère hydrophobe).
- Si le soluté est très apolaire, il sera surtout en interaction avec les chaînes alkyles. Un soluté plus polaire sera en interaction à la fois avec les molécules du solvant organique adsorbé et avec les chaînes alkyles.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

- Rôle de la phase stationnaire:
- Le facteur de capacité augmente avec le nombre de chaînes greffées par unité de surface.

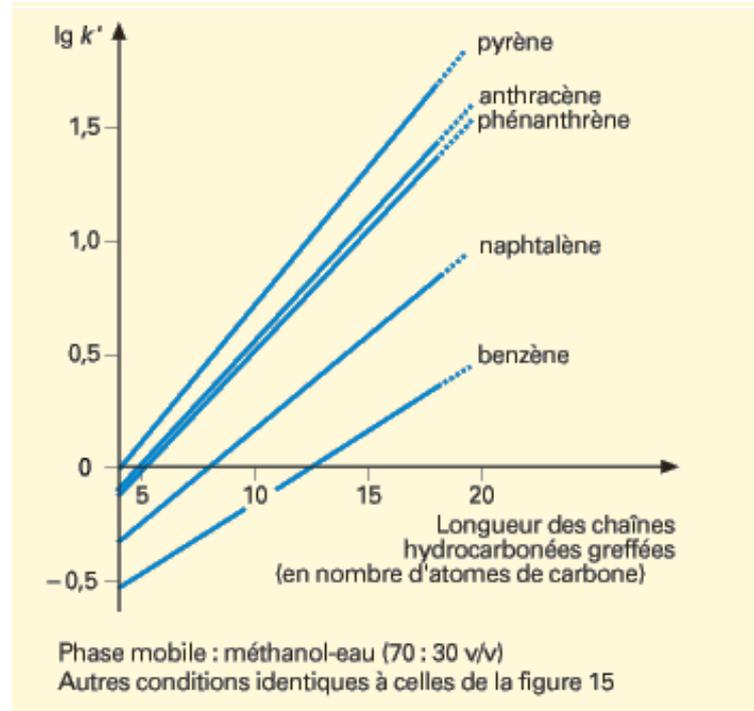


Colonne : longueur, 15 cm ; diamètre intérieur, 4,8 mm (1/4")
Phase mobile : méthanol-eau (60 : 40 v/v)
Débit 0,82 mL.min⁻¹
Détection : absorption dans l'ultraviolet à 254 nm.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

A nombre de greffons par unité de surface constant, le logarithme du facteur de capacité des solutés varie linéairement avec la longueur de la chaîne greffée.



Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

- Rôle de la phase mobile
- On utilise comme phase mobile des mélanges eau-méthanol, ou eau-acétonitrile. La rétention est d'autant plus importante que la polarité de l'éluant est plus grande.
- Remarque l'eau utilisée en chromatographie à polarité de phase inversée doit être rigoureusement exempte de matières organiques. En effet de telles substances peuvent être retenues par les silices greffées alkyle puis être éluées lorsque la teneur en solvant organique augmente d'où l'apparition de pics parasites ou de dérives de ligne de base.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

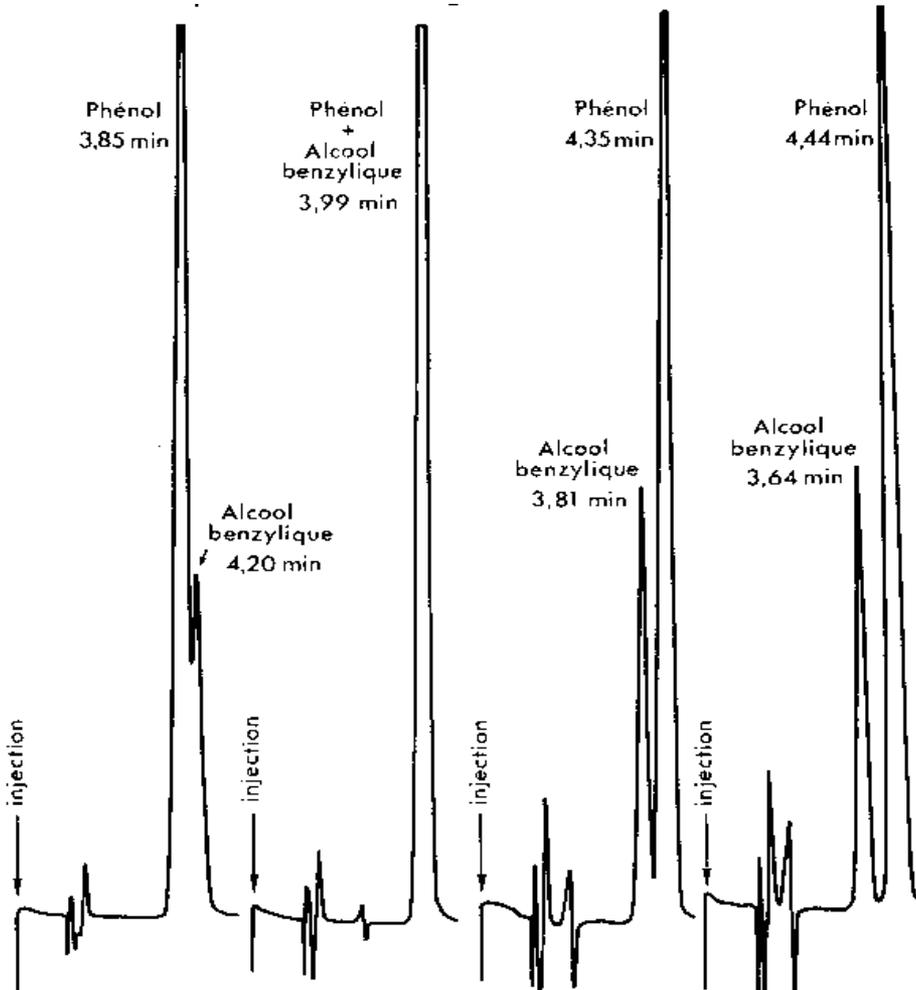
la chromatographie de partage sur phase apolaire

Remarque: on peut dans certains cas être amené à utiliser des mélanges ternaires:

- On ajoute aux mélanges eau-méthanol ou eau-acétonitrile une faible proportion d'un troisième solvant, le plus souvent du tétrahydrofurane (THF). L'addition de ce solvant, provoque une modification de la force éluante qui est augmenté pour certains composés du mélange et diminué pour d'autres.
- Exemple séparation d'un mélange phénol-alcool benzylique sur silice greffée C18.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire



Avec une phase mobile eau-méthanol 60 :40 (v/v) la séparation est insuffisante. L'addition de THF augmente le temps de rétention du phénol et diminue celui de l'alcool benzylique. On observe d'abord une moins bonne résolution puis celle-ci augmente et devient excellente pour un mélange eau-méthanol-THF 60 :35 :5 (v/v)

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

Quand les espèces étudiées comportent des groupements acide ou basique, il est nécessaire de contrôler le pH de l'éluant.

- ***Plus le soluté est ionisé***, plus son temps de ***réretention diminue*** (forte solubilité en phase aqueuse).
- Les variations des temps de réretention sont très importants lorsque le **pH varie autour du pKa**. Les acides seront chromatographiés à un $\text{pH} < \text{pKa} - 2$. Les bases seront chromatographiées à un $\text{pH} > \text{pKa} + 2$.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

Quand les solutés sont trop polaires, ils peuvent avoir une rétention insuffisante sur les silices alkyles. On utilise alors des **silice greffées amine ou nitrile**.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

- Influence de la température:

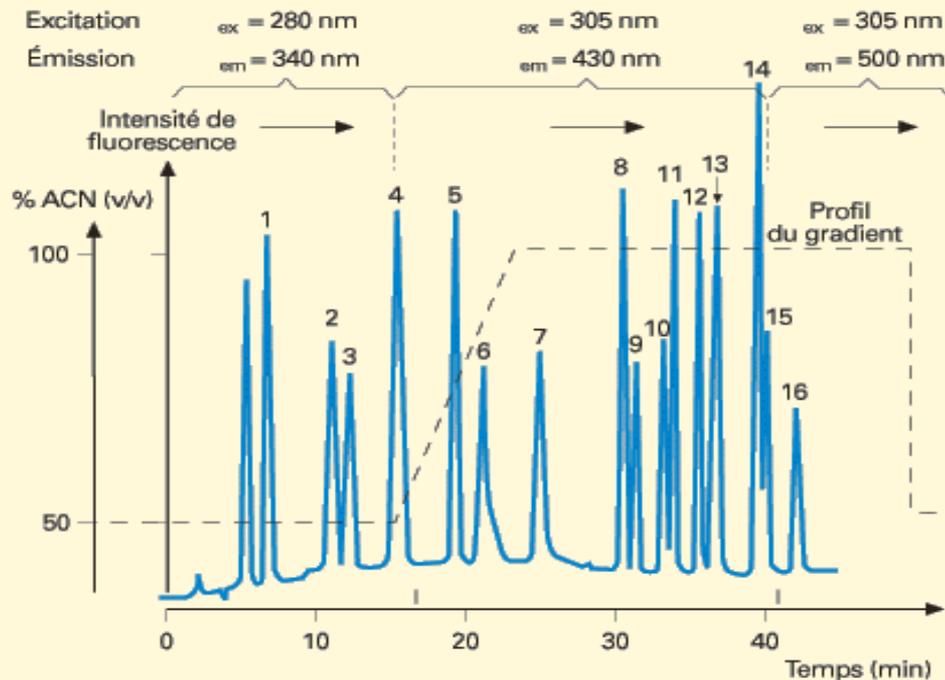
Une augmentation de la température provoque en général une diminution des facteurs de capacité et de la sélectivité. Il est donc important de thermo-réguler la colonne chromatographique.

Cependant, il est parfois avantageux d'augmenter la température des séparations car la viscosité de la phase mobile diminue.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

- **Applications:**
- Séparations d'un mélange de 16 hydrocarbures polycycliques aromatiques (polluants)



Colonne : longueur : 25 cm ; diamètre intérieur : 0,26 cm.
Phase stationnaire, silice greffée octadécyle HC-ODS, 10 μm .
Phase mobile : acétonitrile-eau avec élution graduée (le profil du gradient est représenté en tireté sur la figure).
Débit : 0,5 mL \cdot min $^{-1}$.
Détection : spectrofluorimétrie avec programmation des longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

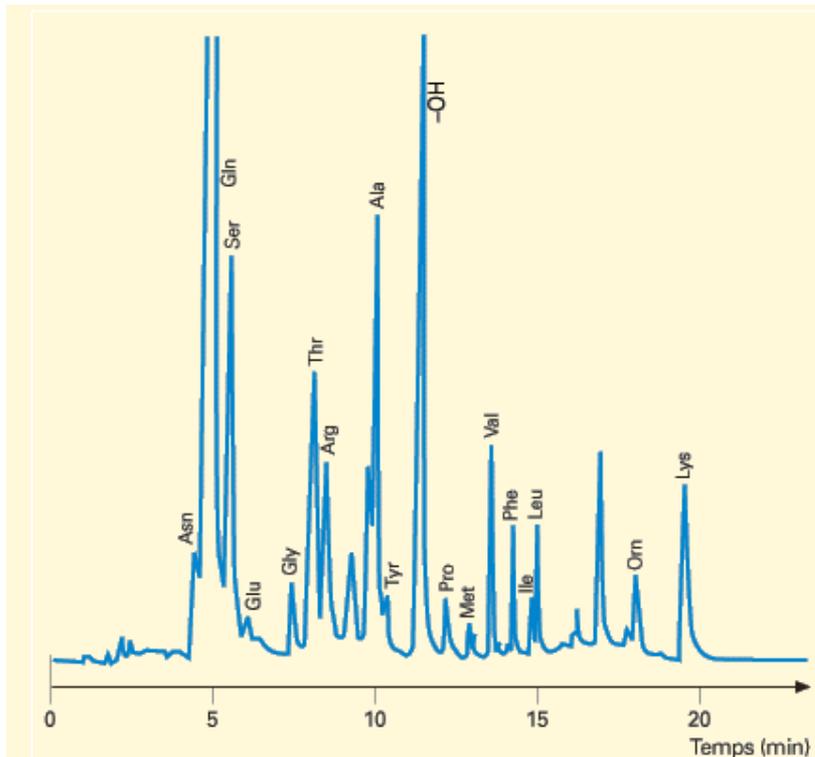
Solutés :

1) Naphthalène ; 2) Acénaphthène ; 3) Fluorène ; 4) Phénanthrène ;
5) Anthracène ; 6) Fluoranthène ; 7) Pyrène ; 8) Benz[a]anthracène ;
9) Chrysène ; 10) Benzo[e]pyrène ; 11) Benzo[b]fluoranthène ;
12) Benzo[k]fluoranthène ; 13) Benzo[a]pyrène ; 14) Dibenz[a,h]anthracène ;
15) Benzo[ghi]pérylène ; 16) Indéno[1,2,3-cd]pyrène.

Chromatographie de partage sur phase stationnaires greffées

la chromatographie de partage sur phase apolaire

- Applications:
- Séparation d'un mélange d'aa après dérivation précolonne avec un réactif fluorescent



Arg	Arginine	Gly	Glycine	Phe	Phénylalanine
Ala	Alanine	His	Histidine	Pro	Proline
Asn	Asparagine	Ile	Isoleucine	Ser	Sérine
Asp	Acide aspartique	Leu	Leucine	Thr	Thréonine
Cys	Cystéine	Lys	Lysine	Trp	Tryptophane
Gln	Glutamine	Met	Méthionine	Tyr	Tyrosine
Glu	Acide glutamique	Orn	Ornithine	Val	Valine

Colonne : longueur : 12,5 cm ; diamètre intérieur : 4,6 mm.
Phase stationnaire : silice greffée octadécyle (ODS Hypersil), 3 μm .
Phase mobile : gradient linéaire acétonitrile-méthanol-tampon acétate (10 - 40 - 50 v/v) à acétonitrile-tampon acétate (50 - 50 v/v) en 9 min.
Début du gradient 3 min après l'injection.
Débit : 1,3 mL \cdot min⁻¹.

Détection : spectrofluorimétrie $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 313 \text{ nm}$.
Échantillon : fluide cérébro-spinal dilué 10 fois.
Dérivation avec le FMOC (9 fluorényl - méthylchloroformiate) ; voir [35] pour conditions expérimentales.
Les acides aminés sont repérés par leurs sigles habituels. Le pic d'éluion repéré OH correspond au produit d'hydrolyse du réactif en excès.

Liste des solvants par ordre croissant de leur polarité

Hexane et éther de pétrole
Tétrachlorure de carbone
Benzène
Dichlorométhane
Chloroforme
Éther éthylique
Acétate d'éthyl
Acétone
Propanol
Éthanol
Méthanol
Eau
Acide acétique

**La chromatographie ionique
ou
Chromatographie d'échange d'ions**

La chromatographie ionique

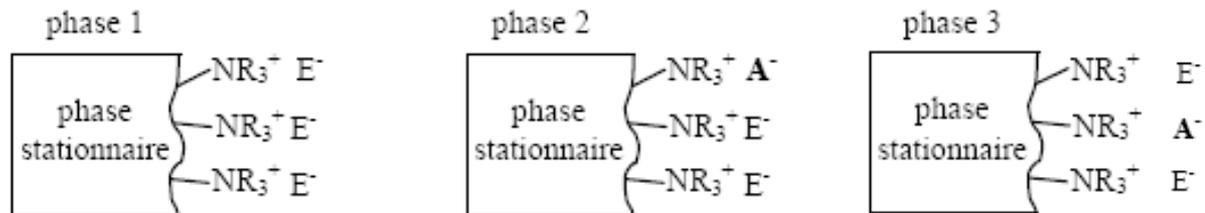
- Technique permettant l'analyse d'espèces ioniques inorganiques et organiques (espèces ionisées ou ionisables)
- Technique très utilisée dans la chimie de l'environnement (analyse des eaux) et l'industrie alimentaire
- Exemple: dosage des ions fluorures, chlorures, sulfates, sodium, magnésium, calcium...

Mécanisme de séparation

- Les phases stationnaires sont des résines échangeuses d'ions, un solide comportant des groupements fonctionnels ionisés, fixes, porteurs de charges positives ou négatives (les résines cationique et anionique).
- Doser des anions, colonne anionique (charge +)
- Doser des cations, colonne cationique (charge -)

Mécanisme de séparation

- La séparation se fait par mécanisme d'échange d'ions.



E⁻ anion de l'éluant, A⁻ analyte

Phase 1: colonne conditionnée sous la phase mobile

Phase 2: $E_{stat}^- + A_{mob}^- \leftrightarrow A_{stat}^- + E_{mob}^-$ (équation 1)

Cette réaction est caractérisée par le facteur de sélectivité:

$$K_E^A = \frac{[A^-]_{stat} \times [E^-]_{mob}}{[A^-]_{mob} \times [E^-]_{stat}}$$

Mécanisme de séparation

- La rétention du soluté est régie par:
 - la différence d'affinité entre E^- et A^- pour l'échangeur d'ions considéré.
 - la concentration de E^- dans la phase éluante.

Mécanisme de séparation

En règle générale:

- La rétention dépend de la charge et de la taille de l'ion. Les ions multichargés seront plus retenus que les ions monochargés.

Mécanisme de séparation

L'ordre d'affinité

- Pour un échangeur d'anions de type ammonium quaternaire, est le suivant:

citrate > SO_4^{2-} > oxalate > I^- > NO_3^- > Br^- > SCN^-
> Cl^- > formiate > acétate > OH^- > F^-

- Pour un échangeur de cations de type sulfonate:

Ba^{2+} > Pb^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}
> Co^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+} > Ag^+ > Cs^+ > Rb^+ > K^+ NH_4^+
> Na^+ > H^+ > Li^+

Mécanisme de séparation: Choix de la phase mobile

- La phase mobile est généralement une solution aqueuse à laquelle on a ajouté en petite quantité un solvant organique (méthanol ou éthanol) afin d'accroître la solubilité des composés organiques ionisés. Trois paramètres interviennent dans le choix de la phase mobile:
 - le pH,
 - la nature et la concentration de l'ion développeur

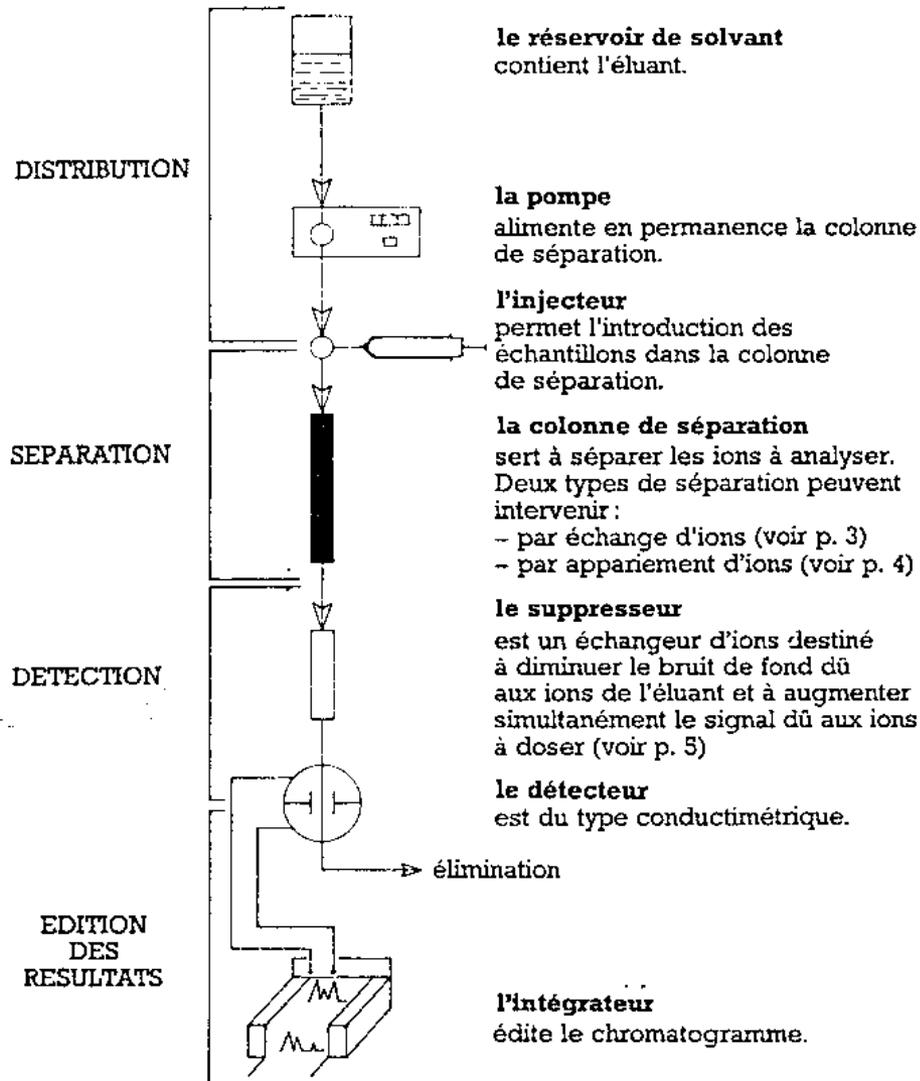
Mécanisme de séparation: Choix de la phase mobile

- Choix du pH: C'est le facteur le plus important qu'il faut optimiser en premier
- Nature et concentration de l'ion développeur:
La rétention des espèces dépend de la nature de l'ion développeur, plus la résine a d'affinité pour celui-ci, plus faible est la rétention du soluté. Une augmentation de la concentration de l'ion développeur entraîne une diminution de la rétention

Mécanisme de séparation: Choix de la phase mobile

- L'ordre d'affinité des ions inorganiques est important car il régit en partie la force éluante des phases mobiles utilisées.
- Sur un échangeur d'anions, l'utilisation de l'ion nitrate comme ion éluant conduit, à une élution beaucoup plus rapide que l'utilisation de l'ion chlorure.
- De même, avec un échangeur de cations, une solution préparée avec des sels de potassium a une force éluante plus élevée que la même solution préparée avec des sels de sodium ou à fortiori de lithium.

Appareillage chromatographie ionique



Phases stationnaires en chromatographie ionique

On distingue deux types de phases stationnaire:

- *les supports anioniques et cationiques forts*
- *les supports anioniques et cationiques faibles*

Phases stationnaires en chromatographie ionique

- ***les supports anioniques ou cationiques forts***, ionisés quelque soit le pH de la phase mobile, leur capacité d'échange est constante et indépendante du pH

Exemple: échangeurs sulfonate (SCX, Strong Cation Exchanger) et ammonium quaternaire (SAX, Strong Anion Exchanger)

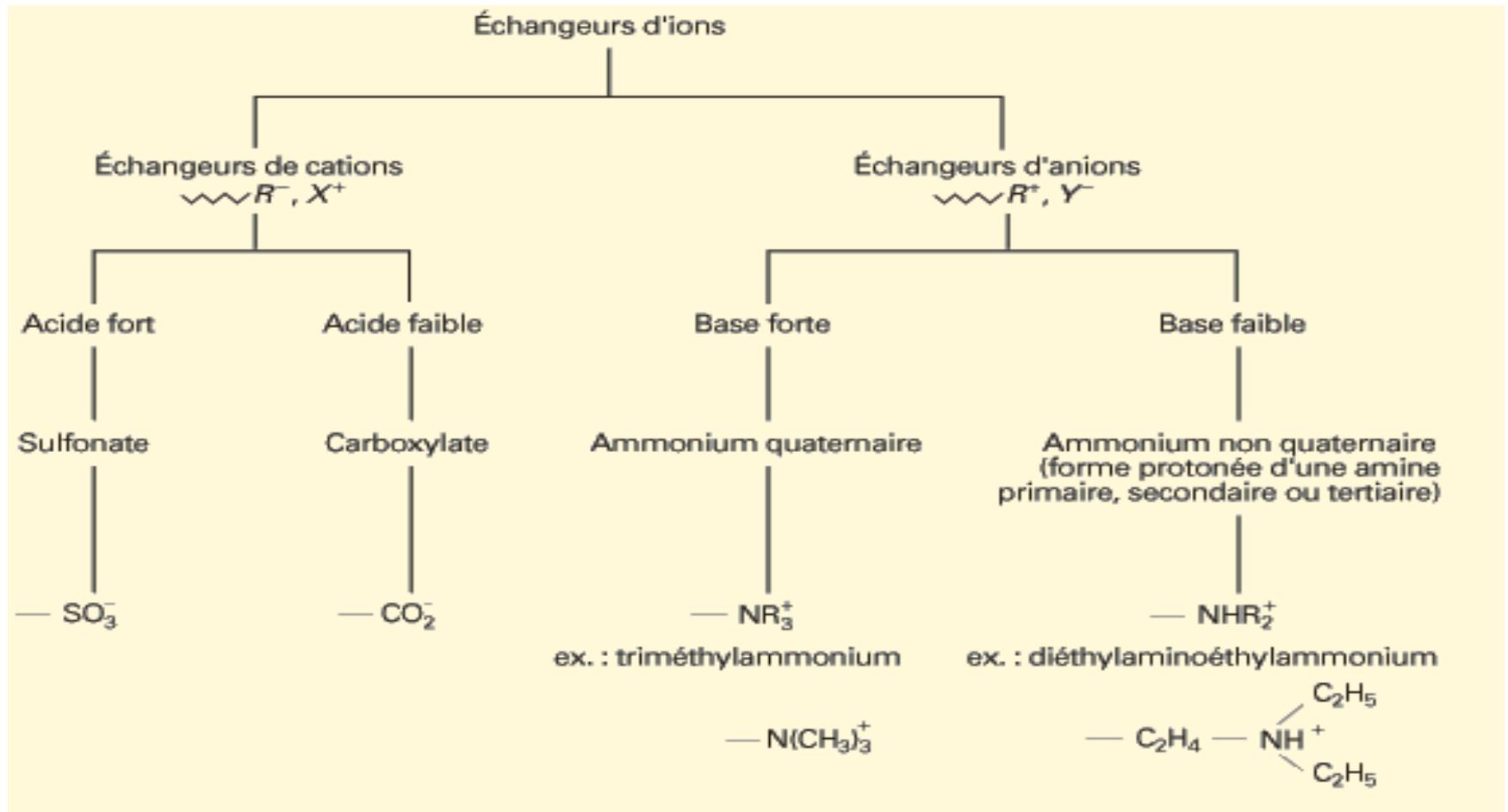
Phases stationnaires en chromatographie ionique

- **les supports anioniques ou cationiques faibles** dont le degré de dissociation dépend du pH de l'éluant, la capacité d'échange des supports anioniques ou cationiques faibles dépend du degré d'ionisation des groupements fonctionnels, donc du pH de l'éluant

Exemple:

- Echangeur carboxylate $-\text{CO}_2^-$ n'est échangeur de cations qu'en milieu de pH suffisamment élevé. A pH acide, les groupements sont sous la forme CO_2H non ionisée.
- Échangeur amine III $-\text{NR}_2$, n'est échangeur d'anions qu'en milieu acide ($-\text{NR}_2\text{H}^+$).

Classification des groupements fonctionnels des échangeurs d'ions



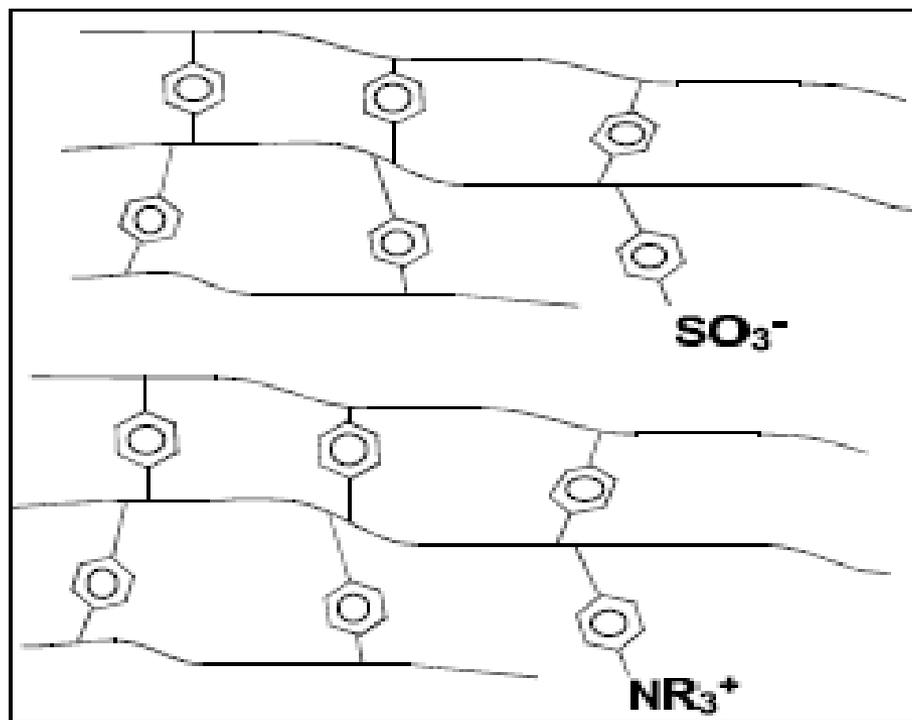
Phases stationnaires en chromatographie ionique

Trois types de résine:

- Résine de type gel
- Résine pelliculaire
- Résine à base de silice

Trois types de résine échangeuse d'ions

1- *La structure Gel:*



Copolymère styrène/divinylbenzène sur lequel sont greffés des groupes fonctionnels.

Les structures Gels

La matrice est constituée par un réseau macromoléculaire tridimensionnel (copolymère styrène-divinylbenzène), sur lequel sont greffés les groupements fonctionnels

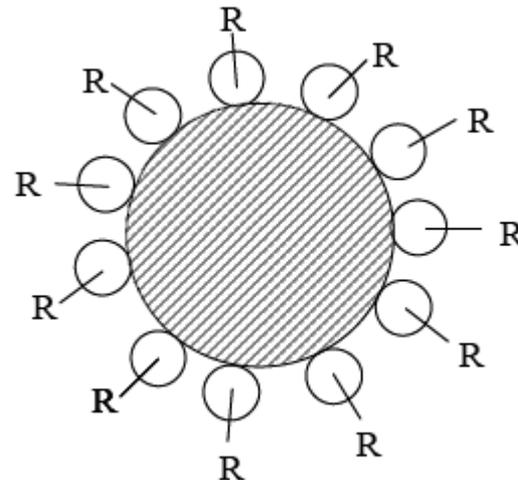
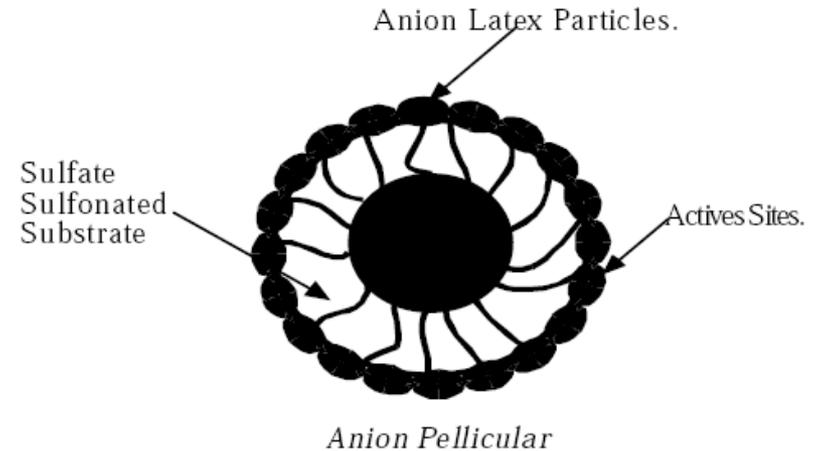
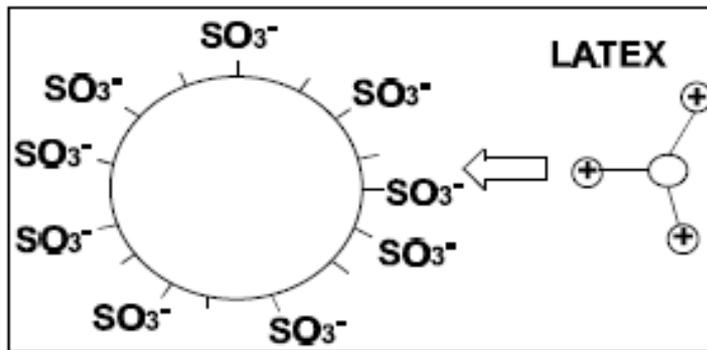
- 😊 Capacité d'échange élevée
- 😊 Gamme de pH élevée
- 😞 composés fortement retenus (temps d'analyse trop long)
- 😞 coût de fabrication élevé
- 😞 résistance mécanique médiocre

Les structures pelliculaires

Les sites actifs sont greffés à la surface d'un support compact et imperméable (silice ou latex) et non plus dans un réseau tridimensionnel

- ☺ Séparation rapide
- ☺ Excellente résistance mécanique
- ☹ Faible capacité d'échange
(on doit injecter de faibles volumes)

Exemple: structure pelliculaire:



Microbilles de latex agglomérées à la surface du polymère

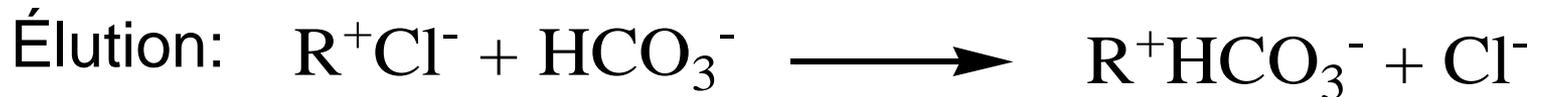
Les structures à base de silice

- Avantage:
 - bonne résistance mécanique
 - bonne accessibilité
 - grande capacité d'échange
- Inconvénient:
 - ne peut être utilisé si $\text{pH} \geq 8$
(gamme de pH 2-8)

Exemple de séparation en chromatographie ionique

- ❑ Solutés: échantillon contenant Cl^- , NO_3^- et SO_4^{2-} (eaux de consommation)
- ❑ éluant: mélange $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ et $\text{Na}^+_2\text{CO}_3^{2-}$

En symbolisant la résine par R^+ , on a les réactions suivantes:



Remarque: même réactions en considérant CO_3^{2-} au lieu de HCO_3^- et en prenant NO_3^- ou SO_4^{2-} à la place de Cl^- . On va séparer les trois espèces car le temps de résidence des composés sur les sites est propre à chaque espèce

En sortie de colonne, on a donc séparé Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} dans un bain de HCO_3^- et de CO_3^{2-} .

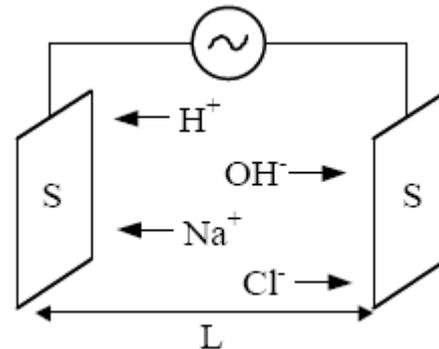
Pb: conductivité importante de l'éluant (HCO_3^- et de CO_3^{2-}) par rapport à la faible concentration des solutés (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-})



rôle du suppresseur d'ions

Principe de la détection conductimétrique

- La conductimétrie est le moyen de détection le plus utilisé en chromatographie ionique en raison de sa sensibilité élevée et de sa robustesse.



- Si on applique une différence de potentiel alternatif entre deux électrodes de surface S immergées dans la solution, la ddp génère un courant I entre des deux électrodes. Ce courant suit la loi d'Ohm ($E=RI$) et la mesure de la résistance électrique R permet ensuite de déterminer la conductance électrique G exprimée en Siemens

Principe de la détection conductimétrique

- La conductance électrique G :
- $G = 1/R$
- $G = \sigma S/L$ avec $\sigma =$ conductivité (Sm^{-1}), L étant la distance entre les deux électrodes.
- Or la conductivité est proportionnelle à la concentration:
- $\sigma = \sum z_i \lambda_i C_i$ avec $\lambda_i =$ conductivité ionique de l'ion ($\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$)

Principe de la détection conductimétrique

Anions	$\lambda -$	Cations	$\lambda +$
OH ⁻	198	H ⁺	350
F ⁻	54	Li ⁺	39
NO ₃ ⁻	71	Mg ²⁺	53
HCO ₃ ⁻	45	Ca ²⁺	60
Formate	55	Sr ²⁺	59
Acetate	41	Ba ²⁺	64
Propionate	36	Zn ²⁺	53
Benzoate	32	Hg ²⁺	53
SCN ⁻	66	Cu ²⁺	55
SO ₄ ²⁻	80	Pb ²⁺	71
CO ₃ ²⁻	72	CO ²⁺	53
C ₂ O ₄ ²⁻	74	Fe ³⁺	68
CrO ₄ ²⁻	85	La ³⁺	70
PO ₄ ³⁻	69	Ce ³⁺	70
Fe(CN) ₆ ³⁻	101	CH ₃ NH ₃ ⁺	58
Fe(CN) ₆ ⁴⁻	111	N(Et) ₄ ⁺	33

Le suppresseur d'ions

Le suppresseur est un dispositif que l'on utilise quand l'éluant est fortement ionique. Il s'agit de convertir **l'éluant fortement ionique** en une **espèce de faible conductivité**. Ainsi il est facile de repérer les espèces présentes dans l'échantillon à analyser (les solutés).

- La neutralisation de l'éluant a pour conséquence d'amplifier le signal dû aux ions à doser et de diminuer simultanément le bruit de fond dû à l'éluant.

Le suppresseur d'ions

- Les premiers suppresseurs consistaient en une colonne de type échangeur d'ions, dont les groupements fonctionnels étaient de charge opposée à ceux de la colonne de séparation.

Le supprimeur d'ions: Dosage d'un ion nitrate NO_3^-

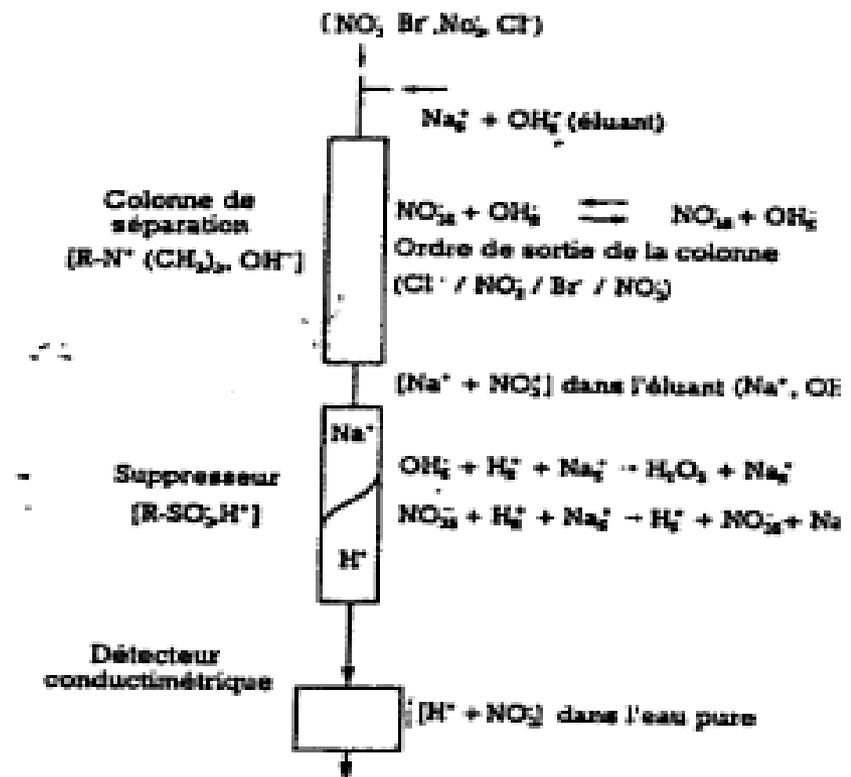
● À la sortie de la colonne de séparation NO_3^- est sous forme de NaNO_3 , dans l'éluant (NaOH).

● Le supprimeur permet l'échange d'ions sodium Na^+ contre des ions H^+ .

Après échange, NaNO_3 devient HNO_3 et NaOH devient H_2O .

HNO_3 est plus conducteur que NaNO_3 et H_2O est moins conductrice que NaOH .

● NO_3^- est alors détectable par conductimétrie parce que le signal dû à cet ion a été amplifié et que le bruit de fond dû à l'éluant a été diminué.



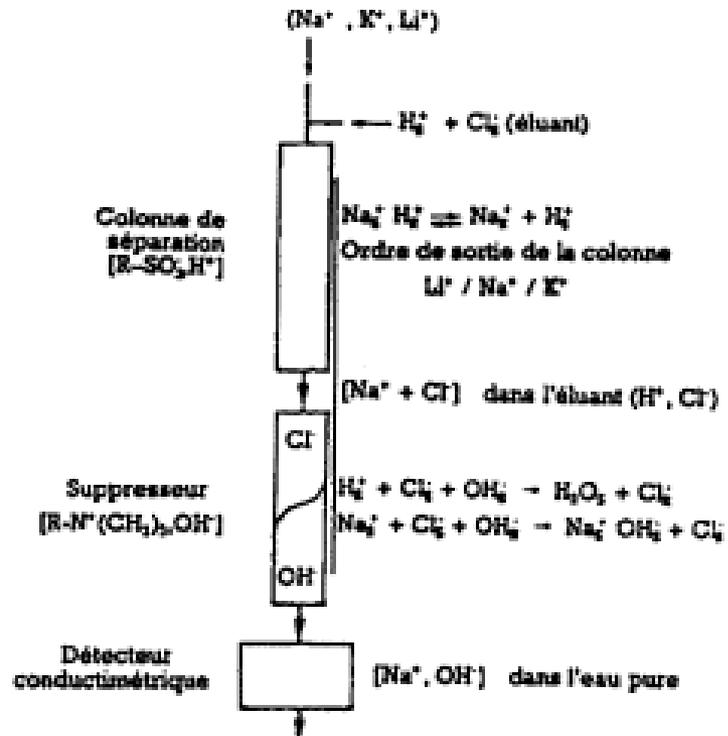
Le supprimeur d'ions: Dosage d'un ion sodium Na^+

Dosage d'un ion sodium

À la sortie de la colonne de séparation Na^+ est sous forme de NaCl dans HCl (éluant).

Après neutralisation, HCl est échangé en H_2O et NaCl en NaOH . NaOH est plus conductrice que NaCl et H_2O est moins conductrice que HCl .

Pour les mêmes raisons que lors du dosage d'anions, Na^+ peut être détecté en conductimétrie.



X_2 représente un ion X en solution

X_2 représente un ion X fixé sur la résine au niveau des sites échangeurs.

Applications de la chromatographie ionique

- **Séparation des acides aminés $H_2N-R-COOH$**
- *les acides aminés, en fonction du pH, peuvent être présents en solution sous forme moléculaire ou sous la forme d'anions ou de cations.*
- *Considérons, par exemple, le cas de la glycine $HOOC-CH_2-NH_2$ dont les pK_A sont respectivement 2,3 et 9,8 (le premier correspond à la constante d'acidité du couple $-COOH/-COO^-$, le second à la constante du couple $-NH_3^+/-NH_2$)*

- La glycine se comporte comme un cation pour des valeurs de pH inférieures à 3, comme un anion pour des valeurs de pH supérieures à 9 et comme une espèce non chargées dans la zone de pH intermédiaire où la forme zwitterionique prédomine.

Applications de la chromatographie ionique

Séparation des acides aminés $H_2N-R-COOH$

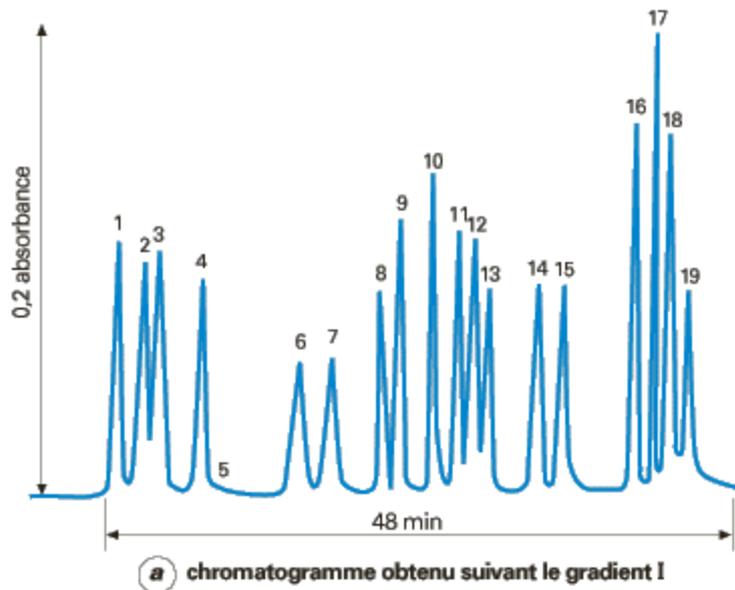
En milieu acide, l'espèce $^+H_3N-R-COOH$ prédomine et peut être fixée sur un échangeur de cations.

Si on élue avec des solutions de pH croissant, on doit observer l'élution des différents acides aminés dans l'ordre de leur pKa puisque lorsque $pH > pka$, c'est la forme $^+H_3N-R-CO_2^-$, globalement non chargée, donc non retenue qui prédomine. On fait souvent varier le pH de façon continu, en utilisant un gradient de pH.

En réalité l'ordre d'élution dépend également des dimensions des ions présents.

Applications de la chromatographie ionique

• *Séparation des acides aminés $H_2N-R-COOH$*



Nature des solutés :

- 1) acide aspartique, 2) thréonine, 3) sérine,
- 4) acide glutamique, 5) proline, 6) glycine, 7) alanine, 8) cystine, 9) valine,
- 10) méthionine, 11) isoleucine, 12) leucine, 13) norleucine, 14) tyrosine,
- 15) phénylalanine, 16) histidine, 17) lysine, 18) ammoniacque, 19) arginine,
- 20) tryptophane.

Colonne : longueur : 35 cm ; diamètre intérieur : 2,6 mm.

Phase stationnaire : résine échangeuse de cations du type Rank Hilger, 7 μm .

Phase mobile : mélange d'un tampon acide (citrate 0,2 M en Na^+ , pH = 2,2) et d'un tampon basique 0,2 M en Na^+ , pH = 11,5, soit citrate-phosphate, soit borate.

Débit : 0,16 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Température : 60 $^{\circ}\text{C}$.

Chromatographie de paires d'ions

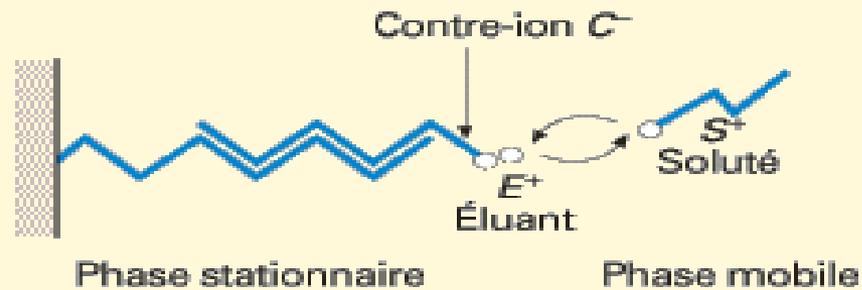
Chromatographie de paires d'ions

- La chromatographie de paires d'ions constitue une alternative à la chromatographie ionique pour l'analyse de composés ionisés ou ionisables.
- On utilise des phases stationnaires apolaires (C_8 ou C_{18})
- On utilise des phases mobiles (eau méthanol ou eau acétonitrile) contenant un agent d'appariement d'ions), ion de charge opposée à celle des solutés et comportant une partie hydrophobe.

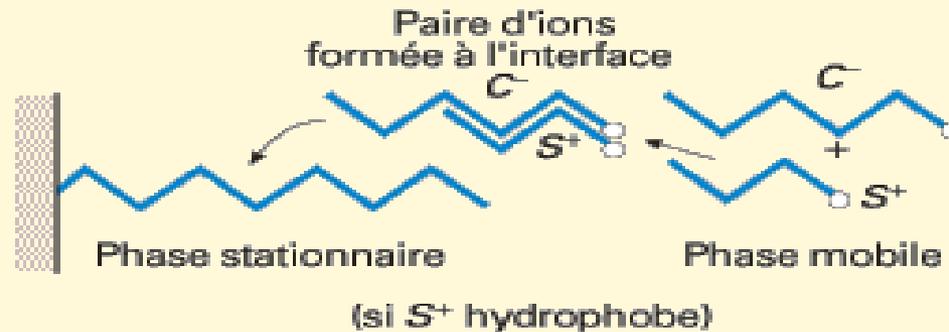
Chromatographie de paires d'ions

- Deux mécanismes de rétention coexistent:
- L'agent d'appariement d'ions interagit par effet hydrophobe à la surface des chaînes alkyle (la partie ionisée est dirigée vers la phase mobile polaire. On génère ainsi un échangeur d'ions. Le soluté interagit par mécanisme d'échange d'ions
- Les paires d'ions formées entre le soluté et l'agent d'appariement d'ions interagissent avec la phase stationnaire selon leur hydrophobie.

Chromatographie de paires d'ions



(a) échange d'ions dynamique



(si S^+ hydrophobe)

(b) partage

Chromatographie de paires d'ions

La rétention d'un soluté est d'autant plus importante que le soluté est plus ionisé.

Pour un acide H_a dont la constante d'acidité est K_a , on obtiendra une rétention maximale à $\text{pH} >$ ou $= \text{p}K_a + 2$ (99% de H_a est sous forme A^-)

Pour une base B dont la constante d'acidité du couple HB^+/B est K_a , on obtient la rétention maximale à $\text{pH} <$ ou $= \text{p}K_a - 2$ (99% de la base est sous forme protonée HB^+).

Chromatographie de paires d'ions

- **Les agents d'appariement d'ions:**

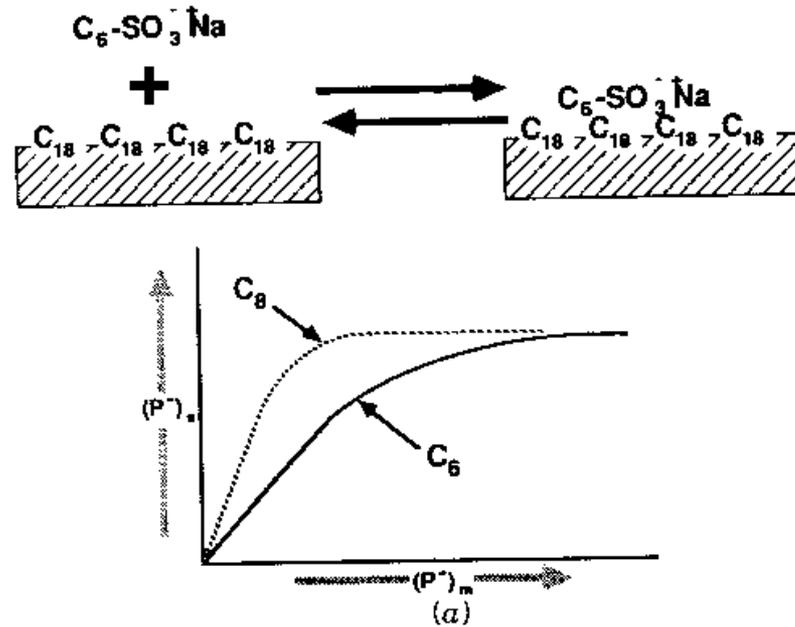
Les agents d'appariement d'ions utilisés sont soit des acides forts (acides sulfoniques ou sulfuriques), soit des bases fortes (ammonium quaternaire) de sorte qu'ils sont totalement ionisés quel que soit le pH.

Anioniques	Cationiques
Alkyl- et arylsulfonates pentanesulfonate hexanesulfonate octanesulfonate dodécanesulfonate camphosulfonate naphtalènesulfonate	Ammonium quaternaires tétraméthylammonium tétraéthylammonium tétrabutylammonium tétraheptylammonium cétyltriméthylammonium (cétrimide) palmityltriméthylammonium
Alkylsulfates hexylsulfate octylsulfate décylsulfate dodécylsulfate	Amines protonées octylammonium trioctylammonium
Anions inorganiques trifluoroacétate trichloroacétate phosphate perchlorate	

Chromatographie de paires d'ions

- **Influence de la concentration en agent d'appariement d'ions:**
- On observe une augmentation de la concentration de l'agent d'appariement d'ions dans la phase stationnaire, lorsque la concentration de cet agent d'appariement d'ions dans la phase mobile augmente. Puis un plateau.

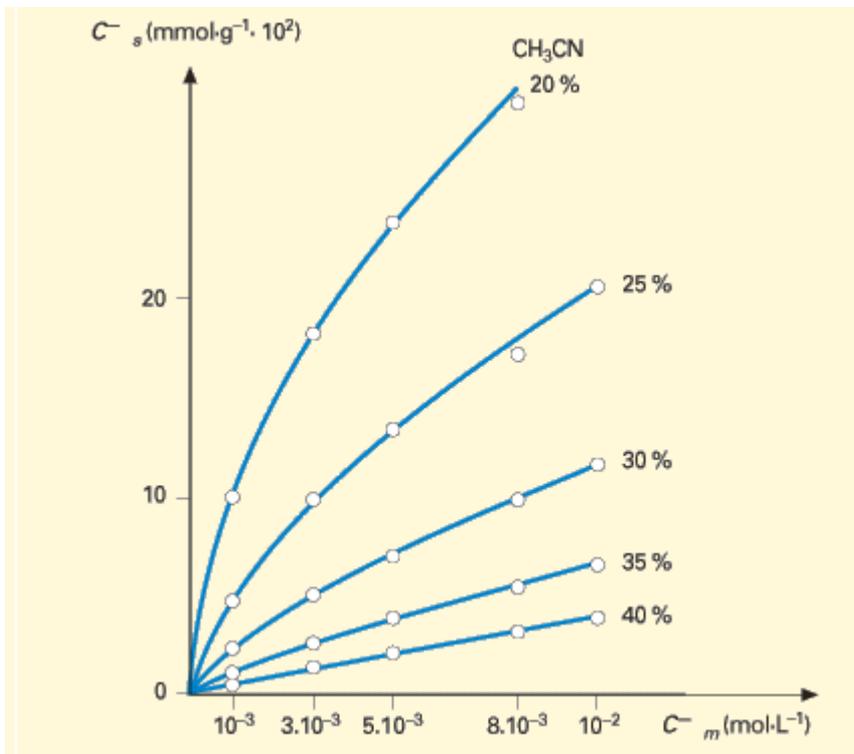
Chromatographie de paires d'ions



Cette fixation de l'agent d'appariements d'ions sur la phase stationnaire est d'autant plus importante que la chaîne hydrocarbonée (de l'agents d'appariement d'ions) est plus longue.

Chromatographie de paires d'ions

On a également démontré que plus la teneur en modificateur organique (exemple acétonitrile) est importante et plus faible est la fixation de l'agent d'appariement d'ions sur la phase stationnaire.



Colonne : longueur : 15 cm, diamètre intérieur : 4,8 mm.
Phase stationnaire : silice greffée octyle de type LiChrosorb RP 8, 10 μm .
Phase éluante : acétonitrile-eau v/v ; HClO_4 0,04 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
dodécanesulfonate de sodium à la concentration indiquée.
Débit : 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.
Détection : réfractométrie différentielle.
Température : 40 $^\circ\text{C}$.

Chromatographie de paires d'ions

- Comment varie le temps de rétention d'une espèce quand on augmente la concentration en agent d'appariement d'ions P- (influence de la force ionique):

colonne RP8
 phase = vente eau 10/ACUGO.
 $HClO_4$ 0,04 M
 agent appariement d'ions.
 Octane sulfonate
 de sodium.

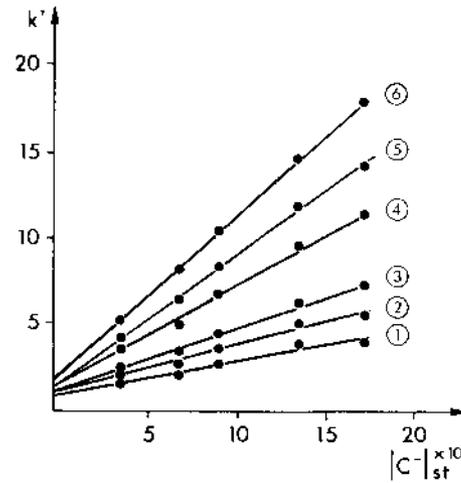


FIG. X.4. — Variation du facteur de capacité k' en fonction de la concentration du contre-ion dans la phase stationnaire.

Conditions opératoires : cf. figure X.2 sauf acétonitrile-eau : 10-90 v/v. Détection : UV à 254 nm. Solutés : 1 : pyridine ; 2 : méthyl-2 pyridine ; 3 : méthyl-3 pyridine ; 4 : diméthyl-2,4 pyridine ; 5 : diméthyl-3,4 pyridine ; 6 : triméthyl-2,4,6 pyridine.

Chromatographie de paires d'ions

Si l'on augmente la concentration de P- dans la phase mobile après avoir saturée la phase stationnaire que se passe-t-il ?

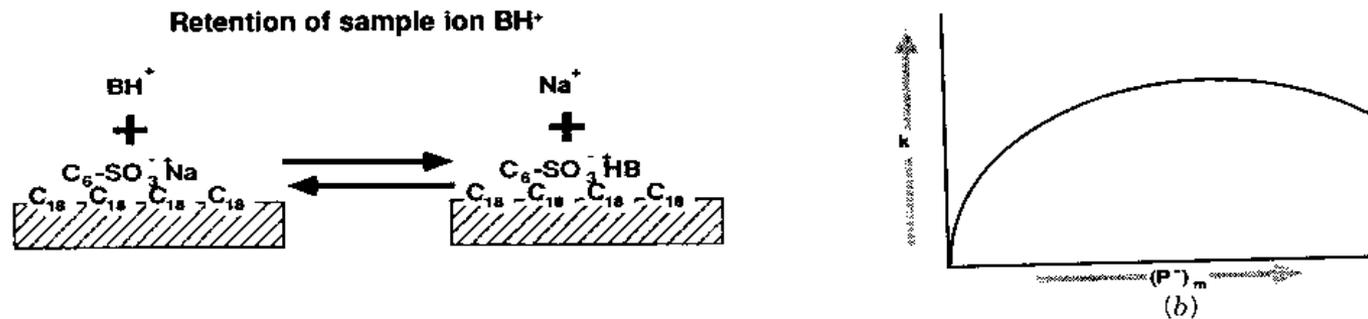


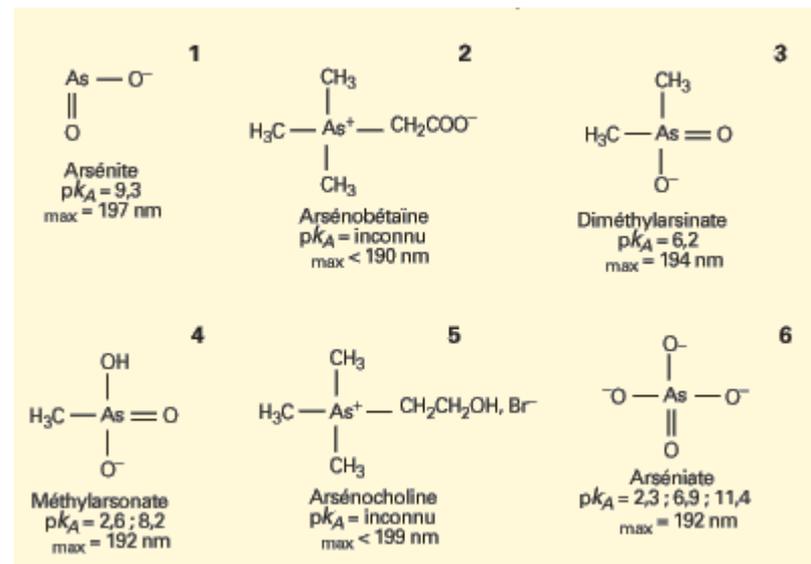
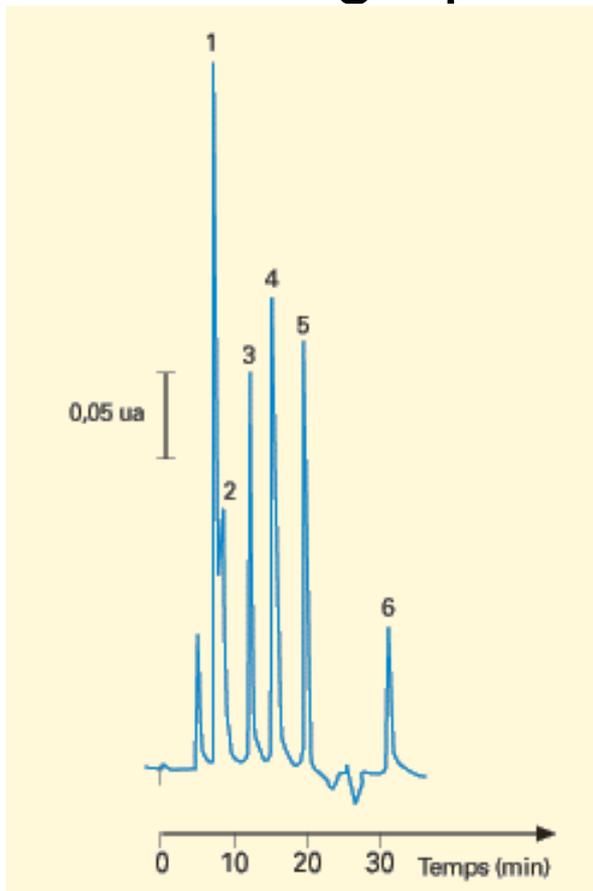
FIGURE 7.10 Effect of ion-pair reagent concentration on separation. (a) Sorption of the ion-pair reagent as a function of concentration for reagents of differing hydrophobicity (C₆- and C₁₈-sulfonates); (b) retention as a function of reagent concentration. See the text for details.

Chromatographie de paires d'ions

La rétention des solutés augmente avec la longueur de la chaîne hydrocarbonnée de l'agent d'appariement d'ion (augmentation du caractère hydrophobe ce qui est favorable à sa fixation par la phase stationnaire alkyle et à la formation de paires d'ions)

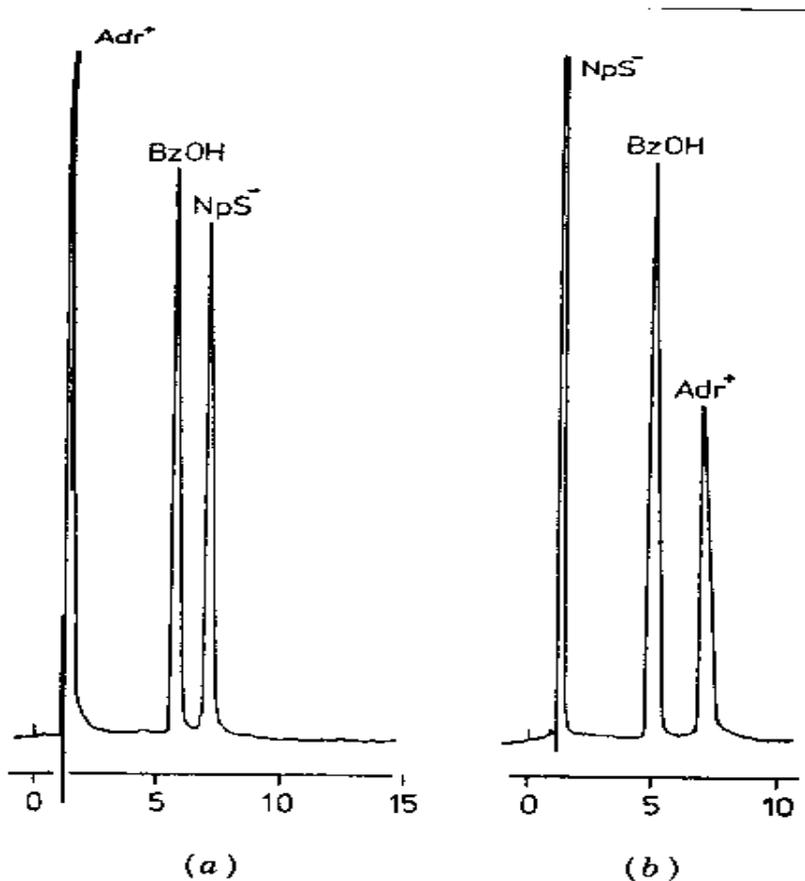
Chromatographie de paires d'ions

- Application:** Séparation d'anions arséniés par chromatographie de paires d'ions



Colonne : longueur : 25 cm, diamètre intérieur 4,6 mm.
 Phase stationnaire : silice greffée octadécyle (Partisil ODS 3, 5 μm).
 Phase mobile : solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 pH = 7,3 (ajusté par addition d'acide phosphorique).
 Débit : $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.
 Détection UV à 190 nm.

Chromatographie de paires d'ions



Adr⁺ : adrenaline, BzOH
alcool benzylique, NpS⁻
naphtalene sulfonate.

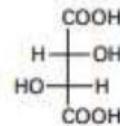
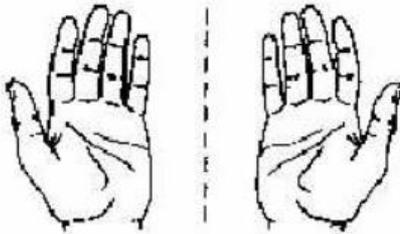
Colonne C18, tampon
phosphate 20mM, pH6 + 20%
méthanol.

(a) sans agent
d'appariement d'ions
(b) avec agent d'appariement
d'ions 14mM octane sulfate.

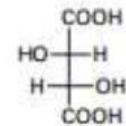
- **La chromatographie chirale**

Chiralité et énantiomères

- La chiralité constitue la propriété géométrique d'un objet (ou d'une molécule) de ne pas être superposable à son image dans un miroir.
- Exemples:



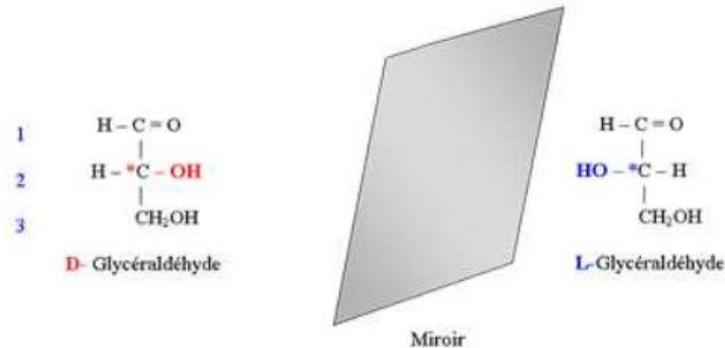
acide L-(+)-tartrique (naturel)



acide D-(-)-tartrique

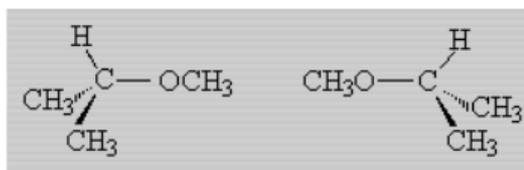
Chiralité et carbone asymétrique

- Dans le cas des molécules organiques, si un atome de carbone possède quatre atomes ou groupes d'atomes tous différents, ce carbone est dit «asymétrique » et constitue un centre de chiralité.
- Ce carbone est toujours marqué d'une étoile.



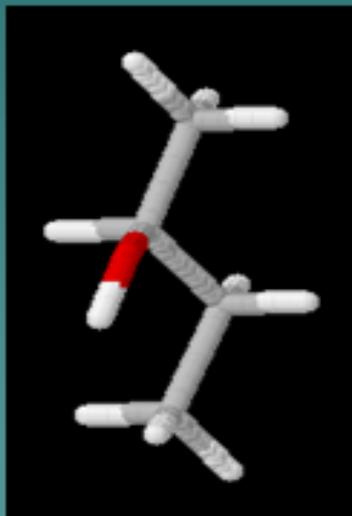
Chiralité et carbone asymétrique

- A l'inverse, si un objet est superposable à son image dans un miroir et s'il possède un élément de symétrie, il est qualifié d'achiral.
- Dans la molécule de 2-méthoxypropane, le plan de la page divise la molécule en deux parties identiques et les deux représentations de la molécule sont l'image miroir l'une de l'autre.
- Ainsi, le 2-méthoxypropane est une molécule achirale.

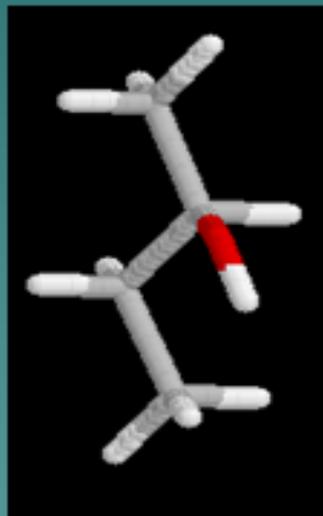


Qu'est ce que la chiralité?

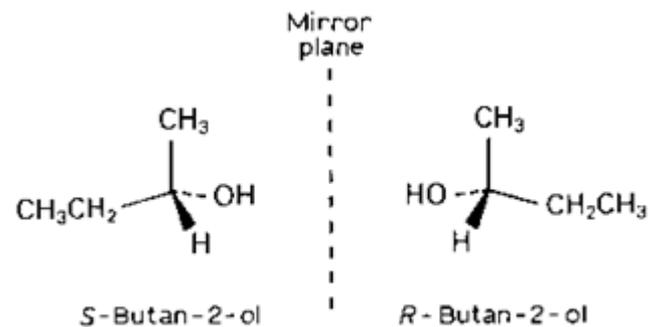
Exemple: le butan-2-ol



S-butane-2-ol



R-butane-2-ol



Les énantiomères: Caractéristiques et propriétés

- Deux molécules qui sont l'image l'une de l'autre dans un miroir et qui ne sont pas superposables sont appelées énantiomère.
- Deux objets qui sont l'image l'un de l'autre dans un miroir et qui ne sont pas superposables sont appelées énantiomorphe.
- Rq: Le terme « énantiomère s'emploie uniquement pour des molécules, le terme « énantiomorphe » se réfère à des objets.

Les énantiomères: Caractéristiques et propriétés

- Deux énantiomères possèdent les mêmes propriétés physiques (température de fusion et d'ébullition, masse volumique) et chimiques.
- Deux énantiomères ont même propriété physico-chimiques, à l'exception de leur action sur la lumière polarisée. L'activité optique ou pouvoir rotatoire a la même valeur numérique pour les deux entités mais de signe opposé. Séparation très difficile par des procédés chimiques habituels!
- Les molécules achirales ne possédant pas d'activité optique.

Les énantiomères: Caractéristiques et propriétés

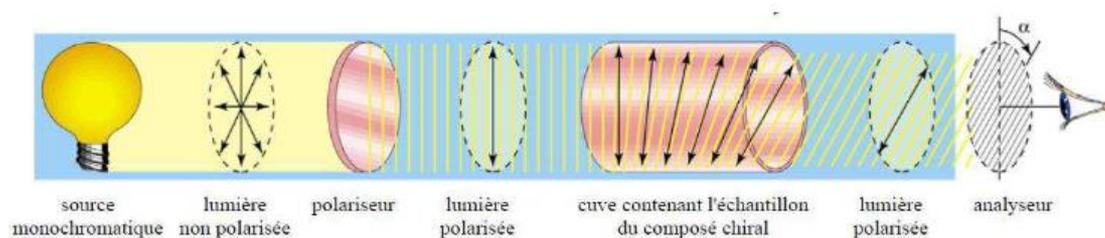
Quelques propriétés physico-chimiques de l'acide tartrique

Composé	<i>TF</i> (°C)	Densité <i>d</i>	Solubilité (g/100 g)	$[\alpha]$ (°.dm ⁻¹ .g ⁻¹ .cm ³)
(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-tartrique	170	1,76	147	+12
(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-tartrique	170	1,76	147	-12

Définition de l'activité optique (ou pouvoir rotatoire)

L'activité optique est la capacité d'une molécule à modifier l'orientation d'un plan de polarisation de la lumière.

Après la traversée d'un «milieu optiquement actif » (exemple : un énantiomère), l'orientation de ce plan est modifiée d'un angle α .



Définition de l'activité optique (ou pouvoir rotatoire)

Deux énantiomères ont des activités optiques identiques en valeur absolue mais de signe opposé.

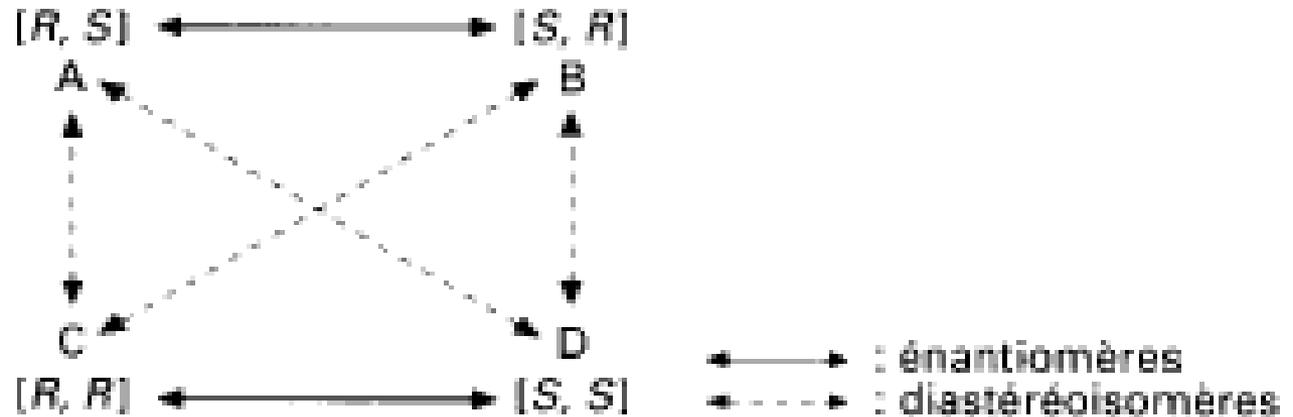
$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\pm \alpha}{\ell C}$$

C'est la loi de Biot

Où α est la rotation de la polarisation ou pouvoir rotatoire en degrés (°),
 ℓ est la longueur parcourue par l'onde (dm) ou chemin optique,
C est la concentration (g/litre ou g/dm³),

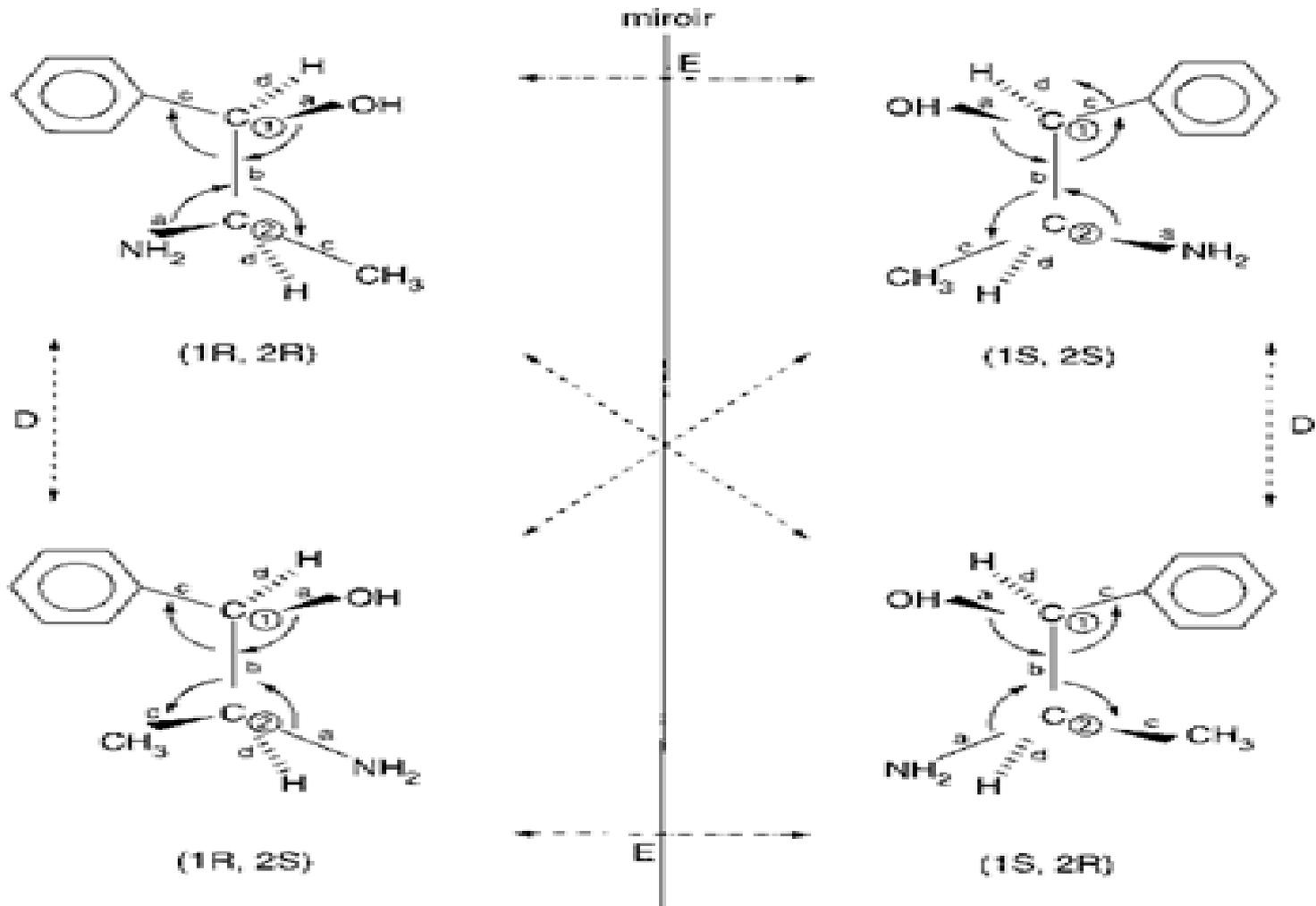
$[\alpha]$ est le pouvoir rotatoire *spécifique* ou activité optique de la substance optiquement active, à la température T (°C), et pour la longueur d'onde incidente λ (nm ou Å). En général, ce pouvoir rotatoire spécifique est mesuré pour une température de 20°C et pour la longueur d'onde de la raie D du sodium Na $\lambda = 589\text{nm}$, on notera alors : $[\alpha]_D^{20}$

Enantiomère/Diastéréoisomère



Composé ayant n centres d'asymétrie, on compte 2^n stéréoisomères et 2^{n-1} couples d'énantiomères. Exemple molécule renfermant 5 centres d'asymétrie, on peut prévoir 32 stéréoisomères se composant de 16 couples d'antipodes.

Enantiomère/Diastéréoisomère



D ----- Couples de diastéréoisomères

E ----- Couples d'énantiomères

Enantiomère/Diastéréoisomère

Les diastéréoisomères contrairement aux énantiomères ont des propriétés physicochimiques différentes (point de fusion, solubilité...) et peuvent être séparés par les méthodes classiquement utilisées en chromatographie.

Découverte de l'énantiométrie

- En 1811, ARAGO initie l'étude des milieux chiraux en découvrant ce qu'on appelle aujourd'hui l'activité optique du quartz cristallin.
- En 1815, Jean-Baptiste BIOT met en évidence le même phénomène dans des liquides organiques (comme l'essence de térébenthine, des solutions de camphre ou des huiles de citron), et prouve que l'activité optique peut avoir une origine moléculaire.
- En 1820, KESTNER, un industriel spécialisé dans la fabrication de l'acide tartrique à partir de sous-produits du vin, obtient accidentellement, un produit jusqu'alors inconnu, de même composition que l'acide tartrique mais sans activité optique. Ce produit inconnu sera appelé acide racémique (« acide du vin ») par GAY-LUSSAC.

Découverte de l'énantiométrie

- En 1848, KESTNER confie un échantillon d'acide racémique à Louis PASTEUR.
- En faisant cristalliser le sel de sodium et d'ammonium de cet acide, Pasteur obtient deux types de cristaux dissymétriques et images l'un de l'autre dans un miroir mais non superposables.
- En testant leur pouvoir rotatoire en solution, il s'aperçoit que les cristaux droits ont les mêmes propriétés de rotation que l'acide tartrique droit.
- Il s'aperçoit de plus que les cristaux gauches ont une rotation exactement opposée à celle des cristaux droits.
- Il suppose alors que les deux composés de l'acide racémique qu'il a séparés ne diffèrent que par des structures images l'une de l'autre dans un miroir: il introduit le concept de dissymétrie moléculaire

Découverte de Pasteur 1848

Discrimination chirale: cristallisation

Pasteur a démontré qu'il était possible de résoudre un mélange **racémique** en le faisant réagir avec un composé possédant une **dissymétrie**.



Formation de **diastéréoisomères** à l'aide

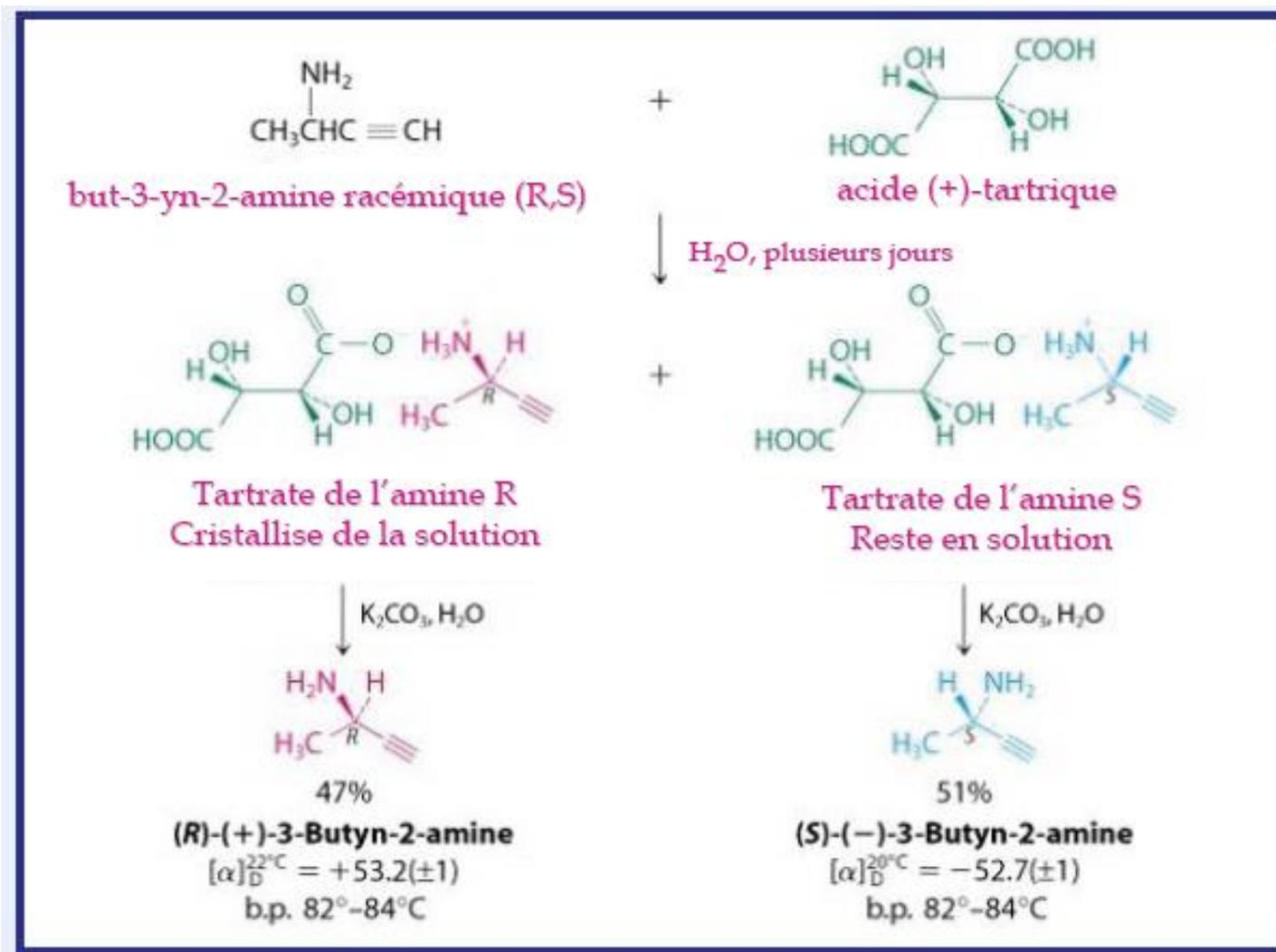
d'un réactif chiral, l'auxiliaire

R'

Les 2 **diastéréoisomères** obtenus possèdent des **propriétés différentes**.

● **Résolution** de la but-3-yn-2-amine:

- **Auxiliaire chiral**: acide (+)-tartrique.
- Formation de sels **diastéréoisomères**; l'un cristallise, l'autre ne cristallise pas.



Importance des séparations chirales

- Les séparations chirales ont une grande importance dans les domaines variés.
- **Pharmacologie:** Les récepteurs chimiques présentent une configuration spatiale tridimensionnelle bien définie et asymétrique, si bien que dans le cas de médicaments chiraux, les interactions entre le médicament et le récepteur sont favorables pour l'un des deux énantiomères et non pour les deux.

Propriétés pharmacologiques et activité biologique

- Sur le plan thérapeutique, **un eutomère** (E) définit l'énantiomère dont l'activité biologique est la plus forte ou dont l'affinité relative de liaison à un récepteur biologique ou une enzyme est la meilleure.
- Par opposition, **un distomère** (D) représente un énantiomère dont l'activité biologique est la moins forte ou dont l'affinité relative de liaison à un récepteur biologique ou une enzyme est la plus faible ou nulle

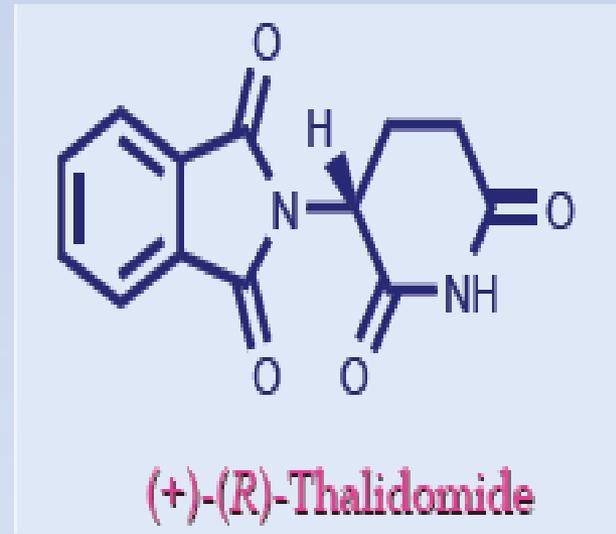
Propriétés pharmacologiques et activité biologique

- Souvent un seul énantiomère, l'énantiomère actif, a une activité pharmacologique alors que l'autre énantiomère est inactif et peut au contraire conduire à l'apparition d'effets secondaires.

La thalidomide: importance de la chiralité

- Sédatif non barbiturique avec des propriétés anti-nauséuses retiré en 1961 à cause de ses effets secondaires tératogènes:

➤ <http://archives.radio-canada.ca/400d.asp?id=0-16-65-870>



- Vendue comme mélange racémique, *rac*-Thalidomide (Contergan®).

La tragédie sanitaire de la thalidomide

- La thalidomide (mélange racémique) est un médicament utilisé durant les années 1950 et 1960 comme sédatif et anti-nauséeux notamment chez les femmes enceintes. Après quelques années de commercialisation, de nombreuses malformations chez les nouveau-nés ont été attribuées à l'usage de la thalidomide



La tragédie sanitaire de la thalidomide

- Une étude pharmacologique sur des animaux a démontré que cette activité tératogène était essentiellement due à l'énantiomère (+) alors que l'activité anti-nauséuse et sédative était portée par l'énantiomère (-).
- Des études plus récentes ont démontré que la thalidomide se racémise aisément dans le sang, ce qui montre que même l'emploi thérapeutique de la (L)-thalidomide était voué à l'échec.
- La thalidomide (mélange racémique) est aujourd'hui utilisée dans le traitement de nombreuses tumeurs cancéreuses. Cependant le rapport européen public d'évaluation de la Thalidomide (CELGENE) énonce clairement les précautions d'emploi de la thalidomide liées à ses effets tératogènes : pas de prise de ce médicament ni pour les femmes enceintes, ni pour les femmes susceptibles de devenir enceintes.

Conséquences de la chiralité

Limitations dans le développement de médicaments:

- Chaque énantiomère est un xénobiotique **différent** avec **potentiellement** son propre devenir lors d'interactions avec un organisme vivant !

- Stéréosélectivité importante dans le métabolisme:

- Interactions **stéréosélectives** avec les **enzymes** du métabolisme.

- Stéréosélectivité de substrat:

- Les énantiomères sont métabolisés à des vitesses différentes:
⇒ *Exemples très abondants dans la littérature.*

- Métabolisme stéréosélectif peut engendrer des problèmes de toxicité.

Relations entre la chiralité et l'activité biologique d'un médicament

- Les énantiomères présentent qualitativement et quantitativement la même activité.

(Exemple: Prométhazines (+) et (-), Antihistaminiques H1)

- Les énantiomères possèdent qualitativement le même type d'activité mais d'intensités différentes: Ils ont la même activité biologique mais l'affinité de fixation au récepteur est plus importante pour un des énantiomères, on parle donc d'interactions stéréosélectives

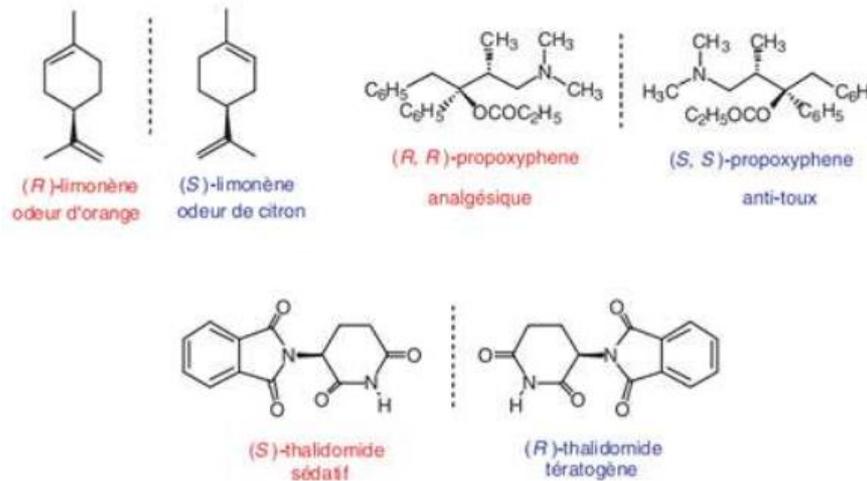
(Exemple : L'énantiomère (R) de l'adrénaline est plus vasoconstricteur que l'énantiomère (S))

Relations entre la chiralité et l'activité biologique d'un médicament

- Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est inactif (exemple: dans le cas de l'ibuprofène, l'action antalgique et antirhumatismale est présente exclusivement chez l'énantiomère (S), l'énantiomère (R) ne possède pas ces actions mais n'est pas toxique, d'où la commercialisation du mélange racémique.
- Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est toxique (exemple: dans le cas de la lévodopa, précurseur de la dopamine utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson, seul l'énantiomère (S) est retenu car l'énantiomère (R) est toxique (risque d'agranulocytose), cas de la thalidomide

Propriétés pharmacologiques et activité biologique

- En effet, les activités biologiques de deux énantiomères peuvent être différentes

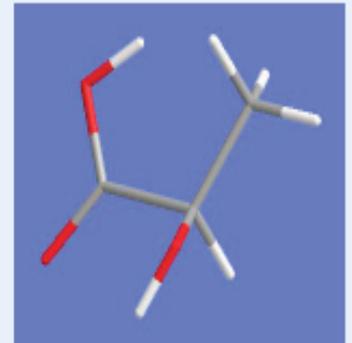


Importance des séparations chirales

- **l'agrochimie:** de nombreux herbicides et pesticides possèdent un ou plusieurs centre(s) d'asymétrie. En utilisant uniquement la forme active, cela permettrait de diminuer les quantités répandues et ainsi la pollution.
- **arômes, parfums...**

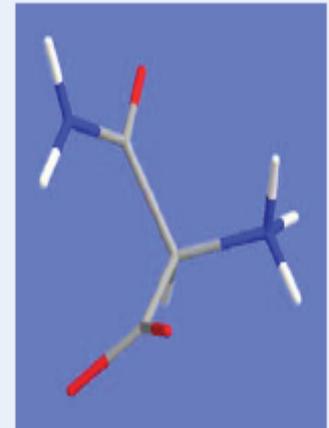
Conséquences de la chiralité

- L'acide (2*R*)-lactique est l'acide (2*R*)-2-hydroxypropanoïque, représenté sur l'image du haut. Il est *lévogyre* (-).
 - Ce composé a été découvert par Scheele dans **le lait** laissé longtemps à l'air (on dit que "le lait est tourné").
 - Son énantiomère, l'acide (2*S*)-lactique (image de droite) est *dextrogyre* (+). On le trouve **dans le sang**. Son accumulation dans les muscles, chez les sportifs soumis à un long effort est à l'origine des crampes.



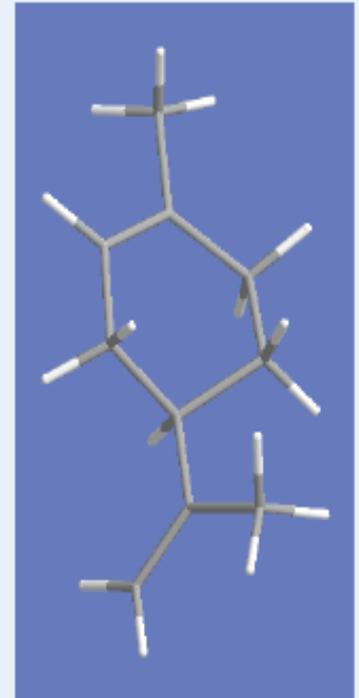
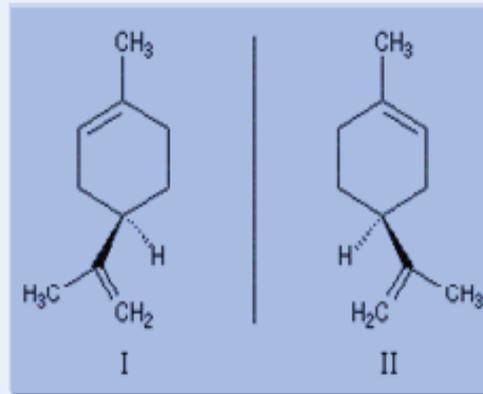
Conséquences de la chiralité

- La (S)-asparagine est représentée ci-dessous:
 - Elle se trouve à l'état naturel dans les jeunes asperges auxquelles elle confère **une saveur amère** caractéristique.
 - A. Piutti découvrit en 1886 que son énantiomère d'origine synthétique, la (R)-asparagine (II), possède un **goût sucré**.



Conséquences de la chiralité

- Le limonène est constitué de deux énantiomères qui sont utilisés dans l'industrie des parfums :
 - Le (R)-limonène (image ci-contre) possède une **odeur d'orange**.
 - Le (S)-limonène a une **odeur de citron**.



Fabrication industrielle de principes actifs sous forme d'un seul énantiomère

- La tragédie sanitaire de la Thalidomide a eu des répercussions importantes sur l'industrie pharmaceutique en mettant l'accent sur la prudence nécessaire à la commercialisation d'un médicament racémique.
- Dans le cas où l'étude des propriétés pharmacocinétiques (absorption, distribution, biotransformation et excrétion), des activités pharmacologiques (qualitatives et quantitatives) et des effets toxicologiques conduisent à des différences importantes, le développement de l'énantiomère seul devient évident.
- Synthèse énantiosélective et séparation chirale

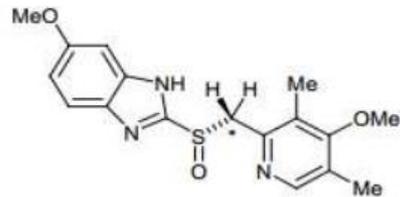
Le « chiral switch »

- Depuis une dizaine d'années, les brevets couvrant les médicaments sous forme de mélange racémique expirent, laissant place à la mise sur le marché des génériques de ces médicaments.
- Pour lutter contre cette concurrence des génériques, les entreprises pharmaceutiques ont commercialisé un des énantiomères du médicament racémique.
- Cette stratégie est appelé le chiral SWITCH

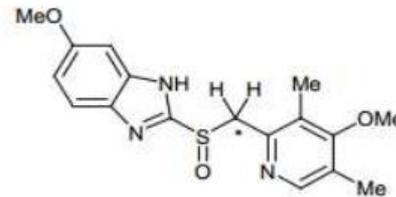
Le « chiral switch »

- Exemple:

L'énantiomère (S) de l'Oméprazole est plus efficace que l'Oméprazole (mélange racémique) en raison de son métabolisme hépatique, plus faible que celui de l'Oméprazole (mélange racémique).



(S)-enantiomer
Nexium



(RS)-racemate
Prilosec

Le « chiral switch »

Médicament énantiopur	Actions / Indications	Raisons de la commercialisation de l'énantiopur
L-dopa (Enantiomère R)	Maladie de Parkinson	Réduction des effets indésirables observés avec le médicament racémique (nausée, vomissements, anorexie, mouvements involontaires, granulocytopénie)
(S)-Kétamine (Enantiomère S)	Anesthésique	Enantiomère S plus actif et réduction des effets secondaires liés à l'énantiomère R (effets post-anesthésique : hallucinations, agitation)
Dexketapofène (Enantiomère S)	Anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS)	Action pharmacologique réside dans l'énantiomère S. Réduction de la dose administrée par rapport au mélange racémique

Comment obtenir un des deux énantiomères

- Soit par une méthode de synthèse asymétrique permettant d'obtenir un seul énantiomère (synthèse énantiosélective)
- Soit par une méthode permettant la séparation des deux énantiomères d'un mélange racémique

Synthèse asymétrique

- La synthèse organique fournit presque toujours le racémique. Les conditions de température (chauffage prolongé) et des pressions (parfois très réduite) favorisent la racémisation des antipodes optiques.
- La synthèse assymétrique consiste à préparer un produit sous forme d'un énantiomère en partant d'une matière première achirale.
- La synthèse asymétrique a connu au cours de ces dernières années un développement considérable (Synthèse d'acides aminés, des antibiotiques, des phéromones, du menthol, les parfums, les composés agrochimiques....)

Exemple de synthèse asymétrique

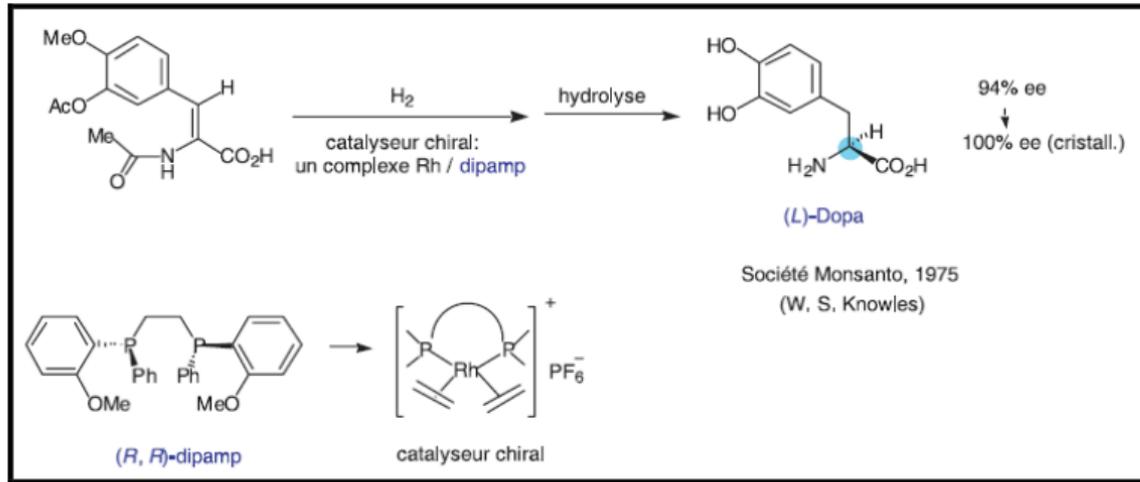
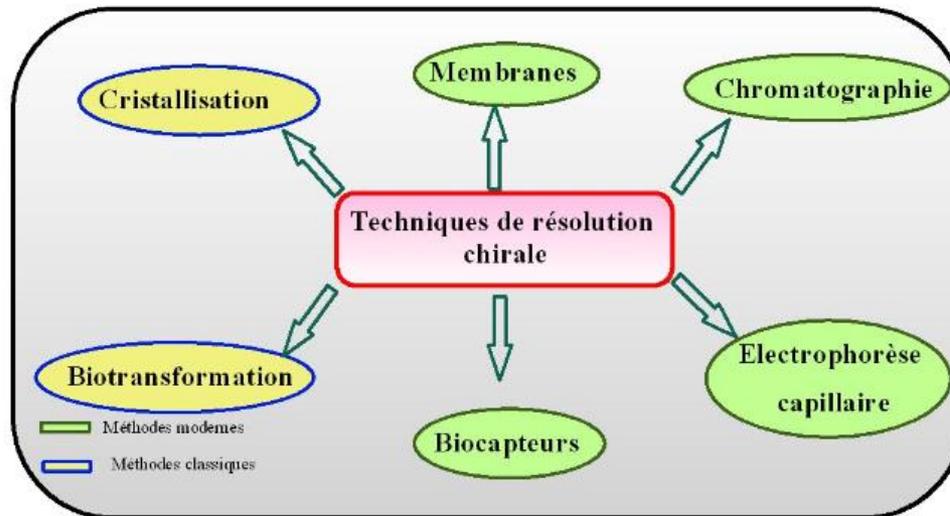


Figure 1 : Synthèse asymétrique industrielle de la L-DOPA [6].

La première synthèse asymétrique industrielle a été la préparation de la L-DOPA, en 1975, par W. S. Knowles (prix nobel en 2001) en utilisant un catalyseur chiral, un complexe de rhodium ayant une phosphine chirale (dipamp) comme ligand chélatant.

La L-DOPA a ensuite été commercialisée comme médicament antiparkinsonien par la société Hoffmann-La-Roche

Les différentes techniques de résolution chirale



Les biotransformations

- Les méthodes de résolution enzymatique, utilisant l'enzyme comme catalyseur chiral ont attiré l'attention des chercheurs grâce à la simplicité de leur mise en œuvre.
- Les enzymes sont des composés optiquement purs, elles constitue donc des catalyseurs chiraux. Exemple: les enzymes les plus utilisées sont celles qui catalysent l'hydrolyse des esters et des amides (estérases, lipases, peptidases, acylases) et celles qui favorisent l'oxydation des alcools en cétones ou en aldéhydes (déshydrogénases).

Les biotransformations

- Dans certains cas, la réaction se déroule dans un incubateur contenant un microorganisme qui produit l'enzyme appropriée durant la fermentation.
- Si on laisse fermenter de la levure de bière, de vin ..., en présence de sucres et d'acides aminés en mélange racémique, la levure consomme les acides aminés naturels (configuration L) et ne touche pas à leurs énantiomères (configuration D).

La biocatalyse

- **La biocatalyse** consiste à utiliser des enzymes comme catalyseurs.
- L'enzyme est combinée avec un mélange racémique. L'enzyme réagit préférentiellement avec un des énantiomères, l'autre énantiomère restant inchangé. Le produit final est un mélange entre l'énantiomère qui n'a pas réagi et le dérivé de l'énantiomère qui a réagi .
- Le mélange obtenu doit ensuite faire l'objet d'une séparation comme par exemple une réaction de précipitation, une extraction....

La biocatalyse

- Mais, il n'est pas toujours aisé de trouver l'enzyme la plus appropriée à un substrat.
- De plus, le succès d'une technologie enzymatique est lié à divers facteurs environnementaux (pH et taux d'oxygène dissous).
- Ainsi ces différents inconvénients constituent souvent un obstacle à l'essor des opérations enzymatiques, notamment à l'échelle industrielle.

La cristallisation

- Méthode employée initialement par Pasteur
- **La cristallisation** dont le principe repose sur la formation de sels de diastéréoisomères, formés par réaction entre les énantiomères et un réactif optiquement pur.
- Les diastéréoisomères obtenus contrairement aux énantiomères possèdent des propriétés physico-chimiques différentes et peuvent donc cristalliser sélectivement.

La cristallisation

- Malheureusement, cette technique présente plusieurs inconvénients :
 - mise en œuvre longue,
 - nécessité de posséder un réactif de très grande pureté énantiomérique, racémisation possible du centre chiral (soit au niveau du composé lui-même, soit au niveau du réactif).
 - le composé chiral doit posséder un groupement fonctionnel permettant la dérivation.

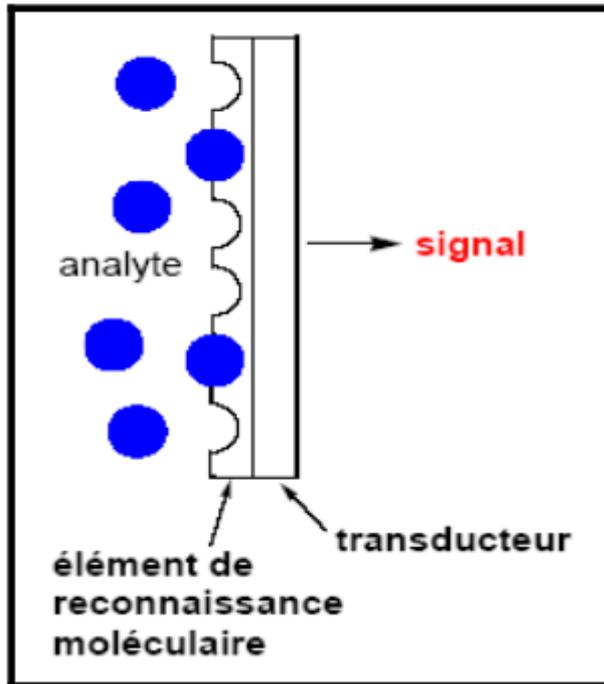
Les Membranes

- Utilisation de membranes pour la résolution des racémiques
- Principe fondé sur la différence de concentration énantiomérique dans les solutions situées des deux côtés d'une membrane qui empêche les deux phases organiques de se mélanger.
- La membrane reste perméable à un des deux isomères optiques.
- Exemple de membrane: polymère énantiosélectifs
- Exemple de racémiques résolus par cette approche: l'ibuprofène, les acides aminés
- Procédé qui permet de résoudre une quantité de plus d'une tonne de mélange racémique et qui permet d'obtenir des énantiomères de grande pureté optique.

Les biocapteurs

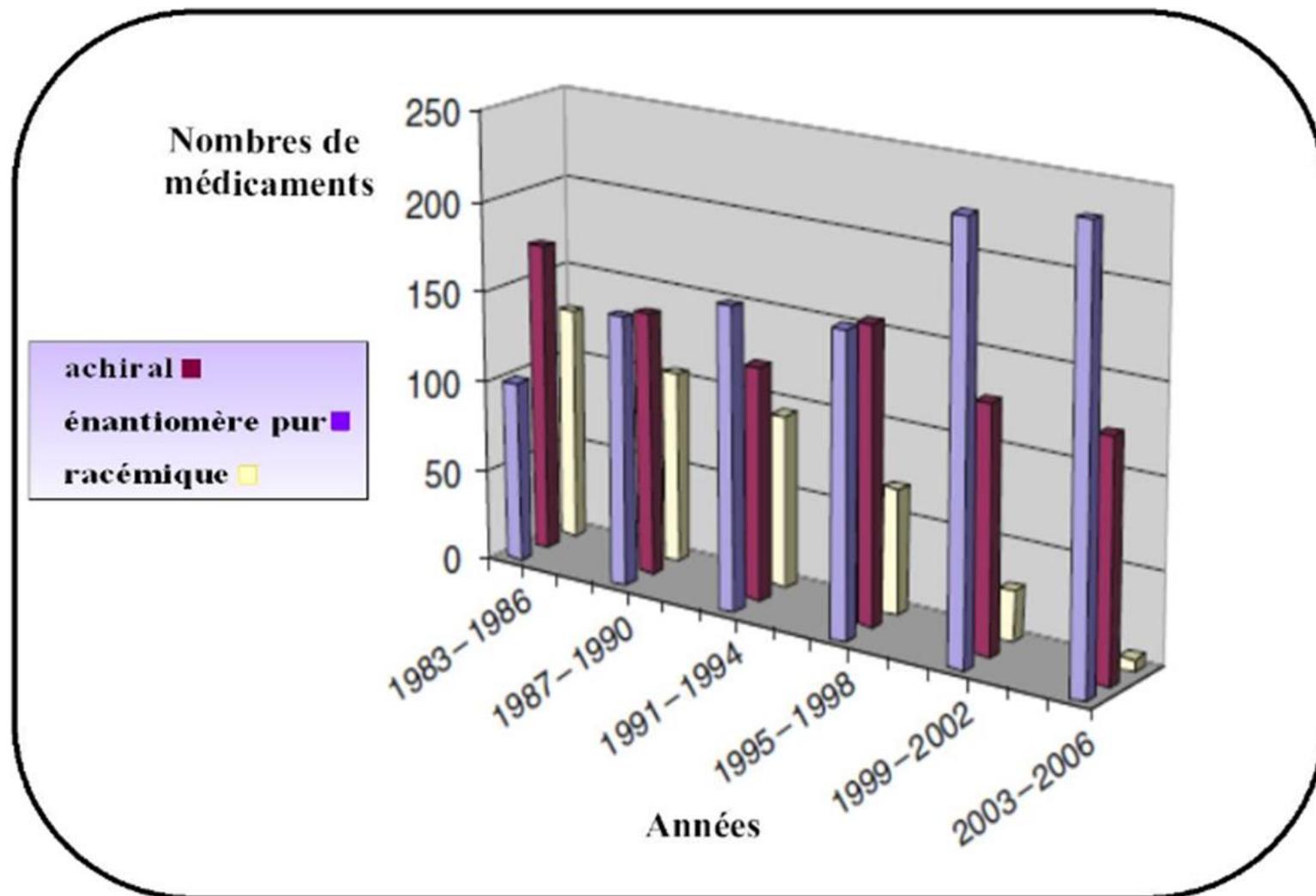
- Les biocapteurs possèdent un champ d'applications extrêmement large (domaine biomédical, environnemental, biotechnologie et agroalimentaire)
- Un biocapteur est constitué d'une membrane qui comprend une espèce d'origine biologique (enzyme, anticorps, récepteur...), permettant la reconnaissance moléculaire et d'un transducteur chargé de convertir le signal biologique (fixation d'un ligand sur un récepteur) en un signal physique (électrique ou lumineux par exemple) mesurable et aisément exploitable

Les biocapteurs



Ces biocapteurs font intervenir de nombreux sélecteurs chiraux: les cyclodextrines, les antibiotiques macrocycliques, les éthers couronnes, les aptamères....

Les médicaments...



Les médicaments...

- **Chiralité et industrie pharmaceutique:**

- L'industrie pharmaceutique s'intéresse très fortement aux médicaments énantiopurs:
- D'un point de vue économique, cette approche présente un grand intérêt pour l'industriel: un médicament comportant un seul énantiomère en lieu et place du racémique est considéré comme un principe actif nouveau, prolongeant ainsi, la durée de vie du brevet d'exploitation.
- Par ailleurs, les médicaments énantiopurs, permettent aussi de diminuer donc d'économiser la quantité de matière première administrée.

Les médicaments...

- **Chiralité et industrie pharmaceutique:**
- L'augmentation de la demande en composés énantiopurs dans l'industrie pharmaceutique a stimulé
 - Le développement de nouvelles sociétés spécialisées dans la synthèse asymétrique
 - Le développement de nouvelles méthodes de séparation des énantiomères

Méthodes permettant de différencier les énantiomères

- Différentes techniques de détermination de la pureté optique ou énantiomérique existent:
- **Méthodes sans séparation:** la polarimétrie et la RMN (on utilise un solvant chiral, on forme des diastéréoisomères)
- **Méthodes avec séparation:** la recristallisation fractionnée (basée sur les différentes de solubilité des deux antipodes d'un racémique) et la chromatographie (CLHP, CCM, CPS (chromatographie en phase supercritique, CPG, les méthodes électrophorétiques (ECZ (électrophorèse capillaire de zone, ECC (l'électrochromatographie capillaire)

Méthodes permettant de différencier les énantiomères

- Les propriétés physico-chimiques de deux énantiomères sont identiques sauf lorsqu'ils sont placés dans un environnement dissymétrique (Séparation chromatographique alors possible entre deux énantiomères). On peut utiliser la CLHP, la CCM, la CPG, l'EC et la chromatographie en phase supercritique.
- 80% des séparations chirales sont effectuées en chromatographie en phase liquide (CLHP)

La chromatographie chirale

- Technique qui s'est fortement développée dans les années 1970-1980

Séparation énantiomères

- 3 Possibilités:

Méthode 1:

Les énantiomères sont transformés chimiquement en diastéréoisomères et séparés ensuite avec des phases stationnaires et mobiles achirales (mode indirect)

Séparation énantiomères

Méthode 2:

Un agent chiral est ajouté à la phase mobile dans laquelle vont se former des complexes diastéréoisomères séparables sur les phases stationnaires habituelle (mode direct)

Séparation énantiomères

Méthode 3:

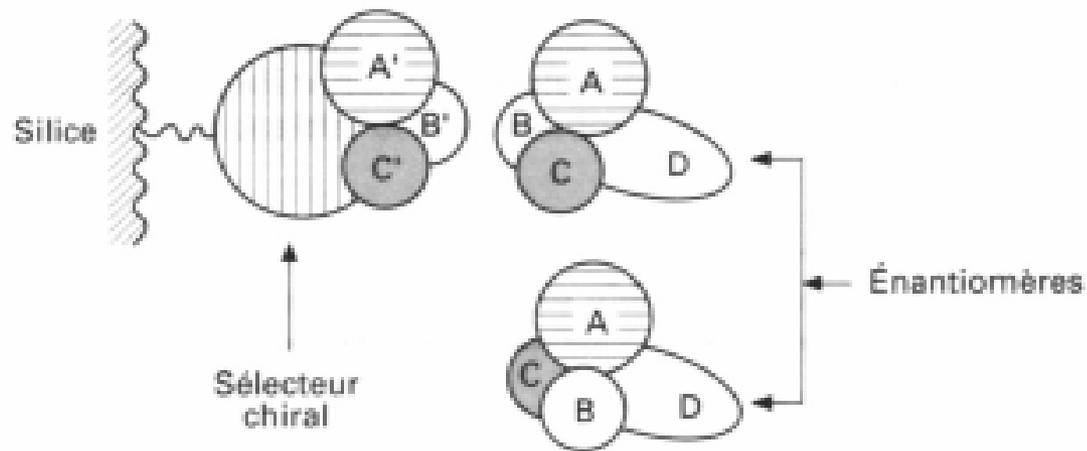
La séparation repose sur la formation de complexes diastéréoisomères labiles entre les énantiomères et la phase stationnaire chirale

(mode direct)

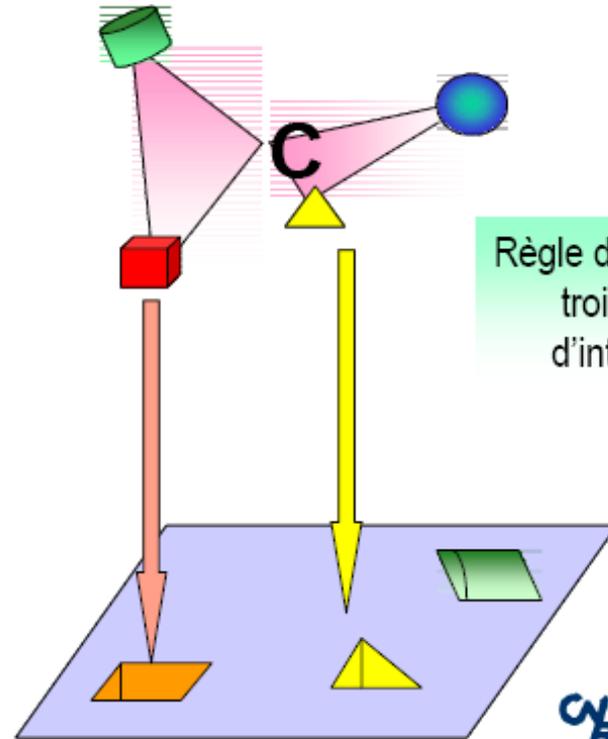
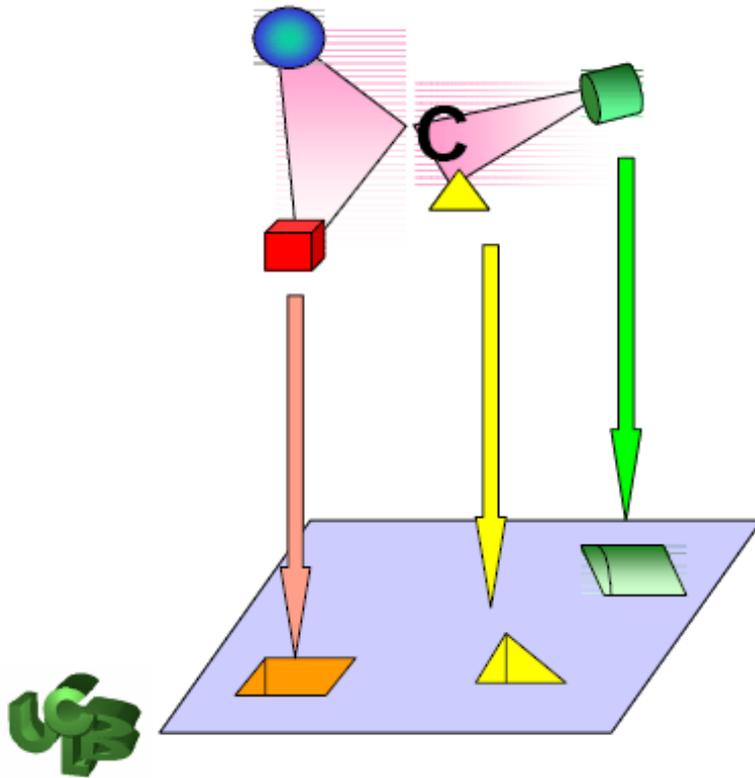
Règle des trois points

- La séparation des énantiomères repose sur la formation de complexes diastéréoisomères entre le racémate et un sélecteur chiral.
- La stéréosélectivité dépend de la différence de stabilité des diastéréoisomères ainsi formés.
- Règle des trois points (règle de Dalglish): deux énantiomères seront séparés si au moins trois interactions simultanées (AA', BB', CC') ont lieu avec l'un des énantiomères.

Règle des trois points



Règle des trois points



Règle de Dargliesh :
trois points
d'interaction

Type de chromatographie chirale

- Chromatographie en phase liquide
- Chromatographie en phase gazeuse
- Chromatographie en phase supercritique

- Chromatographie chirale en phase liquide

Méthode 1:

Séparation chirale en mode indirect

*Formation de diastéréoisomères
par dérivation précolonne*

Séparation chirale en mode indirect

Formation de diastéréoisomères par dérivation précolonne

- On fait réagir de façon préalable le racémate avec un réactif optiquement pur de manière à former des diastéréoisomères. Ces composés ayant des propriétés physico-chimiques différentes pourront être séparés avec des phases stationnaires et mobiles classiques.
- Cette méthode est limitée aux molécules ayant des fonctions réactives (amines, acides, alcools...)

Séparation chirale en mode indirect

- La formation de diastéréoisomères par dérivation précolonne doit respecter certaines conditions:
- Le réactif chiral doit être optiquement pur
- La réaction de dérivation doit être rapide et quantitative
- La séparation des dérivés diastéréoisomères doit être aisée

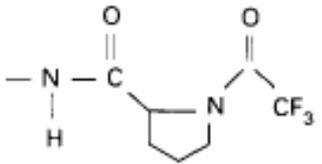
Séparation chirale en mode indirect

Cette méthode permet parfois d'améliorer simultanément la sensibilité car il est possible d'ajouter un groupement fluorophore, qui pourrait améliorer la détection globale du composé par fluorimétrie.

Cette méthode est limitée aux molécules possédant des groupements fonctionnels permettant la dérivation (amines, alcools, acides, etc),

Réactifs de dérivation chirale

- De nombreux réactifs de dérivation chirale sont disponibles commercialement.

Tableau 2 – Principaux réactifs de dérivation chiraux utilisés en chromatographie en phase liquide [3]			
Transformation du groupement fonctionnel	Réactif de dérivation chirale	Structure après dérivation	Type de soluté
$-\text{NH}_2 \longrightarrow -\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} - \text{R}$	Dérivés <i>N</i> -carboxy-anhydrides ou <i>tert</i> -butoxycarbonyl d'acides aminés <i>L</i>	$-\text{NH} - \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} - \text{CH} - \text{NH}_2$ <p style="text-align: center;"> R'</p>	Acides aminés
	Chlorure <i>N</i> -TFA-propyl		Amino-alcools
	Chlorure d'acide (<i>S</i>)- <i>O</i> -méthyl-mandélique	$-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} - \text{CH} - \text{C}_6\text{H}_5$ <p style="text-align: center;"> OCH₃</p>	

Réactifs de dérivation chirale

Tableau 2 – Principaux réactifs de dérivation chiraux utilisés en chromatographie en phase liquide [3]

Transformation du groupement fonctionnel	Réactif de dérivation chiral	Structure après dérivation	Type de soluté
$-OH \longrightarrow -O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-R$	MTPA-Cl		Alcools terpénoïques
$-OH \longrightarrow -O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-\overset{\overset{H}{ }}{N}-R$	(1-phényléthyl) isocyanate (1-naphtyléthyl) isocyanate		Alcools

Réactifs de dérivation chirale

<p>$-\text{CO}_2\text{H} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \\ \parallel \quad \\ -\text{C} - \text{N} - \text{R} \end{array}$</p>	<p>(1-phényléthyl) amine</p> <p>(1-naphtyléthyl) amine</p> <p>1-(4-nitrophényl) éthylamine</p> <p>méthylphénylalaninate</p>	<p>$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{C} - \text{N} - \text{CH} - \text{C}_6\text{H}_5 \\ \parallel \quad \\ \text{O} \quad \text{CH}_3 \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{C} - \text{N} - \text{CH} - \text{C}_{10}\text{H}_7 \\ \parallel \quad \\ \text{O} \quad \text{CH}_3 \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{C} - \text{N} - \text{CH} - \text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2 \\ \parallel \quad \\ \text{O} \quad \text{CH}_3 \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{C} - \text{N} - \text{CH} - \text{CO}_2\text{CH}_3 \\ \parallel \quad \\ \text{O} \quad \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$</p>	<p>Acides carboxyliques</p>
---	---	---	-----------------------------

Séparation chirale en mode indirect

Formation de diastéréoisomères par dérivation précolonne

- Pb: Pour les séparation préparatives, le retour à l'énantiomère initial peut s'accompagner d'une racémisation partielle (limitation de la méthode)

Chromatographie chirale en phase liquide: Méthode 2

**Utilisation de phases mobiles avec
additif chiral**

Utilisation de phases mobiles avec additif chiral

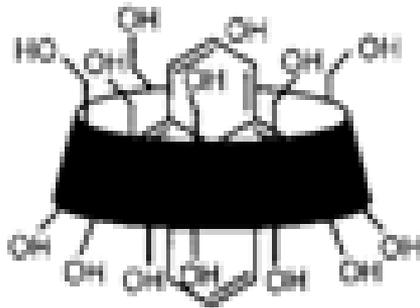
- On ajoute dans la phase mobile un réactif chiral.
Formation de diastéréoisomères labiles
dans la phase mobile

- La formation des diastéréoisomères labiles peut se faire:
 - soit au sein de la phase mobile chirale,
 - soit à la surface de la phase stationnaire après son imprégnation par le réactif chiral.
- Il est probable que ces deux mécanismes coexistent.

Utilisation de phases mobiles avec additif chiral

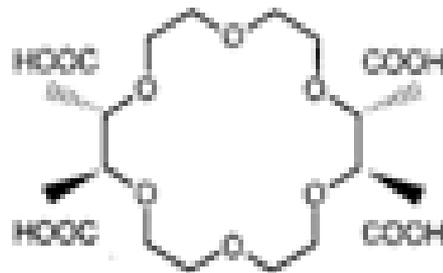
- Cette méthode nécessite de grandes quantités de réactifs chiral (Coûts élevés)
- Exemple de réactif chiral utilisé en chromatographie de partage: la β -cyclodextrine (dissoute dans la phase mobile eau méthanol) qui forme avec le racémate des complexes d'inclusion de stoechiométrie 1:1.

Utilisation de phases mobiles avec additif chiral



a)

a) Molécule aromatique incluse dans une β -cyclodextrine.



b)

b) Éther couronne.

Inclusion stéréospécifique d'un des énantiomères

Utilisation de phases mobiles avec additif chiral

- Exemple: Afin de séparer des énantiomères à caractère ionique: addition de composés chiraux, formation préférentielle d'une paire d'ions avec un des énantiomères

Chromatographie chirale en phase liquide: Méthode 3

***Formation de diastéréoisomères
labiles à la surface de phases
stationnaires chirales***

Formation de diastéréoisomères labiles à la surface de phases stationnaires chirales

- On utilise des phases stationnaires possédant un sélecteur chiral pour lequel l'affinité vis-à-vis des énantiomères est différente.
- Sélectivité expliquée par la règle des trois points de Dalgliesh: trois points d'interaction entre le sélecteur chiral et l'énantiomère (l'énergie d'association entre l'énantiomère et la phase stationnaire sont différentes)

Formation de diastéréoisomères labiles à la surface de phases stationnaires chirales

- Parmi les 3 méthodes possibles, il s'agit de la technique la plus utilisée.

La première phase chirale commercialisée en 1981 a été conçue par Pirkle.

- Actuellement 70 phases sont commercialisées, on peut classer ces phases en quatre groupes selon la structure chimique des sélecteurs chiraux et les mécanismes de reconnaissance chirale mis en jeu.

Différentes catégories de phases stationnaires chirales

1- Type Donneur-accepteur (Pirkle) TYPE IA

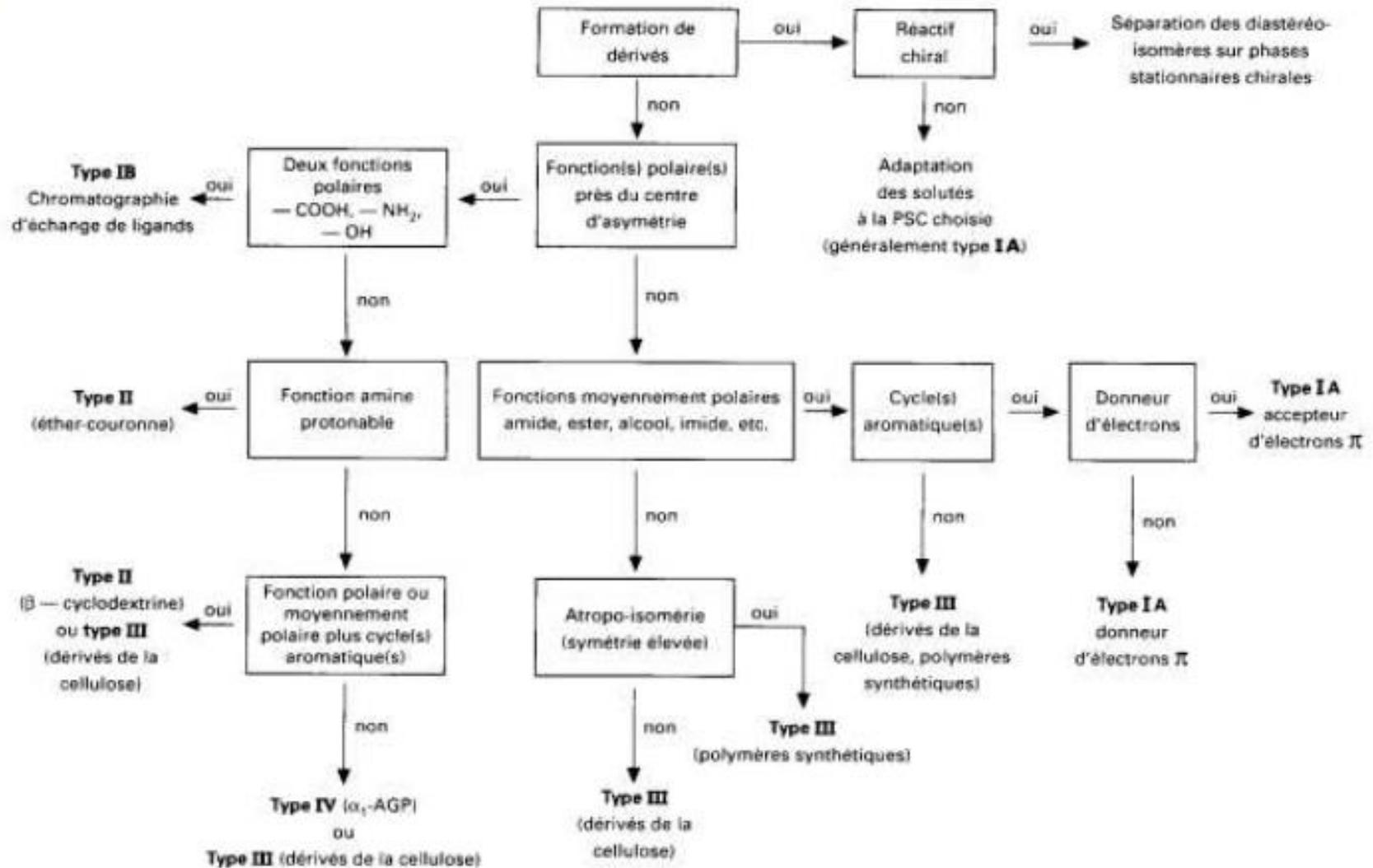
2- Colonne d'échange de ligandes TYPE IB

3- Phases stationnaires avec cavités TYPE II

4- Phases polymériques TYPE III

5- Protéines TYPE IV

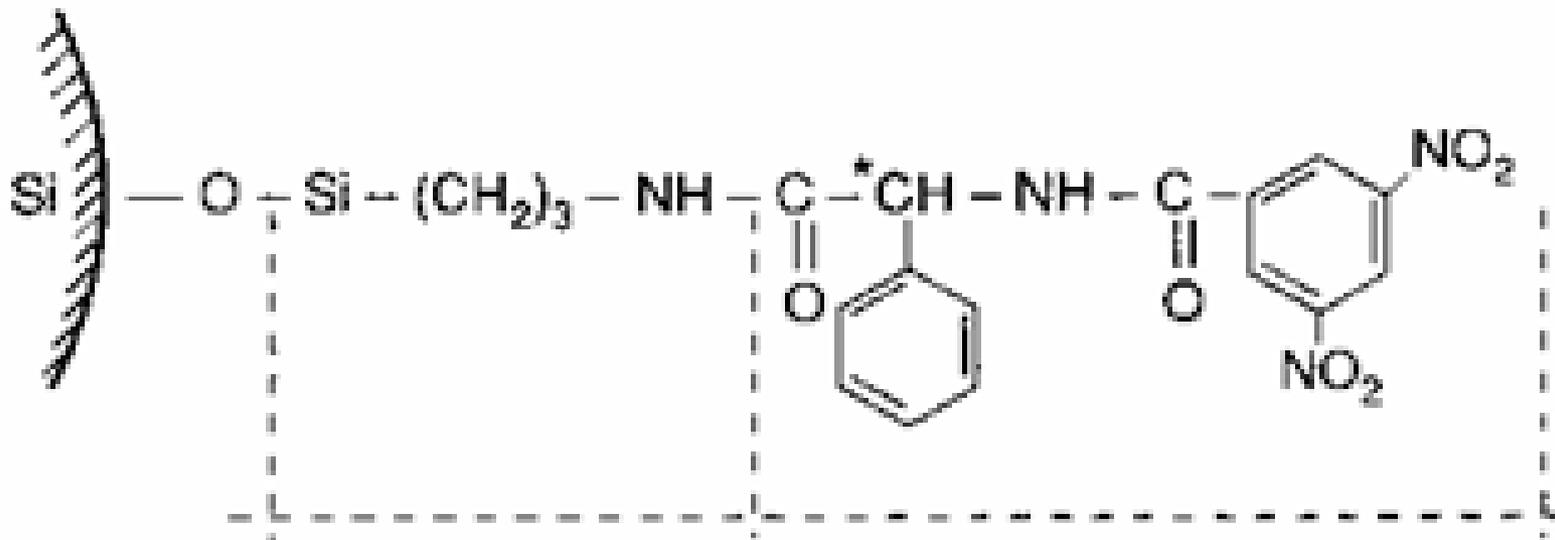
Choix des phases stationnaires chirales



Groupe IA: phase stationnaire chirale de type PIRKLE

Ces phases sont constituées d'un sélecteur chiral (généralement un dérivé d'acide aminé) greffé de manière covalente (plus rarement ionique) sur une silice chromatographique. Les phases stationnaires chirales de type Pirkle contiennent un noyau aromatique à caractère accepteur ou donneur d'électron Π .

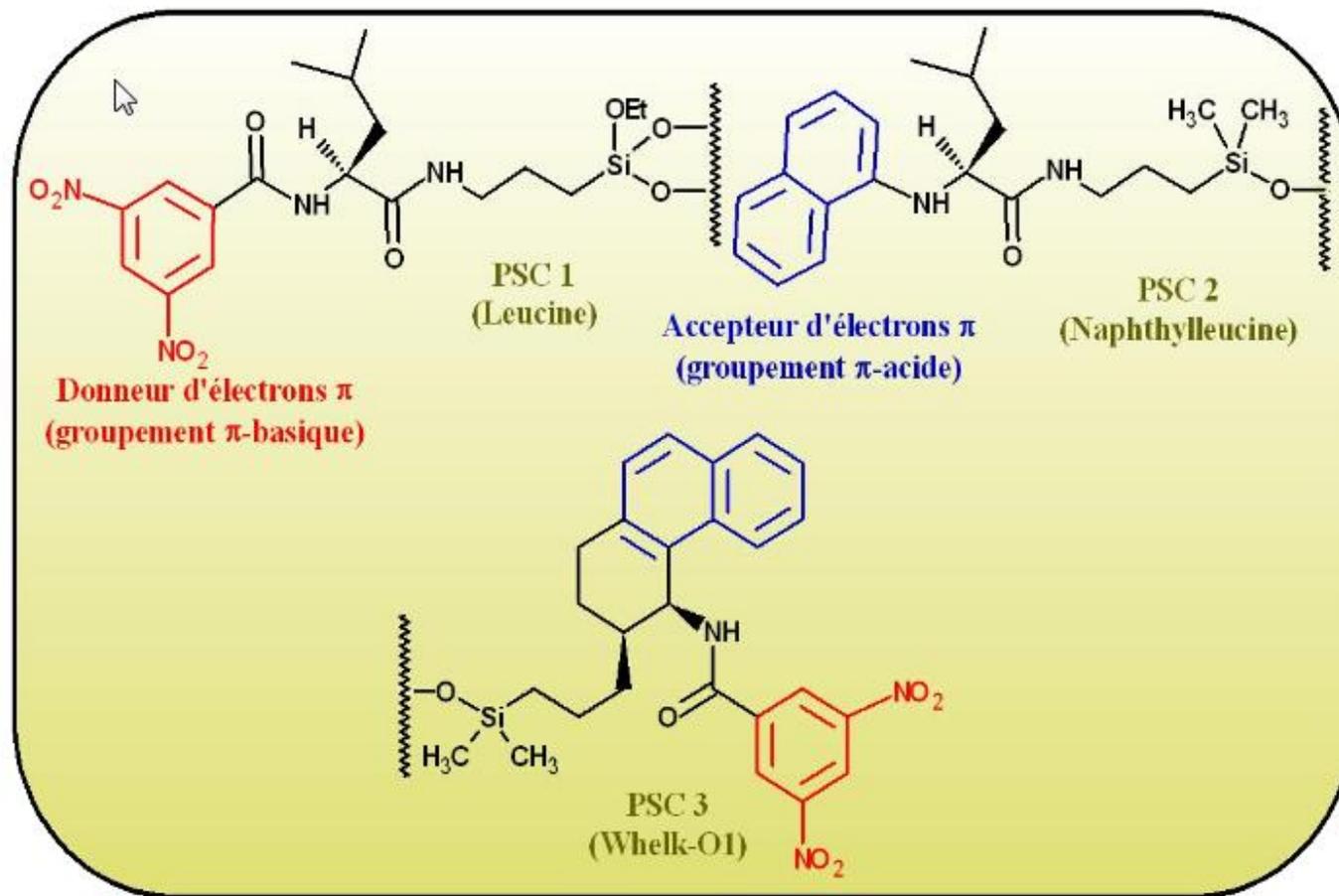
Groupe IA: phase stationnaire chirale de type PIRKLE



3-amino propylsilyl dinitrobenzoyl phénylglycine

Phase stationnaire type Pirkle.

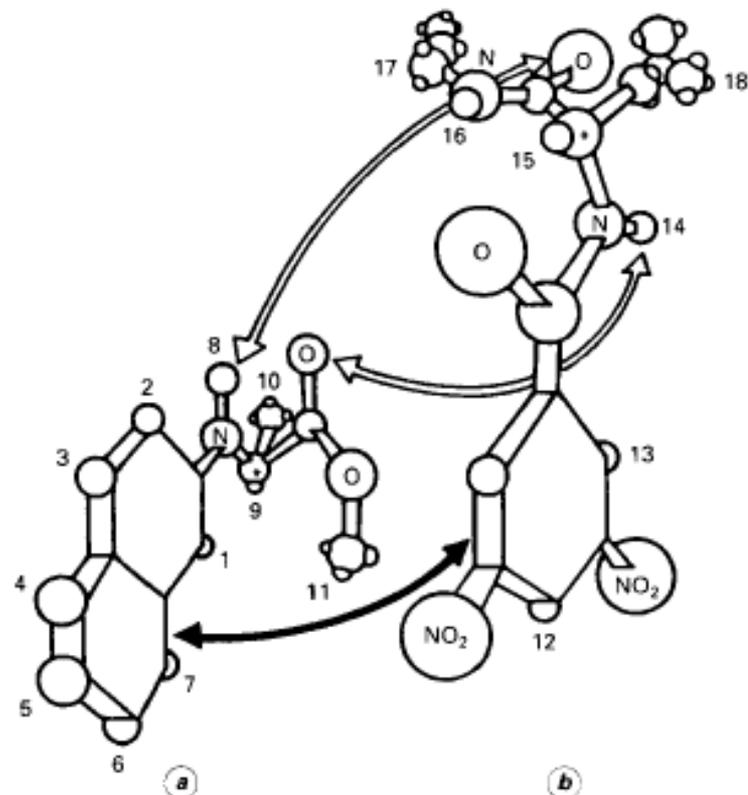
Groupe IA: phase stationnaire chirale de type PIRKLE



Groupe IA: phase stationnaire chirale de type PIRKLE

Le mécanisme de reconnaissance chirale implique trois points d'interaction mettant en jeu soit:

- des interactions Π - Π
- des interactions par formation de liaisons hydrogène
- des interactions dipôle-dipôle



On considère une interaction $\pi - \pi$ entre les noyaux aromatiques, une liaison hydrogène entre l'atome d'hydrogène du groupement dinitrobenzamide H14 de (**b**) et l'oxygène du carbonyle de (**a**), et une seconde liaison hydrogène entre l'hydrogène amidique de (**a**) et l'oxygène du carbonyle terminal de (**b**). La numérotation des protons se réfère aux données de la RMN¹H.

Figure 11 – Modèle de reconnaissance chirale montrant l'établissement de trois interactions concomitantes entre le (S) - N - (2 - naphthyl) alaninate de méthyle et le (S) - N - (3,5 - dinitrobenzoyl) leucine N - propylamide

Groupe IA: phase stationnaire chirale de type PIRKLE

- La reconnaissance chirale n'implique pas obligatoirement **la perte d'une des interactions avec l'énantiomère le moins retenu** mais seulement **une diminution de l'énergie d'une ou plusieurs interactions** due à des phénomènes d'encombrement stérique.

Groupe IA: phase stationnaire chirale de type PIRKLE

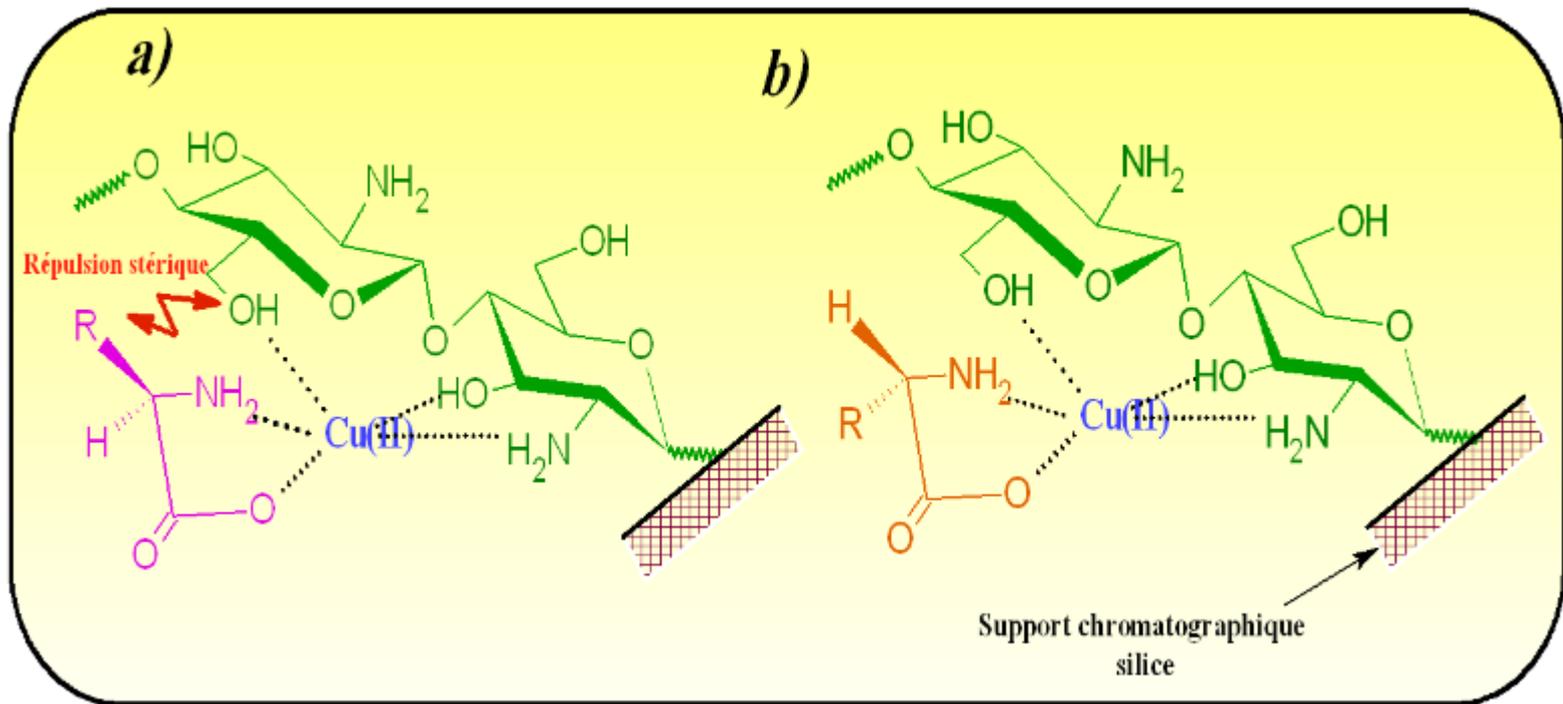
Choix de la phase mobile

- Ces phases sont utilisées essentiellement avec des éluants peu polaires du type hexane/modificateur polaire, beaucoup plus rarement avec les éluants hydro-organiques.

Groupe IB: phase stationnaire chirale pour la chromatographie par échange de ligands

- Le mécanisme de la séparation est fondé sur la formation de complexes entre un soluté donneur de doublets électroniques et un cation métallique présentant des orbitales vacantes.
- Le cation métallique doit présenter des orbitales vacantes facilement accessibles (Cu (II), Ni (II), Zn (II)...

Groupe IB: phase stationnaire chirale pour la chromatographie par échange de ligands



Les aa sont élués sous la forme de complexes avec le Métal ce qui facilite pour la plupart d'entre eux, leur détection dans l'ultraviolet.

Groupe IB: phase stationnaire chirale pour la chromatographie par échange de ligands

- On distingue, en chromatographie d'échange de ligands, les modes dynamiques et statiques :
- **Mode Dynamique** : la formation des complexes a lieu dans la phase mobile et la séparation est fondée sur les différences de distribution de ces complexes entre les phases mobile et stationnaire.

Groupe IB: phase stationnaire chirale pour la chromatographie par échange de ligands

- **Mode Statique** : le cation métallique est fixé sur la phase stationnaire et la formation des complexes a lieu dans la phase stationnaire.
- Le mode statique est généralement le plus utilisé.

Groupe IB: phase stationnaire chirale pour la chromatographie par échange de ligands

- Les molécules chirales possédant des atomes à caractère donneur d'électrons, tels que l'azote, l'oxygène et le soufre, sont considérées comme de bons ligands car elles ont la capacité de coordonner les cations métalliques (métaux de transition).

Groupe IB: phase stationnaire chirale pour la chromatographie par échange de ligands

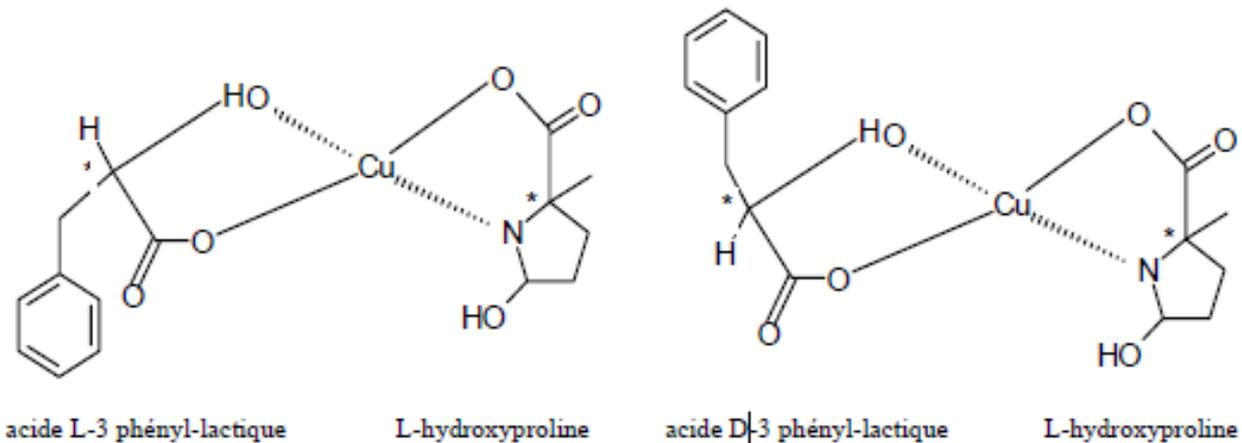
Les solutés doivent être bifonctionnels afin d'établir deux liaisons datives et/ou ioniques (exemple les acides aminés) avec le cation métallique.

Le principe de la séparation repose, sur la formation de complexes diastéréoisomériques entre le ligand sélecteur (L_{se}), le cation métallique (Me) et le soluté ligand L_{s0} (L ou D).

Groupe IB: phase stationnaire chirale pour la chromatographie par échange de ligands

- Les sélecteurs chiraux sont immobilisés de manière covalente sur un support chromatographique (matrices polymériques organiques soit sur des gels de silice).
- Les sélecteurs chiraux sont constitués d'agents chélateurs chiraux complexés par des ions métalliques
- L'énantiomère qui forme un complexe ternaire plus stable avec le ligand cuivre (II) est le plus retenu dans la colonne chromatographique

Groupe IB: phase stationnaire chirale pour la chromatographie par échange de ligands

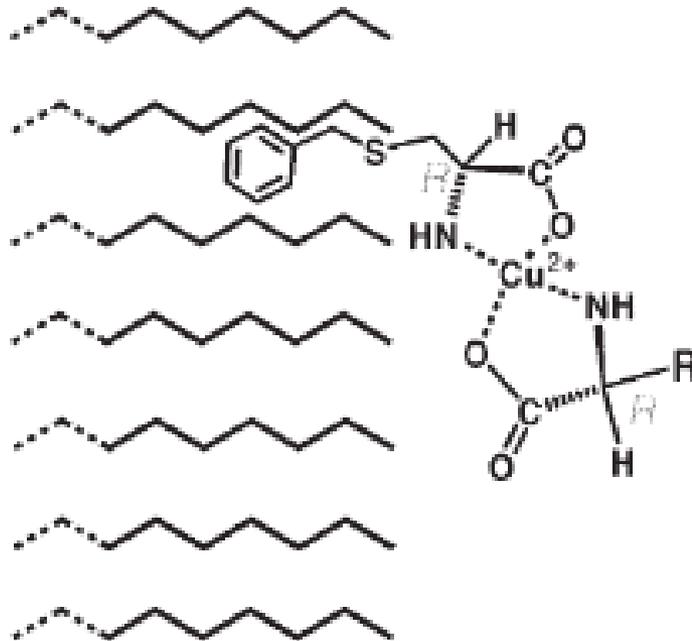


Complexes entre les énantiomères de l'acide 3-phényl-lactique et la L-hydroxyproline .

Ces sélecteurs chiraux sont utilisés en tant que phases stationnaires ou comme additifs chiraux dans la phase mobile ou dans le tampon de migration

Groupe IB: phase stationnaire chirale pour la chromatographie par échange de ligands

- Le ligand peut être adsorbé sur un support solide de type C18



Choix de la phase mobile

Les phases mobiles sont constituées soit d'eau pure, de tampon phosphate ou acétate, soit de mélange tampon aqueux-solvants organiques (méthanol, acétonitrile ou THF), des traces d'ions métallique.

La chromatographie d'échange de ligands a été largement développée pour la séparation des isomères d'acides aminés, des di et tripeptides et des hydroxyacides, c'est-à-dire, des solutés ayant au moins deux des groupements fonctionnels suivants: $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$... capables de former avec l'ion Cu^{2+} un complexe bidenté.

Phases stationnaires avec cavités

TYPE II

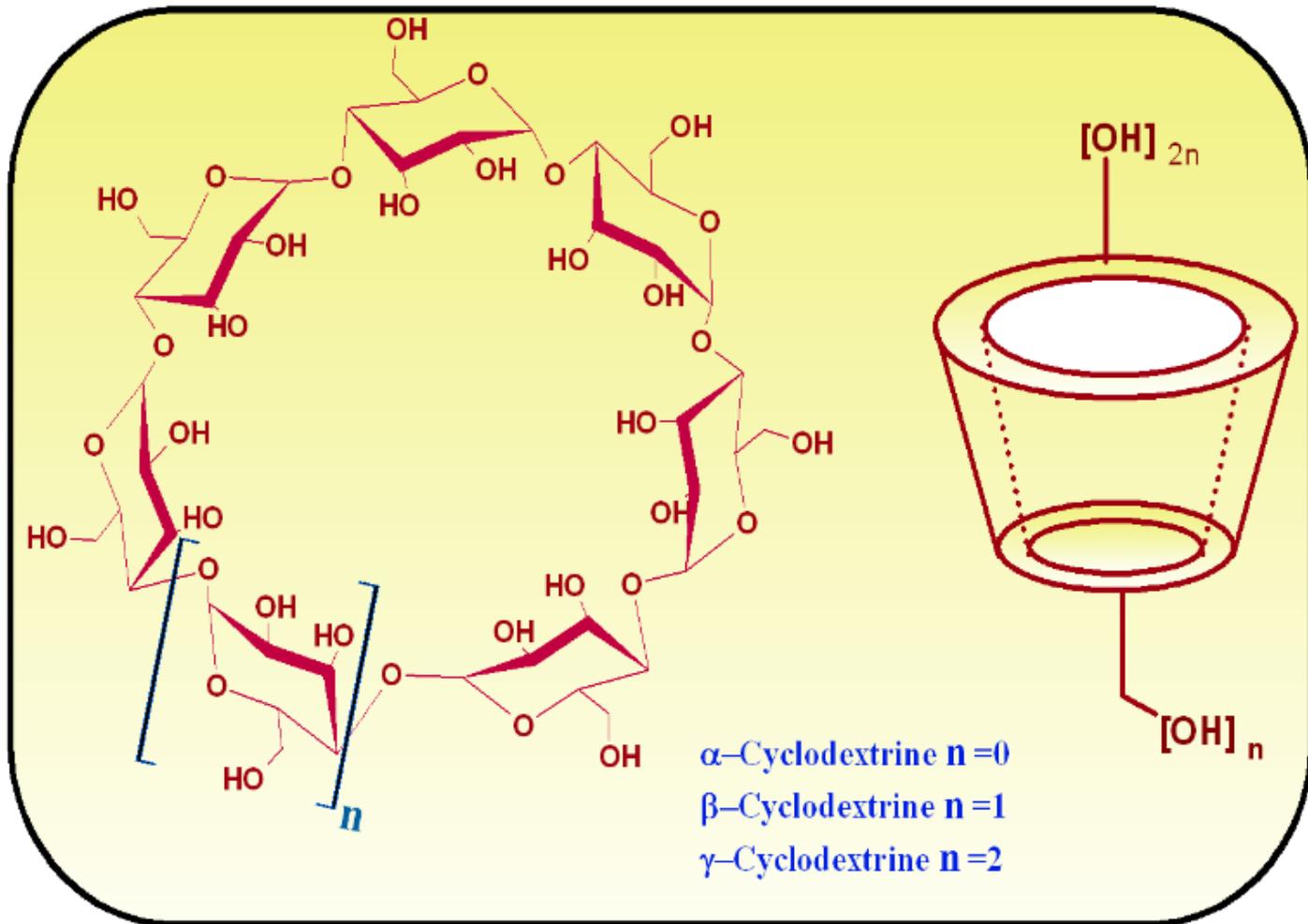
Cyclodextrine et éther couronne

- Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités glucopyranose liées entre elles par des liaisons glucosidiques α (1-4) et chaque unité glucopyranose possède 5 atomes de carbone asymétriques, ce qui confère aux cyclodextrines des propriétés chirales.

Phases stationnaires avec cavités

TYPE II

Cyclodextrine et éther couronne

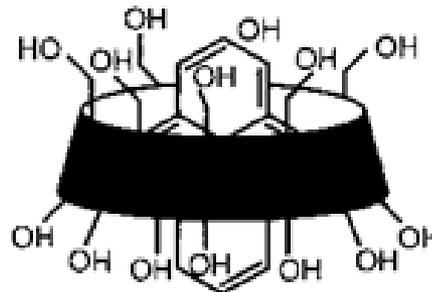


Phases stationnaires avec cavités

TYPE II

Cyclodextrine et éther couronne

- Les cyclodextrines α , β , γ comportent respectivement 6, 7 et 8 unités glucose. Les cyclodextrines forment ainsi une cavité hydrophobe (affinité pour les composés hydrophobes)

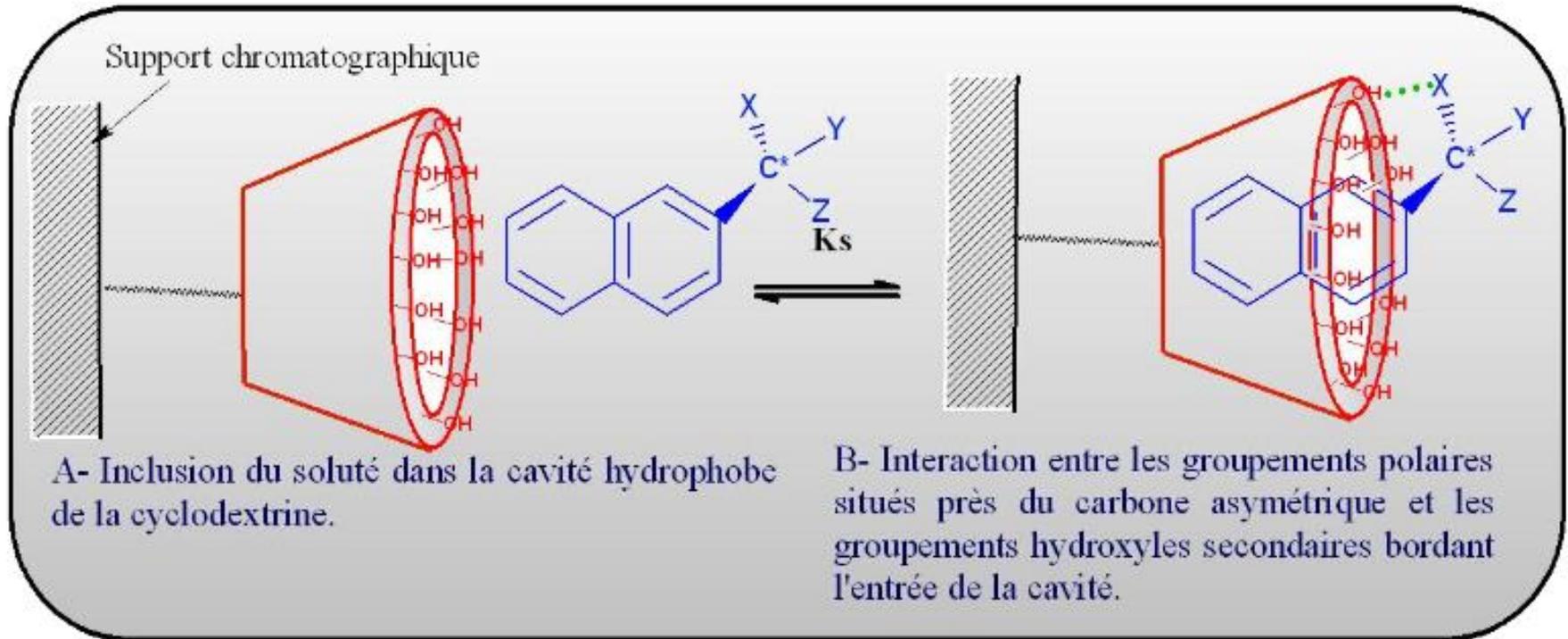


Phases stationnaires avec cavités

TYPE II

- Des groupements alcools secondaires bordent l'entrée de la cavité, alors que des groupements alcool primaire plus rapprochés obstruent partiellement l'accès opposé de la cavité.
- Cette disposition des groupes -OH confère à l'extérieur de la molécule un caractère hydrophile.
- Ces cyclodextrines sont greffées de façon covalente sur de la silice.

Cyclodextrine: mécanisme de reconnaissance chirale



Cyclodextrine: mécanisme de reconnaissance chirale

- Les CDs présentent les avantages suivants :
- - Elles n'absorbent pas en ultraviolet (UV),
- - Elles sont stables sur une large gamme de pH,
- - Elles peuvent accroître la fluorescence d'un composé et en faciliter la détection.

Cyclodextrine: mécanisme de reconnaissance chirale

- La formation du complexe dépendra de la polarité, de l'hydrophobie, de la taille, et de la géométrie de la molécule que l'on souhaite séparer, mais aussi de la taille de la cavité de la CD.
- L'analyte doit être constitué au moins d'un noyau aromatique situé en position α ou β du centre chiral.

Cyclodextrine: mécanisme de reconnaissance chirale

- Le soluté doit posséder des groupements hydrophiles proches du centre d'asymétrie susceptibles de former des liaisons hydrogène avec les groupements hydroxyles de la CD.
- La taille de la cavité hydrophobe doit être en adéquation avec la géométrie du groupement aromatique du soluté.

Cyclodextrine: mécanisme de reconnaissance chirale

- Le mécanisme de reconnaissance chirale est fondé sur trois points d'interaction entre l'énantiomère et la cyclodextrine: au moins un substituant du composé que l'on souhaite séparer (partie hydrophobe) doit être en interaction avec la cavité apolaire de la cyclodextrine (inclusion).
- Les substituants de l'atome asymétrique doivent être à proximité des groupements hydroxyles secondaires du bord de la cavité afin que les deux autres points d'interaction interviennent (formation de liaisons hydrogènes).

Cyclodextrine: Phase mobile

- Cyclodextrine:
- Phases mobiles de type eau-solvant organique (méthanol, éthanol ou acétonitrile).

Cyclodextrines: applications

- Le domaine d'application de chaque cyclodextrine est déterminé par l'adéquation de la taille de la cavité chirale avec la taille du soluté à séparer.
- Si la taille de la cavité est trop grande par rapport au soluté, le soluté n'a plus d'orientation privilégiée, perte de sélectivité
- Si la taille de la cavité est trop petite, il n'y a pas d'inclusion.

Cyclodextrines: applications

- Les cyclodextrines ont été utilisées dans le domaine de la séparation chirale à partir de 1980.
- Les cyclodextrines présentent certains inconvénients tels que des problèmes de solubilité et des contraintes de faible interaction avec l'analyte.

Cyclodextrines: applications

- La β -cyclodextrine qui est la cyclodextrine la plus utilisée (représente 95% des cyclodextrines) mais elle présente une faible solubilité dans l'eau. L'ajout de solvants organiques tels que l'acétonitrile, le DMSO ou l'urée permet d'augmenter la concentration de cyclodextrine dans l'éluant.

Cyclodextrines: applications

- Il existe également des cyclodextrines modifiées obtenues par substitution de l'atome d'H du groupe hydroxyle par divers groupements (alkyle, hydroxyalkyle, amino, thio, sulfate....)

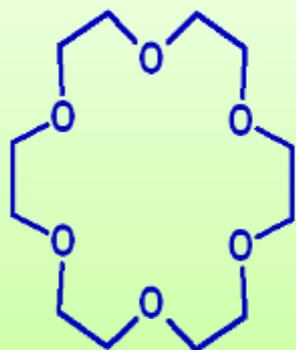
Cyclodextrines: applications

- α cyclodextrine s'adapte bien aux petites molécules possédant un noyau aromatique ou une chaîne aliphatique
- β cyclodextrine (diamètre de la cavité 0.78nm) s'adapte bien aux noyaux naphthyle, biphényle.
- γ cyclodextrine convient bien aux molécules possédant des substituants très volumineux (exemple phénobarbital)

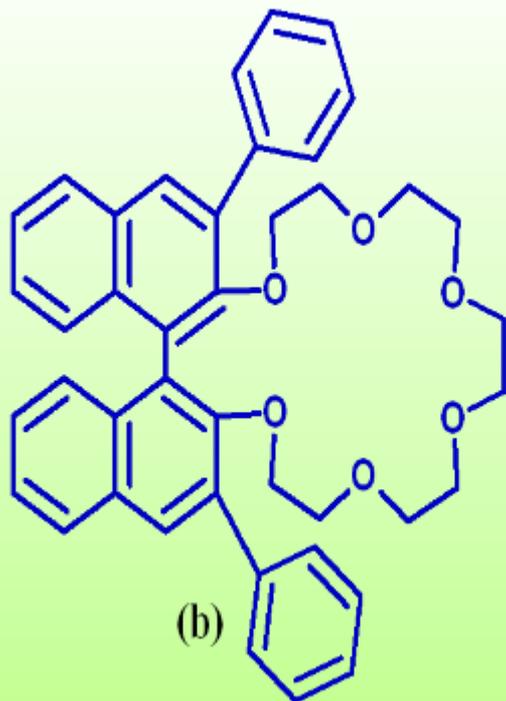
Les éthers couronnes:

- Les éthers-couronnes sont des polyéthers cycliques connus pour leurs propriétés complexantes vis-à-vis des cations métalliques alcalins et des sels d'ammonium et d'alkylammonium.
- Généralement les éthers couronnes possèdent une cavité hydrophile et un environnement extérieur hydrophobe. Les atomes d'oxygène du cycle sont orientés vers le centre de la cavité.

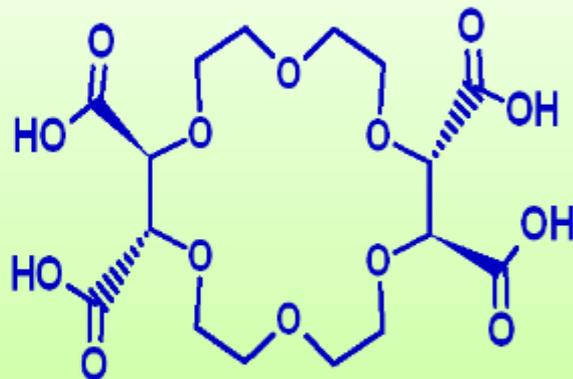
Les éthers couronnes:



(a)



(b)



(c)

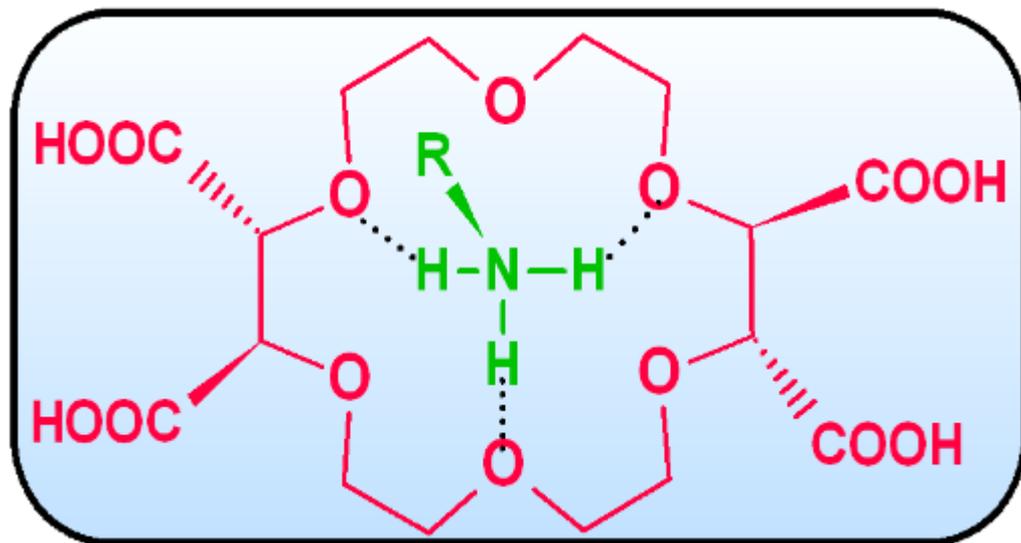
Éther couronne: mécanisme de reconnaissance chirale

- La discrimination chirale repose sur la différence de stabilité des complexes diastéréoisomères d'inclusion formés entre le solutés et l'éther couronne.
- Établissement de liaisons hydrogènes avec les protons des groupements amine ou hydroxyle (séparation des stéréoisomères des amines primaires, des aminoalcools et des acides aminés).

Éther couronne: mécanisme de reconnaissance chirale

- Le mécanisme de reconnaissance chirale repose sur la formation de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques entre une fonction aminée du composé chiral et les hétéroatomes de l'éther couronne.
- Les interactions secondaires entre les groupes carboxyliques de l'éther couronne et des groupes situés à proximité du centre chiral de l'analyte sont essentielles pour la reconnaissance chirale

Éther couronne: mécanisme de reconnaissance chirale



- Les éthers couronne offrent des sélectivités élevées, cependant, leur domaine d'application est limité aux solutés possédant une fonction amine primaire (acides aminés, amines, amides, alcools aminés, esters aminés, etc)

Ether couronne: Phase mobile

- Les phases éluantes sont généralement constituées de solutions aqueuses d'acide perchlorique ($1.5 < \text{pH} < 2$).
- Selon le caractère hydrophobe du soluté, une faible quantité de méthanol est ajoutée à la phase aqueuse afin de diminuer la rétention.

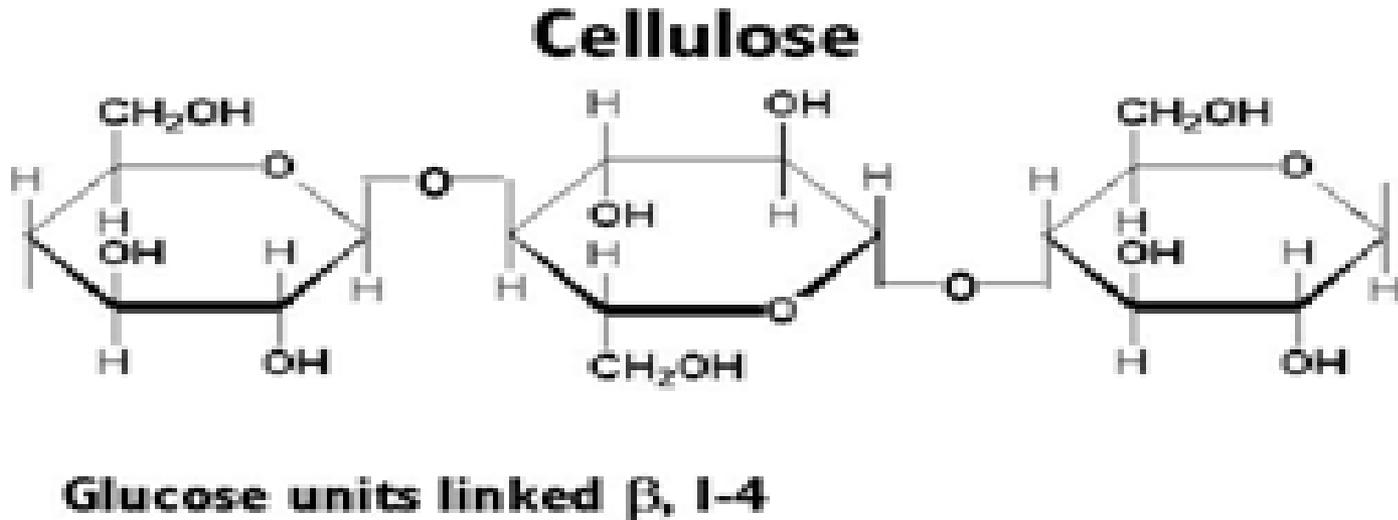
Chromatographie préparative

- Les cyclodextrines ne sont pas utilisées du fait de leur faible capacité en chromatographie préparative.
- Les éthers couronnes du fait de leur coût élevé ne sont pas utilisés en chromatographie préparative

Groupe III: phase stationnaire chirale: polymère naturels et synthétiques

- Sélecteur chiral= polymère présentant un grand nombre de centres d'asymétrie et/ou de cavités asymétriques.
- Les polymères peuvent être utilisés à l'état brut soit imprégnés sur des gels de silice.
- On distingue:
 - - les polymères naturels (amylose et cellulose)
 - - les polymères synthétiques (phases polyacrylamides ou polyméthacrylamides ou polytriphénylméthylméthacrylate (ou PTrMA))

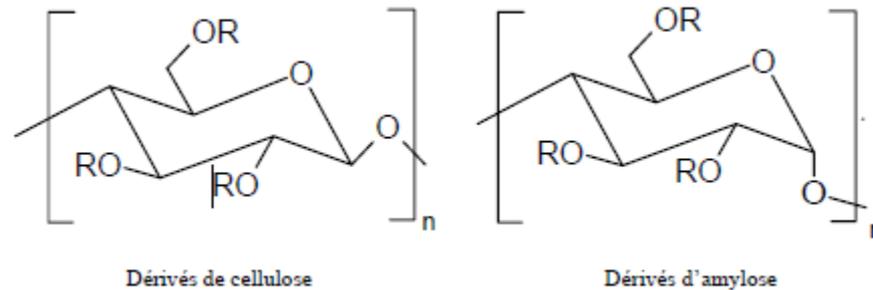
Groupe III: phase stationnaire chirale: polymère naturels



La cellulose et l'amylose sont composés d'unités de D-glucose reliées par des ponts β -(1-4) pour la cellulose ou α -(1-4) pour l'amylose. Ils permettent la séparation d'énantiomères.

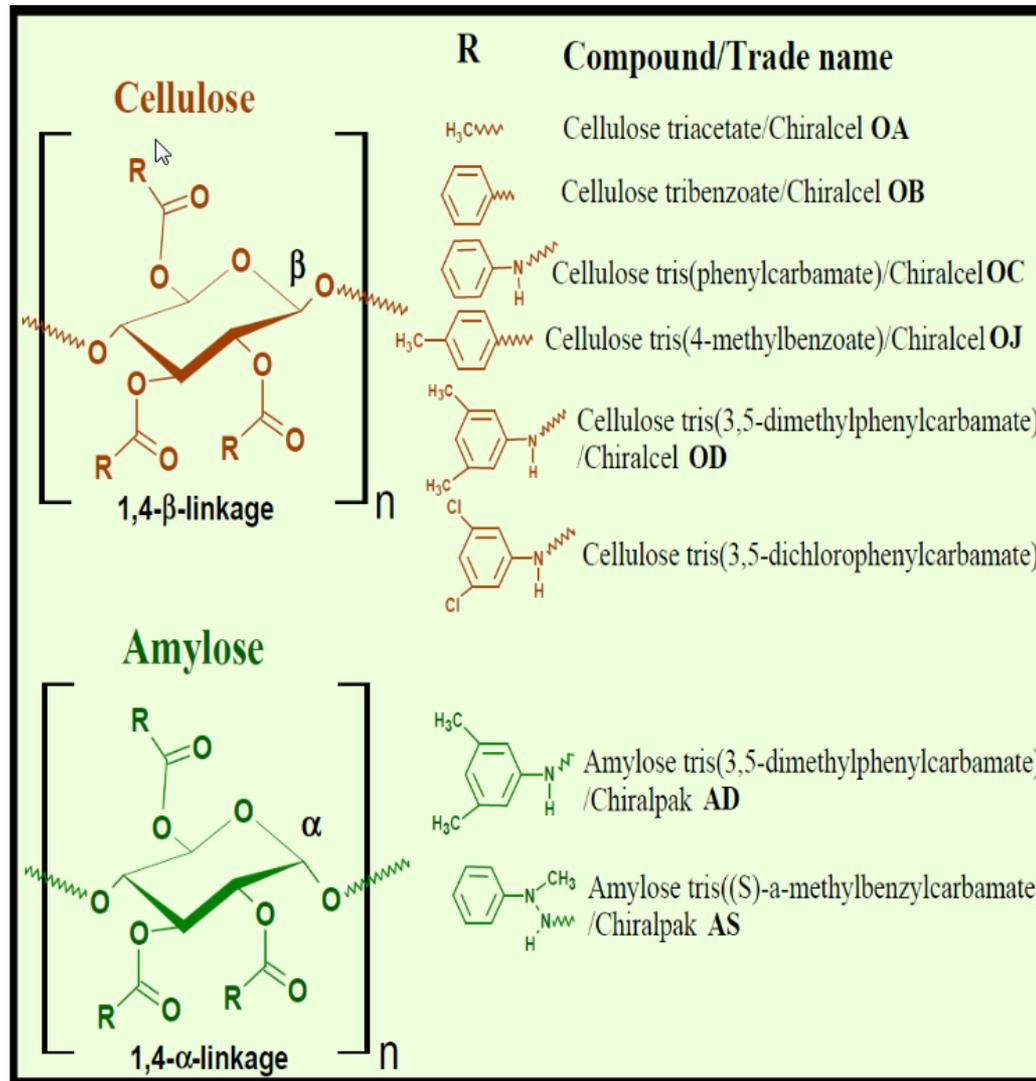
Cependant, ces polymères naturels ne sont pas commercialisés en tant que phases stationnaires chirales car les résolutions obtenues sont généralement faibles. Afin d'améliorer leur énantiosélectivité, ils ont été modifiés par dérivation des fonctions -OH libres.

Groupe III: phase stationnaire chirale: polymère naturels



La dérivation de ces groupements -OH permet à la fois de conserver la structure hélicoïdale de la molécule et de favoriser l'apparition de cavités chirales capables d'inclure stéréosélectivement des molécules.

Groupe III: phase stationnaire chirale: polymère naturels et synthétiques



Mécanisme de reconnaissance chirale

- La reconnaissance chirale implique des phénomènes d'inclusion, des interactions de type π - π , des liaisons hydrogène, des interactions dipôle-dipôle et des interactions électrostatiques.

Phase stationnaire de groupe III:

Phases mobiles: Polymères naturels

- Les phases mobiles mises en œuvre sont généralement des mélanges binaires (hexane-alcool).
- Les solvants présentant un pouvoir solvant notable envers la cellulose ou l'amylose (chloroforme, le dichlorométhane, le 1,2-dichloroéthane, le THF, le dioxanne ou l'acétone) sont à exclure.

Applications: Polymères naturels

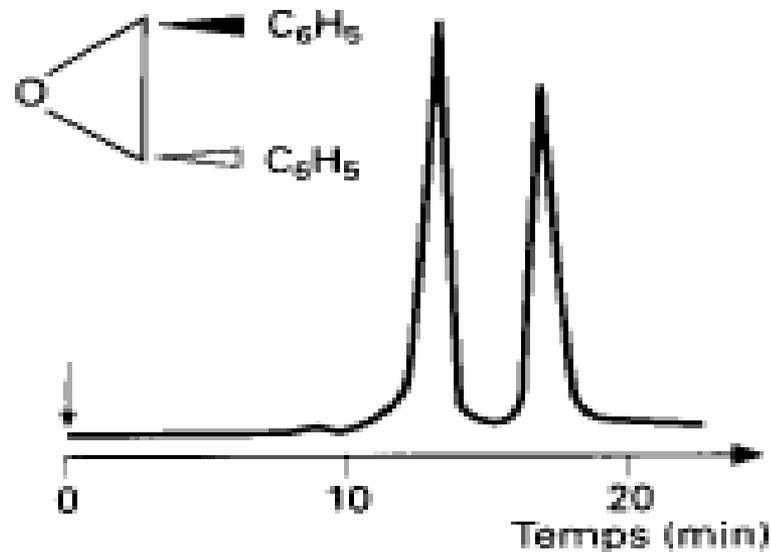
- Phases dérivées de la cellulose: Phases pouvant être utilisées pour la résolution de ***petites molécules rigides*** ou contenant ***un cycle*** (ou un noyau aromatique) et ***un groupement polaire*** (fonction carbonyle, nitro, nitrile, hydroxyle, sulfoxyde, carboxylique...près du centre d'asymétrie qui peut être varié (carbone, soufre, phosphore...))

Applications:

Polymères naturels

- Ces sélecteurs chiraux sont très utilisés à l'échelle préparative, car ils sont obtenus en grandes quantités à partir de leurs sources naturelles et possèdent une capacité de fixation des solutés très importante.

Applications: Polymères naturels



Colonne : longueur : 25 cm ; diamètre intérieur : 4,6 mm.

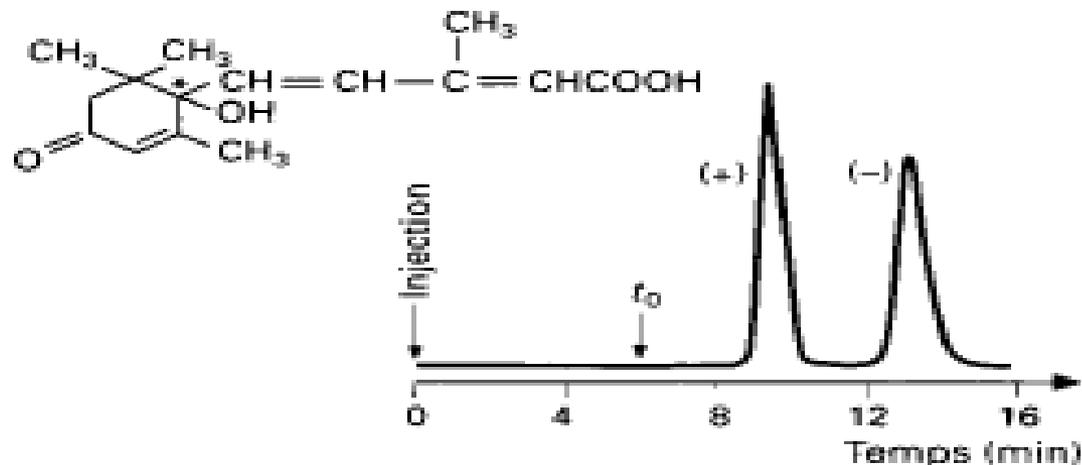
Phase stationnaire : silice de 10 μm imprégnée de tribenzoate de cellulose (Chiralcel OB).

Phase mobile : hexane - isopropanol 90 : 10 (v/v) ;

Débit : 0,5 mL \cdot min $^{-1}$.

Séparation des énantiomères de l'oxyde de trans-stilbène

Applications: Polymères naturels



Colonne : longueur : 25 cm ; diamètre intérieur : 4,6 mm.
Phase stationnaire : silice de 10 μm imprégnée de
3,5 - diméthylphénylcarbamate de cellulose (Chiralcel OD).
Phase mobile : hexane - isopropanol - acide trifluoro-
acétique 79 : 20 : 1 (v/v).
Débit : 0,5 mL . min⁻¹.
Détection UV à 240 nm .

Séparation des énantiomère de l'acide abscisique

Phase stationnaire de groupe III:

Phases mobiles:

Polymères synthétiques

- Ces sélecteurs chiraux sont produit par polymérisation de monomères chiraux. Cette polymérisation aboutit à la formation d'un réseau tridimensionnel permettant la création de cavités asymétriques.
- Le mécanisme de reconnaissance implique l'inclusion des énantiomères dans ces cavités mais les chaînes polymériques, possédant de multiples centres de chiralité provenant du monomère, interviennent également dans ce mécanisme de reconnaissance.

Applications: Polymères synthétiques

- Exemple de polymères synthétiques: polyméthacrylate, polyacrylamide, polyméthacrylamide et les dérivés du polystyrène...
- L'utilisation des polymères synthétiques à l'échelle préparative connaît un grand succès

Phase stationnaire de groupe IV: Protéines ou fragments de protéines greffés sur gel de silice

- Les phases sont constituées par une protéine ou un fragment de protéine greffé sur des gels de silice.
- Ces phases sont sélectives vis-à-vis d'un grand nombre de médicaments (cf interaction médicaments et protéines en milieux biologiques)

Phase stationnaire de groupe IV: Protéines ou fragments de protéines greffés sur gel de silice

- De nombreuses protéines ont été utilisées en séparation chirale:

L'albumine humaine, l'albumine bovine, les glycoprotéines telles que l' α 1-glycoprotéine acide, l'ovomucoïde du blanc d'oeuf du poulet, l'avidine, la flavoprotéine, l'ovotransferrine (ou conalbumine) et la β -lactoglobuline, les enzymes comme la trypsine, l' α -chymotrypsine, la cellobiohydrolase I (CBHI), la cellulase, la pepsine, le lysozyme.

Phase stationnaire de groupe IV: Protéines ou fragments de protéines greffés sur gel de silice



Phase stationnaire de groupe IV: Protéines ou fragments de protéines greffés sur gel de silice

Mécanisme de reconnaissance chirale:

- Les propriétés énantiosélectives des protéines varient d'une protéine à l'autre.
- En effet, les mécanismes de reconnaissance chirale semblent être dus à la structure particulière de la protéine (structure tertiaire, en feuilletts plissés, etc.) et à la formation de cavités capables de reconnaître des molécules chirales.

Phase stationnaire de groupe IV: Protéines ou fragments de protéines greffés sur gel de silice

- Des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène et l'effet hydrophobe semblent en général être impliqués dans l'association stéréosélective.

Phase stationnaire de groupe IV: Protéines ou fragments de protéines greffés sur gel de silice

Mécanisme de reconnaissance chirale:

- La reconnaissance chirale exige la présence d'au moins deux fonctions polaires dans la structure du soluté.
- La présence d'un substituant encombrant ou rigide à proximité du centre d'asymétrie favorise la reconnaissance chirale au niveau des sites d'interaction de la protéine.

Phase stationnaire de groupe IV: Protéines ou fragments de protéines greffés sur gel de silice

Influence de la phase mobile:

- Les phases mobiles et les tampons de migration habituellement utilisés avec un sélecteur protéique sont composés d'une solution aqueuse tamponnée, additionnée d'un solvant organique polaire (éthanol, méthanol, acétonitrile, etc.)
- L'addition d'un solvant chargé (anionique ou cationique) comme le bromure de tétrapropylammonium ou la N,Ndiméthyl-octylamine peut influencer l'énantiosélectivité des solutés

Phase stationnaire de groupe IV: Protéines ou fragments de protéines greffés sur gel de silice

Influence de la phase mobile:

- Influence de la nature et de la concentration du solvant organique: L'addition de solvants organiques à la phase mobile entraîne généralement une diminution de la rétention et parfois de la sélectivité.
- Ces effets peuvent s'expliquer par le changement de la structure de la protéine qui entraîne ainsi la création ou la disparition de sites d'interaction qui affectent la sélectivité.

Phase stationnaire de groupe IV: Protéines ou fragments de protéines greffés sur gel de silice

- **Applications:**
- Ces phases stationnaires ont un vaste domaine d'applications. (médicaments acides, basiques ou neutres)
- Etude du métabolisme des médicaments dans les milieux biologiques (plasma, urine)
- Ces phases ne sont pas utilisées en chromatographie préparative car leur capacité est trop faible.

Les sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques :

- L'utilisation d'antibiotiques macrocycliques en tant que sélecteurs chiraux a été introduite par Armstrong en 1994.
- Ces sélecteurs sont utilisés en CLHP, CCM, CPG, CPS, EC et ECC. Ils sont utilisés en tant qu'additifs chiraux dans les phases mobiles ou les tampons de migration et comme phases stationnaires (vancomycine

Les sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques

- Les antibiotiques macrocycliques les plus utilisés sont les glycopeptides.
- Les antibiotiques macrocycliques possèdent plusieurs centres stéréogéniques, des cavités d'inclusion et des groupes ionisables tels que les groupes de type amino, aminosaccharide, carboxylique et phénol.
- Ces molécules ont des masses moléculaires comprises entre 600 et 2200.

Les sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques

- Les mécanismes de reconnaissance chirale des antibiotiques macrocycliques ne sont pas clairement élucidés.
- Ils semblent être basés sur un phénomène d'inclusion, des interactions dipôle-dipôle et de type π - π , des liaisons hydrogène ainsi que sur la répulsion stérique. Une des interactions les plus importantes semble être d'origine électrostatique.

Les sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques

- Ces sélecteurs peuvent interagir énantiosélectivement avec un grand nombre de solutés de structure différente.
- Les phases stationnaires chirales à base d'antibiotiques macrocycliques peuvent être indifféremment utilisées en polarité de phase normale ou inversée.
- Les sélecteurs chiraux de type antibiotiques macrocycliques peuvent être utilisés à l'échelle préparative.

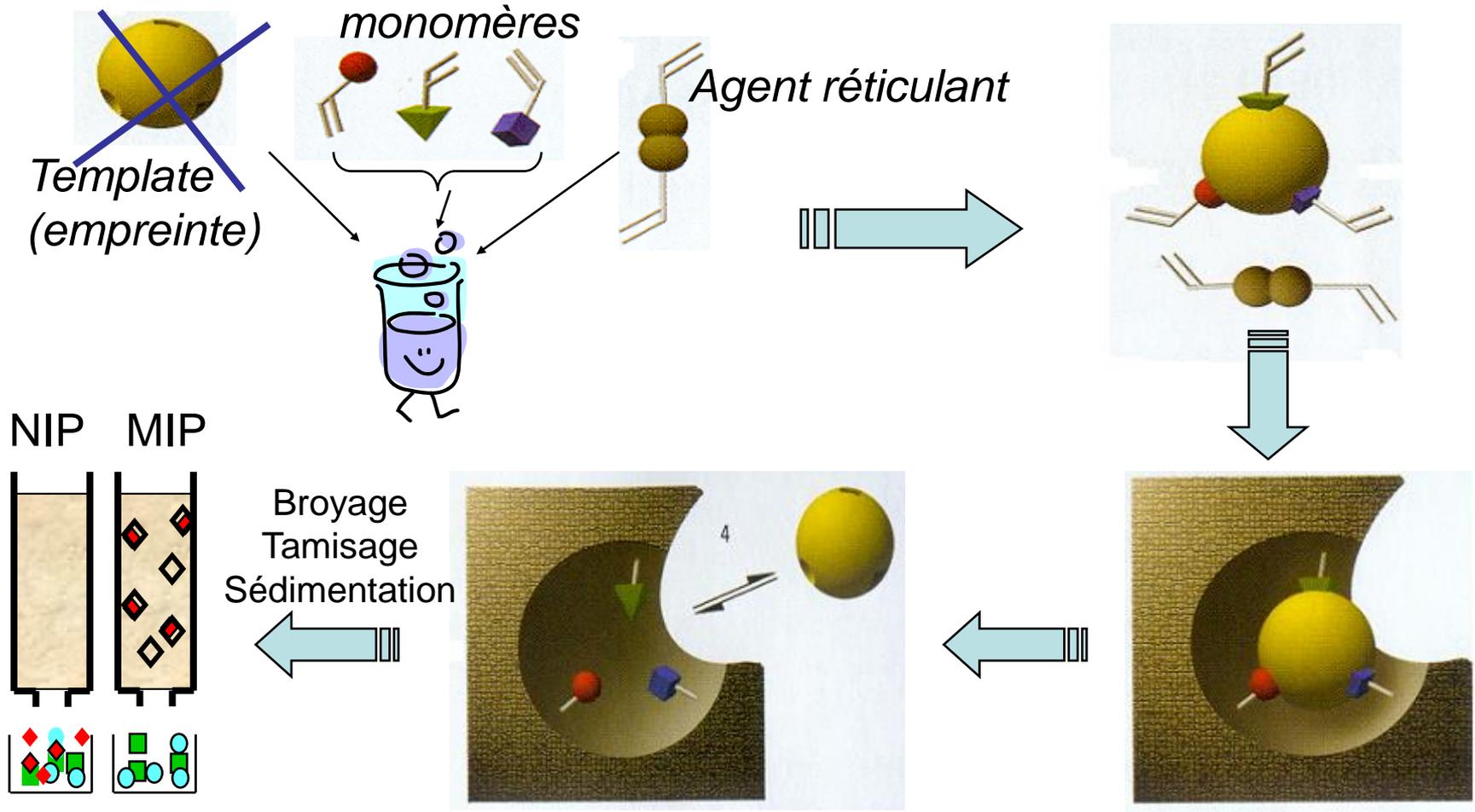
Les sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère

- Sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire
- Les anticorps énantiosélectifs

Sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire

- On forme un polymère contenant des cavités spécifiques des molécules cibles
- Synthèse des Sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire:
- Une molécule modèle (soluté d'intérêt) appelée template est mise en présence dans un solvant avec des monomères choisis pour leur grande affinité avec la molécule d'intérêt. On ajoute un agent réticulant et un initiateur de polymérisation.

Polymère à empreintes moléculaires (MIP)



Polymères à empreintes moléculaires (MIP)

- Par initiation thermique ou photochimique, les monomères polymérisent autour de la molécule empreinte induisant ainsi la création de cavités spécifiques à l'image de la molécule template.
- Une fois, la polymérisation achevée, la molécule empreinte est éliminée de la matrice polymérique. On obtient ainsi, un polymère macroporeux renfermant des sites de reconnaissance spécifique de la molécule modèle.

Polymères à empreintes moléculaires (MIP)



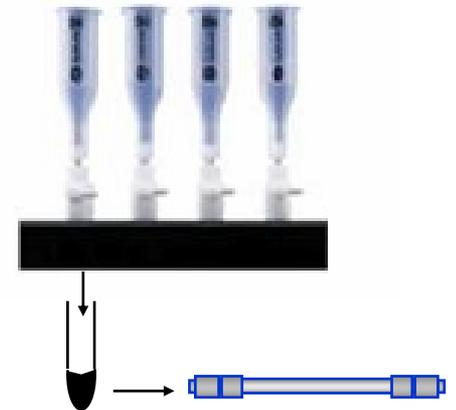
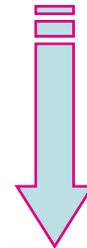
MIP en bloc



Broyage



*Tamisage (25-36 μm),
sédimentation*



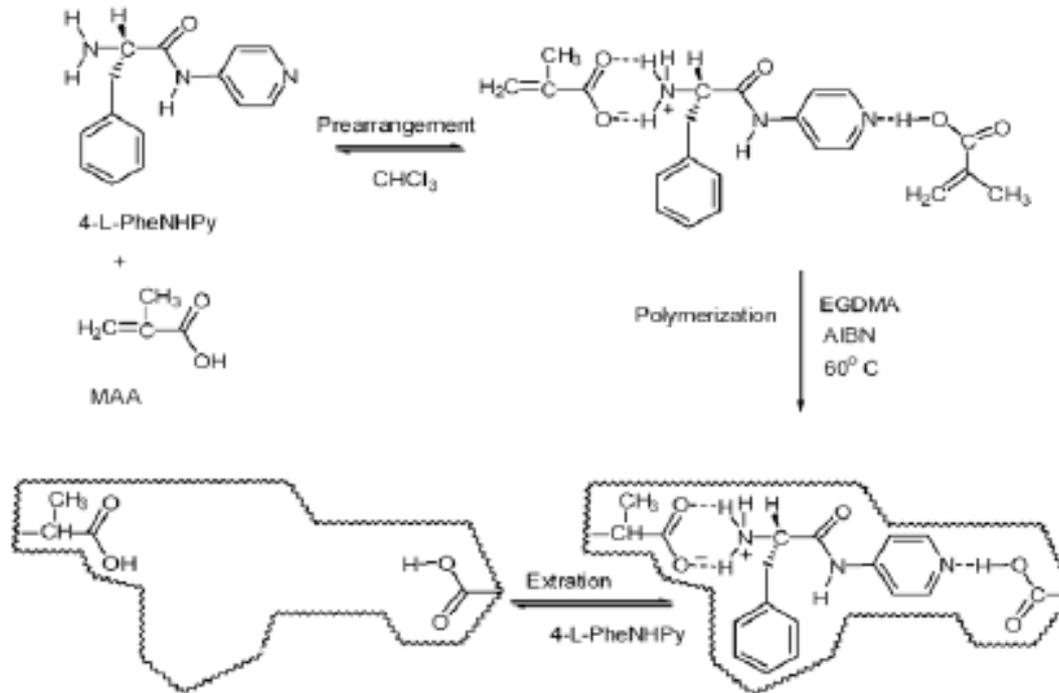
Polymères à empreintes moléculaires (MIP)

- La rétention est basée sur une reconnaissance structurale et fonctionnelle
- Ces MIP présentent une excellente stabilité chimique, mécanique et thermique
- Ils sont peu onéreux, stables sous haute température, utilisables avec de nombreux solvants organiques, utilisable sous une gamme relativement large de pH.
- Leur synthèse est réalisée en 2 ou 3 jours.

Polymères à empreintes moléculaires (MIP)

- Afin de vérifier **la spécificité** des interactions impliquées dans le processus d'extraction, il est nécessaire de comparer la rétention des analytes sur le MIP à celle obtenues sur un polymère non imprimé (NIP) obtenu par la même voie de synthèse, mais en l'absence de la molécule empreinte.
- On doit ainsi observer un taux de fixation élevé après passage sur MIP et nul sur le polymère non imprimé.

Sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire



MAA : acide méthacrylique, EGDMA : éthylène glycol diméthacrylate, AIBN : 2,2-azobisisobutyronitrile

Procédure de préparation du polymère à empreinte dirigé contre la 4-L-phénylalaninylamino-pyridine (4-L-PheNHPy)

Sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire

Liaisons mises en jeu avec la molécule cible: liaisons hydrogènes ou interactions électrostatiques.

Polymères faciles à préparer, peu coûteux, excellente stabilité chimique, physique et mécanique. Ils résistent à des températures et des pressions élevées et inertes vis-à-vis des acides, des bases et des solvants organiques.

Les anticorps énantiosélectifs

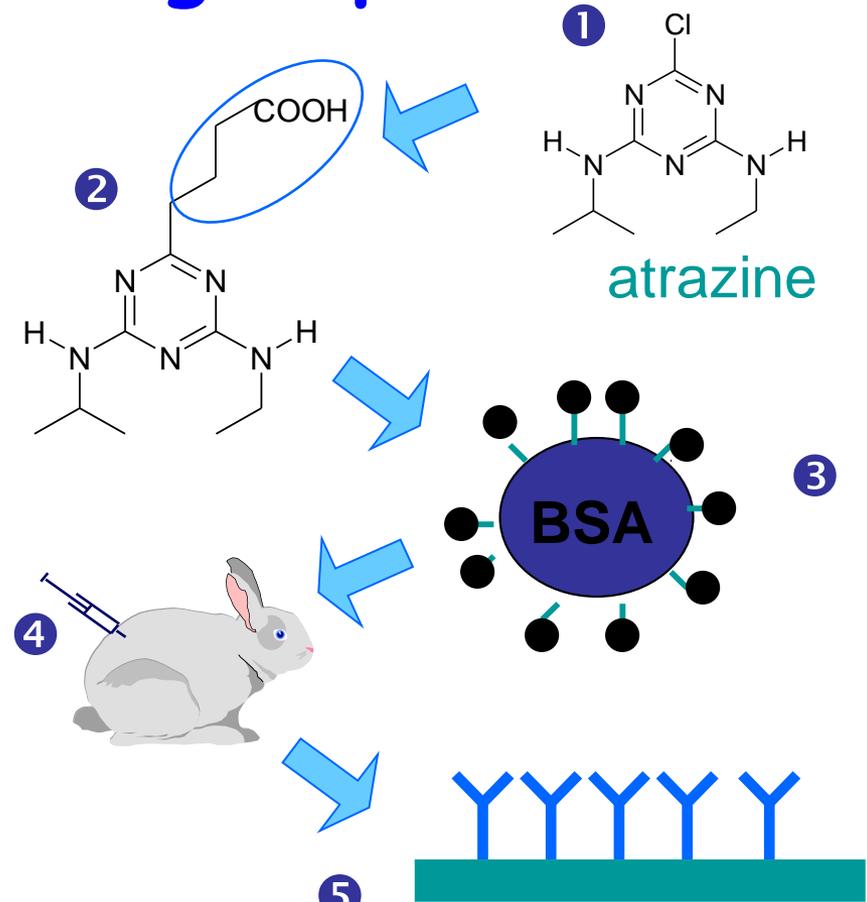
- Les anticorps sont des molécules complexes appartenant à la famille des immunoglobulines.
- Ils ont la particularité de reconnaître et se fixer de façon spécifique à une molécule appelée antigène. Ils reconnaissent une zone précise sur l'antigène nommée épitope.
- Ils peuvent ainsi reconnaître spécifiquement un énantiomère.

Les anticorps énantiosélectifs

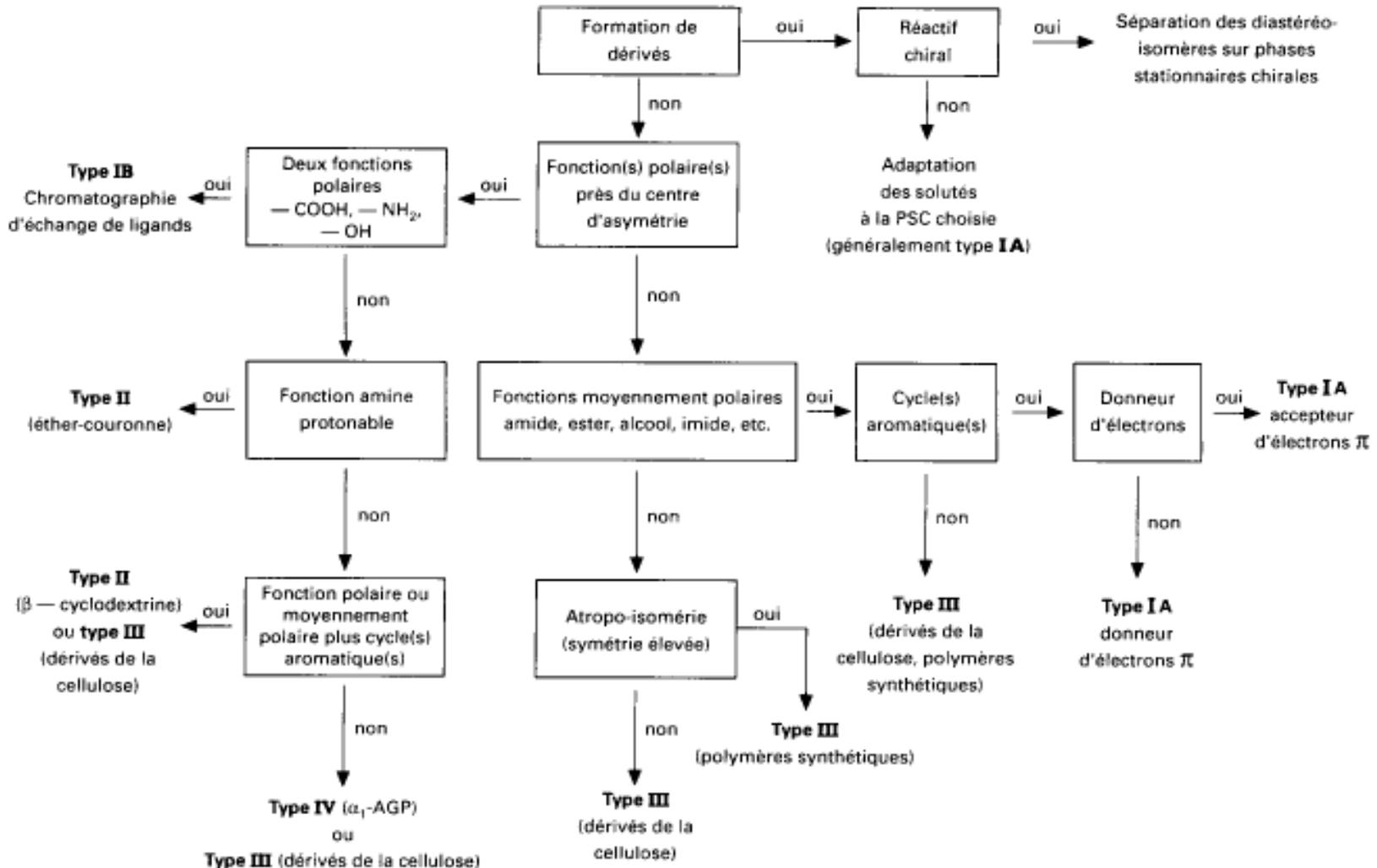
- L'association anticorps–analyte semble être basée sur des interactions électrostatiques, l'effet hydrophobe, des liaisons hydrogène et des interactions de Van Der Waals.
- Les phases stationnaires chirales à base d'anticorps sont utilisées en polarité de phase inversée.
- Une concentration assez élevée de solvants organiques risque d'entraîner la dénaturation des anticorps.

Production des anticorps spécifiques de petites molécules organiques

- 1 Choix de la molécule-cible
- 2 Synthèse de l'haptène
- 3 Greffage à une protéine porteuse= immunoconjugué
- 4 Immunisation puis prélèvement du sérum et purification des anticorps
- 5 Greffage des anticorps (IgGs) sur une phase solide (silice activée glutaraldéhyde ou Gel d'agarose (Sepharose))



Guide de sélection des phases stationnaires chirales



LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

- **Principe:**

Cette chromatographie exploite les propriétés des interactions biologiques afin de séparer et de purifier les substances (enzymes, acides nucléiques, immunoglobulines...)

LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

Principe

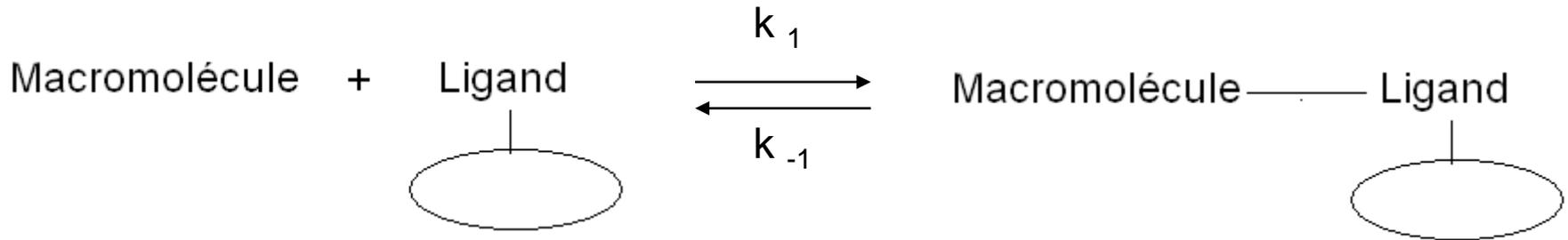
La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur (substrat, un ligand ou un anticorps) qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser.

Trois types d'affinités sont utilisées :

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

LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

- **Principe**



La réussite de la purification, liée à la formation réversible du complexe, est dépendante des valeurs numériques des constantes k_{+1} et k_{-1}

Structure des gels d'affinité

Les supports:

Les supports ou matrices utilisés pour la chromatographie d'affinité peuvent être des billes d'agarose ("*Sepharose*TM", Pharmacia®), de polyacrylamide (Bio-gel), de verre poreux, de polyvinyle, de polyméthacrylate ...

Structure des gels d'affinité

- **Sélection et attachement du ligand:**

Il est essentiel que le ligand possède un groupement chimique permettant son ancrage à la matrice.

Les groupes les plus usuels sont: les groupements NH_2 , COOH , SH et OH .

Structure des gels d'affinité

- L'immobilisation du ligand sur la matrice nécessite qu'elle soit préalablement activée

.

Les méthodes d'activation

- Principe:

Matrice + Agent activateur

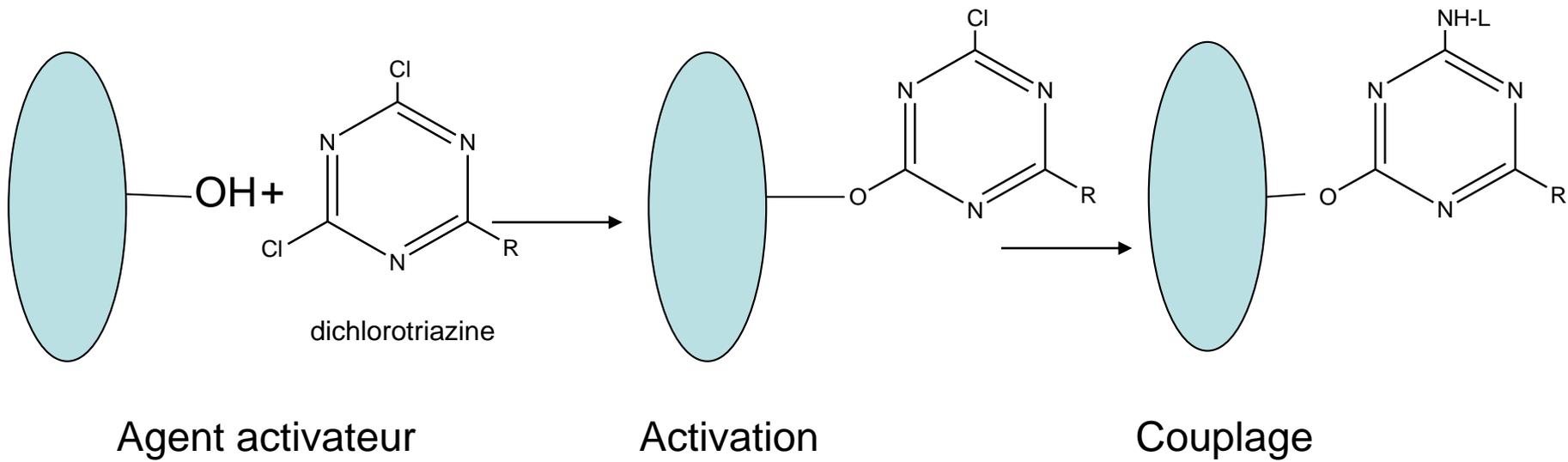


Matrice activée + Ligand



Ligand immobilisé

Les méthodes d'activation



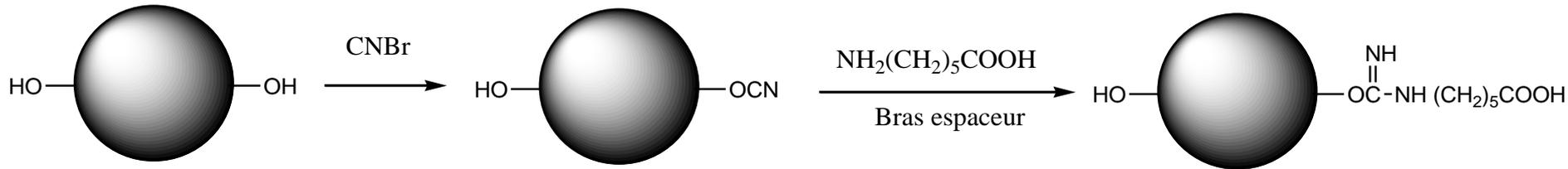
Structure des gels d'affinité

- **Sélection et attachement du ligand:**

Le ligand est généralement fixé sur la matrice par l'intermédiaire d'un bras espaceur. Ce bras espaceur a pour rôle de minimiser les encombrements stériques entre la macromolécule cible et la matrice.

- La longueur optimale du bras espaceur varie entre 6 et 10 atomes de carbone. Certains espaceurs sont purement hydrophobes, d'autres sont hydrophiles.

Bras espaceurs portés par certains gels pour chromatographie d'affinité



Le bras espaceur contient un second groupe fonctionnel sur lequel le ligand peut être fixé

Adsorption

- l'adsorption de la molécule à séparer sur le ligand fixé à la résine est effectuée dans des conditions physico-chimiques (pH, force ionique, concentration de la molécule à adsorber...) favorables à la liaison molécule – ligand.
- dans ces conditions, les molécules du mélange à séparer qui n'ont pas (ou peu) d'affinité pour le ligand sont éluées au fur et à mesure que le mélange passe sur la résine.

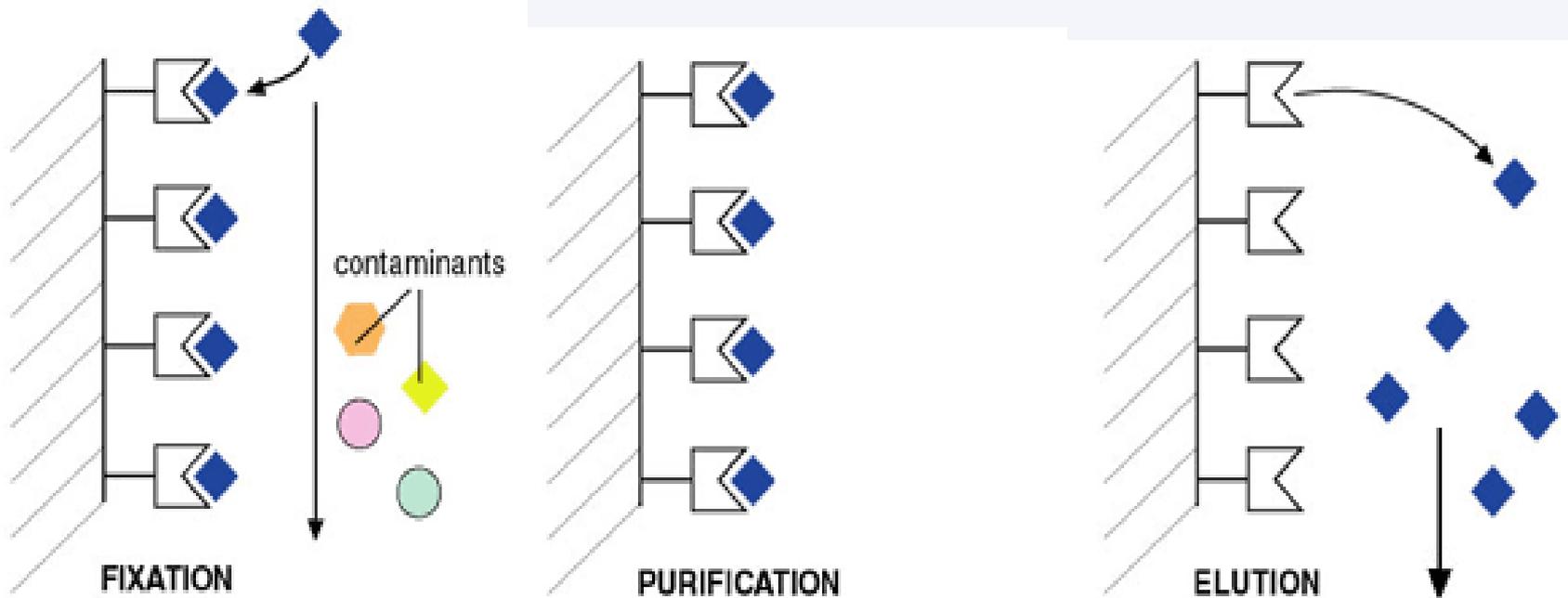


Figure 1 : Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

1 - Etape de FIXATION : Le mélange de molécules contenant le composé à purifié 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.

Désorption

L'élution de la macromolécule fixée est effectuée soit spécifiquement (avec un compétiteur) soit non spécifiquement

- en changeant les conditions physico-chimiques (pH, force ionique) initiales pour affaiblir l'interaction (ligand-macromolécule) (méthode non spécifique).

La variation de pH ou de force ionique (NaCl) provoque un changement de conformation de la molécule d'intérêt qui lui fait perdre son affinité pour le ligand.

- en utilisant un produit chimique structuralement analogue au ligand et, si possible, ayant encore plus d'affinité pour la molécule d'intérêt. Quelque fois il peut même s'agir de la forme libre du ligand (méthode spécifique).

LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ:

Applications

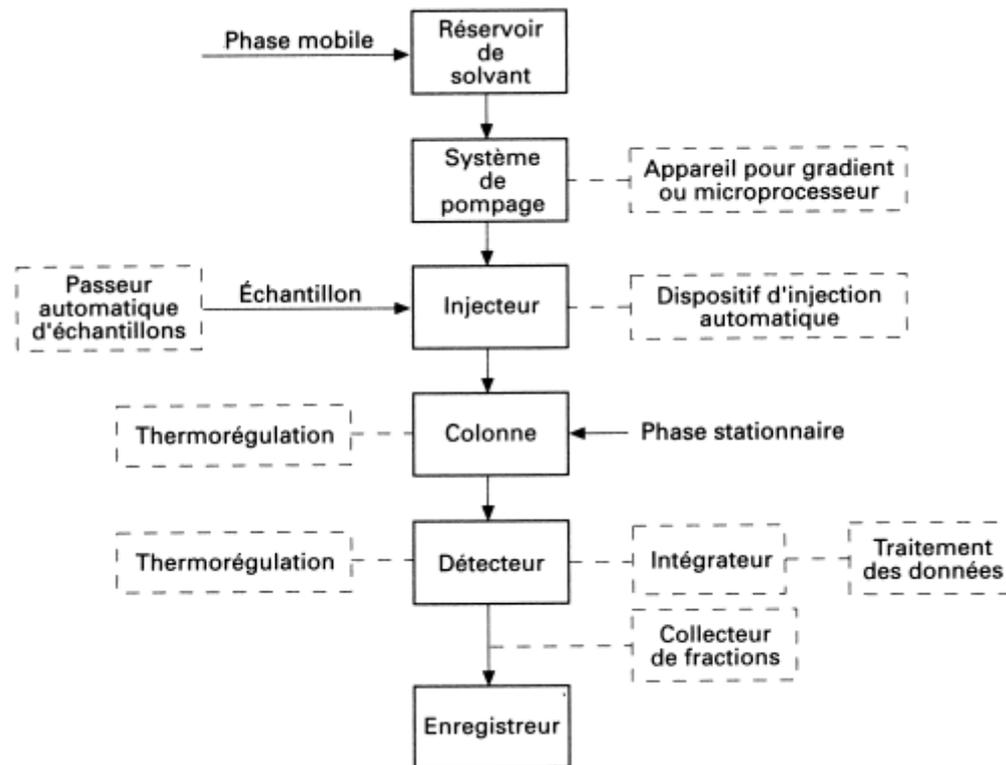
Ligand fixé sur le support	Macromolécule	Affinité	Mode d'éluion
Anticorps	Antigène	très forte	pH
Antigène	Anticorps	très forte	pH
protéine A, protéine G	IgG (différentes classes et sous-classes)	forte (Fc d'IgG)	pH
glutathion	glutathion S-transférases, protéines fixant le glutathion, protéines de fusion incluant la glutathion S-transférase	forte	glutathion
calmoduline	ATPases, protéine kinases, phosphodiésterases, neurotransmetteurs	forte	
L-arginine, p-aminobenzamidine	protéases à sérine		
L-lysine	plasminogène (et activateur), ARNr		
AMP, ADP, ATP	Enzyme à cofacteurs	moyenne	cofacteur
Lectines (concanavalline A, WGH, HPL ...)	protéines glucannées, glucolipides, polysaccharides, lymphocytes T	moyenne à forte	glucanne
Héparine	facteurs de croissance et de coagulation, récepteurs stéroïdiens, endonucléases, lipoprotéines, lipases	moyenne	force ionique
Poly nucléotides	séquences complémentaires	très forte	oligonucléotide, température, agents dénaturants
Colorant rouge	enzymes à cofacteur NADP, carboxypeptidase G		
Colorant bleu (cibacron)	Enzymes à cofacteurs NAD ou NADP, albumine, facteurs de coagulation, interféron	moyenne	

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

- Qualité des séparations grandement améliorées par l'utilisation de particules de très faible taille (3 - 10 μm)
- Pb: Augmentation considérable de la résistance au passage du solvant (= perte de charge), impliquant la nécessité d'employer des pompes à haute pression pour pousser les solvants (et des tubes résistants pour y mettre les phases stationnaires) : ainsi naquit la chromatographie liquide à haute performance/pression (C.L.H.P. - ou HPLC en anglais).

Chromatographie en phase liquide

Appareillage et applications

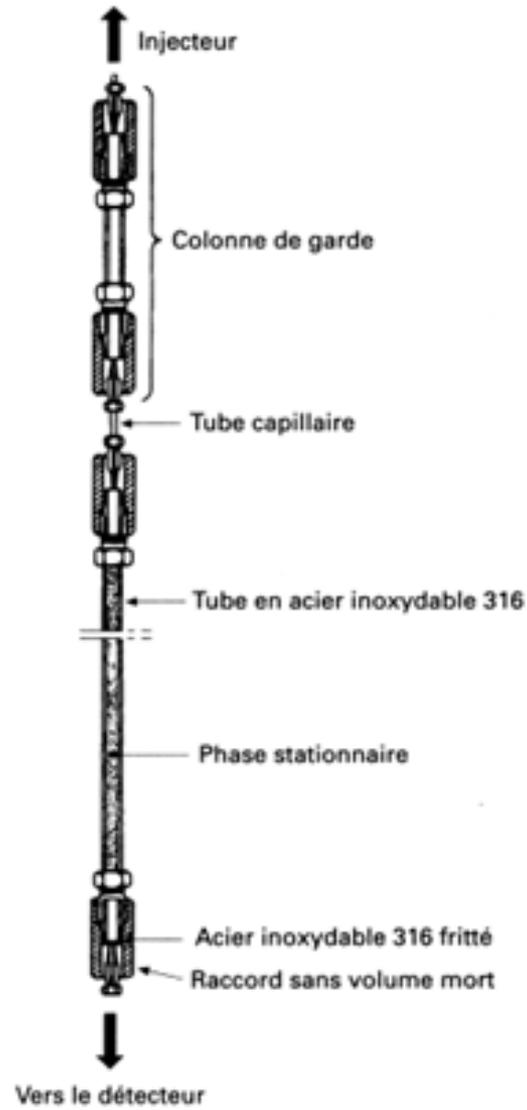


Différents modules, aux fonctions définies, reliés entre eux par de courtes canalisations de faible diamètre interne (0.1 mm) en acier inoxydable ou en peek (polyether-etherketone), polymère souple pouvant résister aux solvants usuels et à l'utilisation de fortes pressions.

Chromatographie en phase liquide

Appareillage

Tout appareil de CLHP comportent différents modules, aux fonctions définies, Ces modules sont reliés entre eux par de courtes canalisations de faible diamètre interne (0.1 mm) en acier inoxydable ou en peek (polyether-etherketone), polymère souple pouvant résister aux solvants usuels et à l'utilisation de fortes pressions.



Réservoir de solvant (éluant)

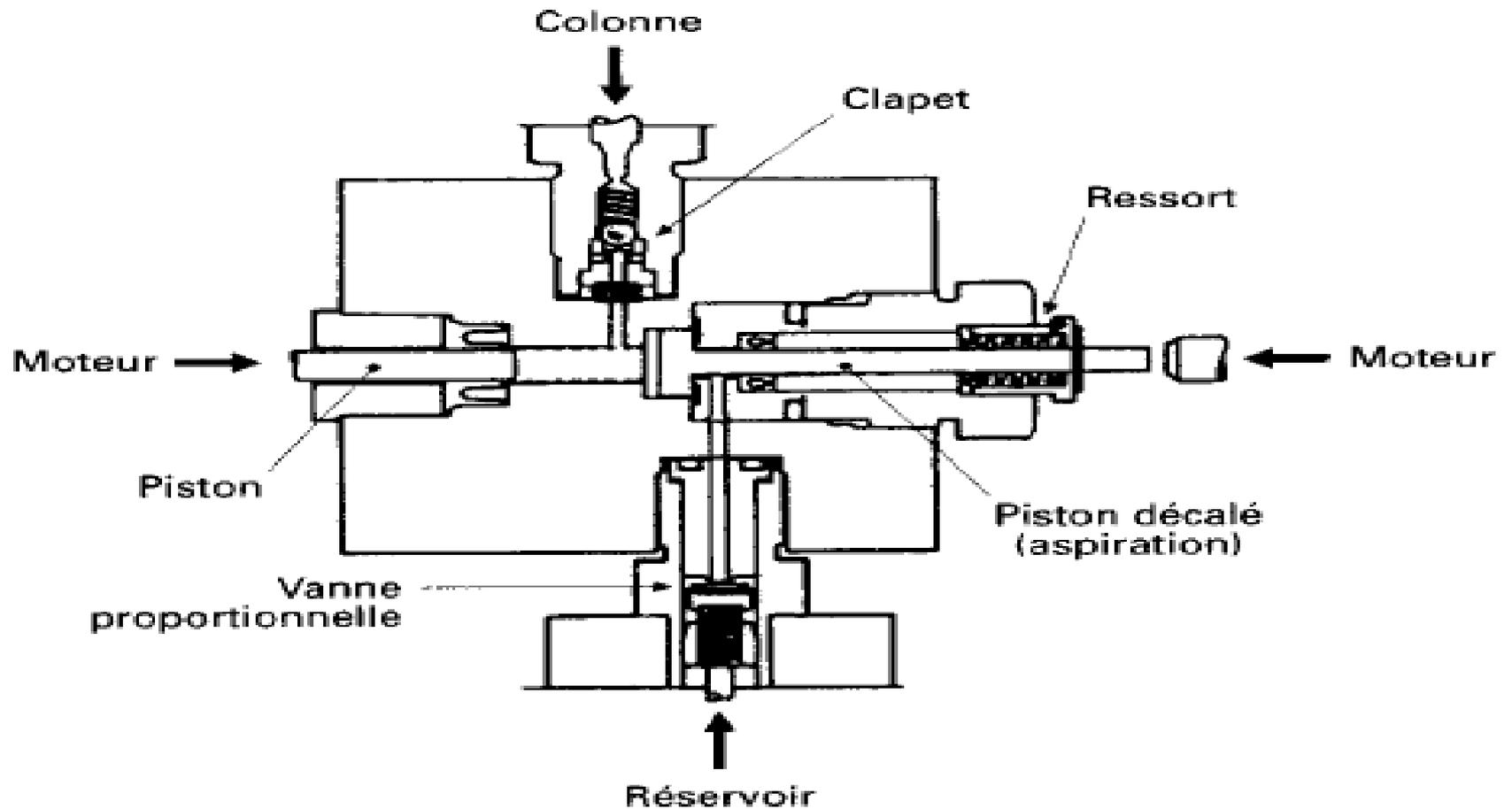
Ils contiennent la phase mobile. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse

Systeme de pompage

Le dégazage de la phase mobile est une opération obligatoire en chromatographie phase liquide. Il se fait par barbotage d'hélium dans la phase mobile.

Un appareil de CLHP comporte une ou plusieurs pompes. Ces pompes doivent gérer des débits compris entre 0.1 et 10 ml/min avec une variation inférieure à 0.5%. Le débit doit être régulier (absence de pulsations). Elles doivent résister à la corrosion. Faible volume de la chambre de mélange afin de permettre un changement aisé de solvant.

Pompe utilisée en CHPL



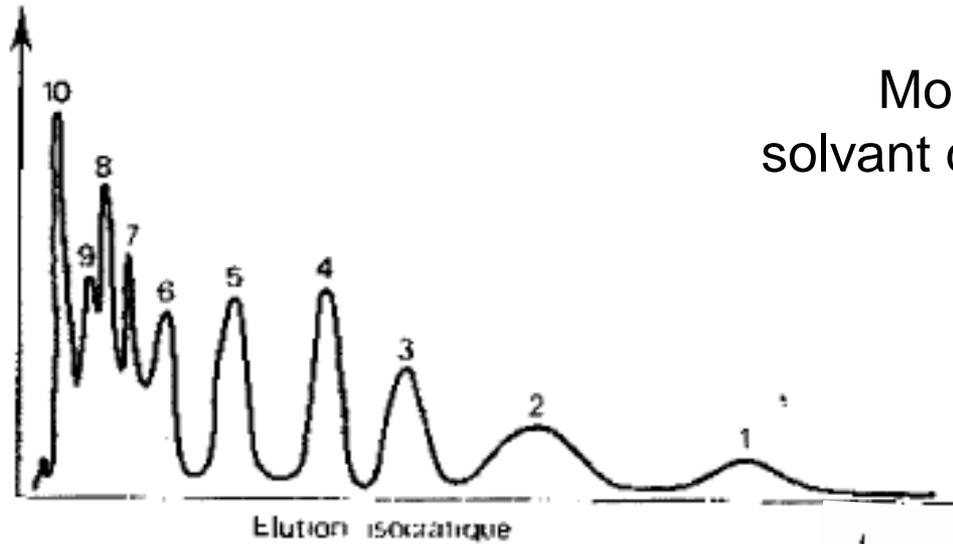
Systeme de pompage

Elle est muni d'un systeme 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.

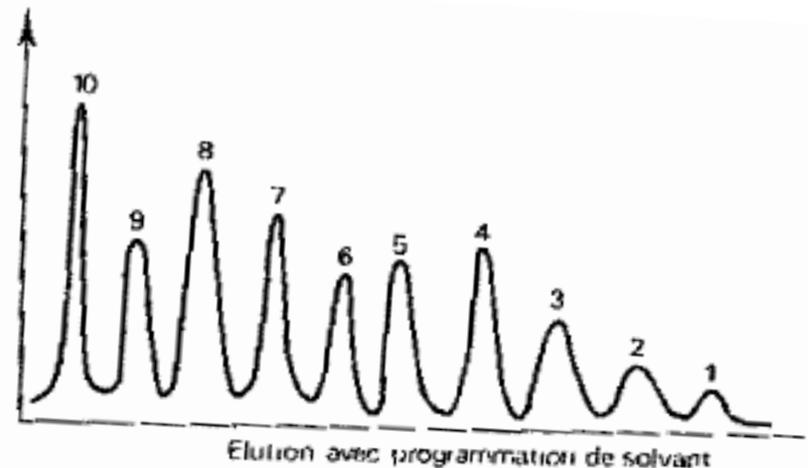
Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min .

Mode isocratique - Mode gradient



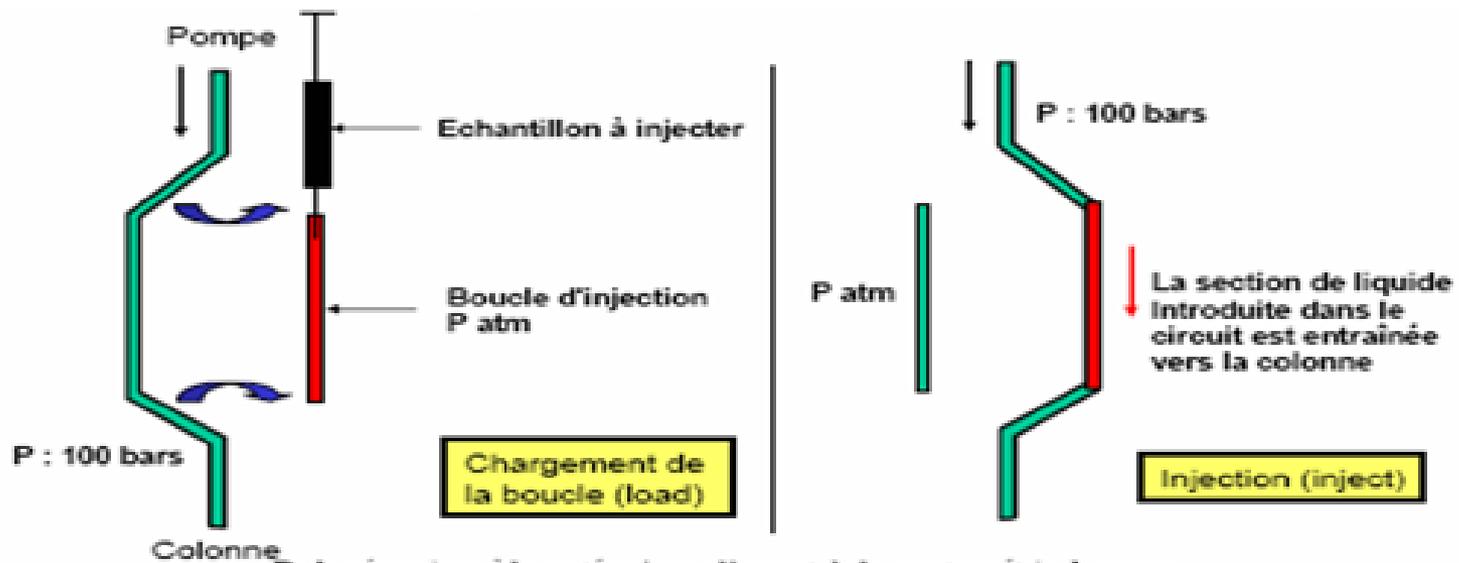
Mode isocratique:
solvant de polarité moyenne

Mode gradient:
d'un solvant moins polaire
à un solvant plus polaire

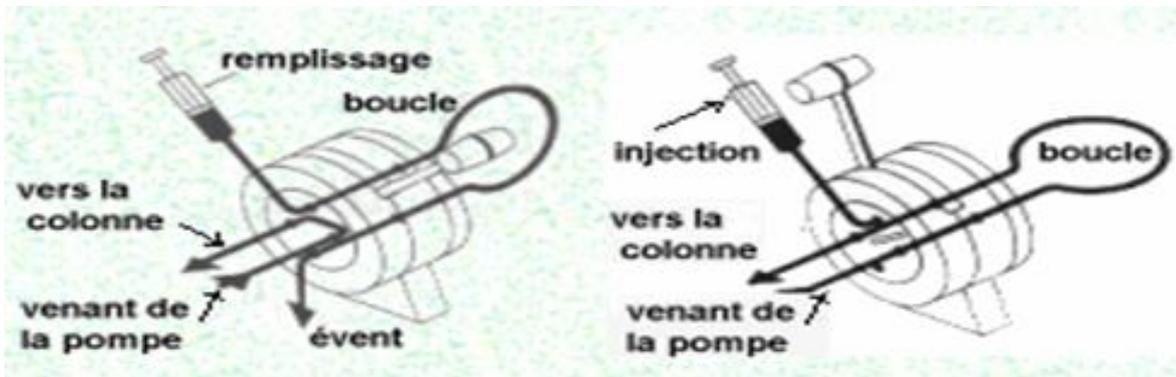
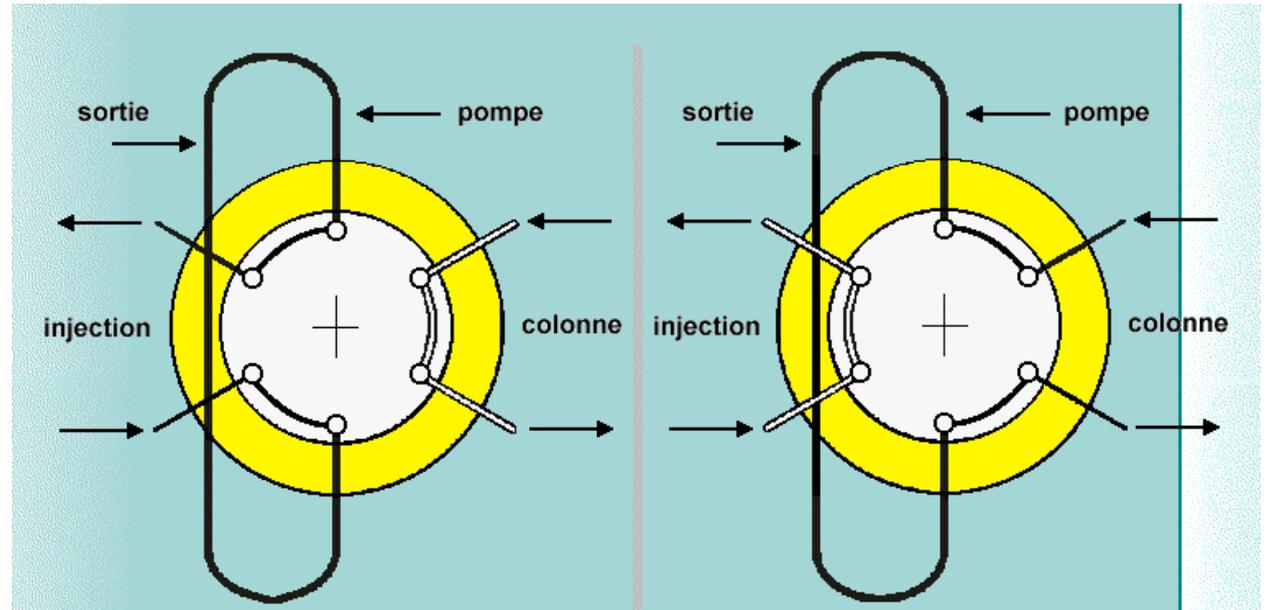


Le système d'injection

L'injection consiste à faire passer un volume de liquide contenant l'échantillon de la pression atmosphérique à une pression d'au moins 100 bars et ceci très rapidement.

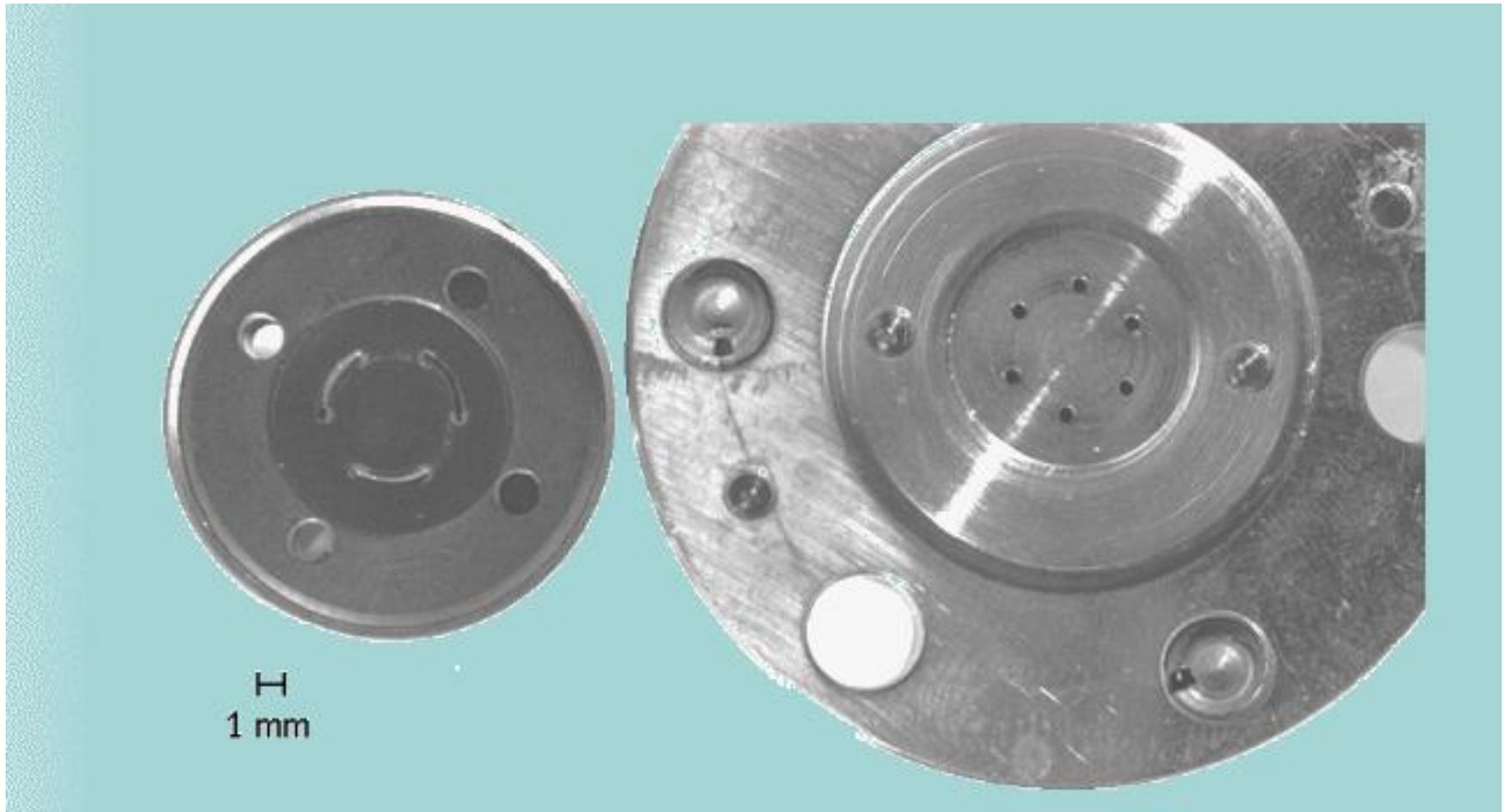


Vanne d'injection à boucle externe



Vanne Rheodyne

Vanne Rheodyne



Colonne de garde (précolonne)

Une précolonne (courte colonne de protection) doit être placée en amont de la colonne analytique afin d'augmenter la durée de vie de la colonne. Cette précolonne permet d'éliminer les poussières et les contaminants contenus dans les solvants. La composition de la précolonne doit être identique à celle de la colonne analytique

La colonne

- Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4mm et 75 μ m pour des longueurs généralement de 5 à 20 cm.

La colonne

Le choix de la colonne est conditionnée par la quantité de soluté à analyser et sa nature.

Diamètre	Nomenclature	Débit	Quantité
4 mm	Conventionnel LC	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$	1-200 μg (10000 fmol)
2 mm	Narrowbore LC	200 $\mu\text{L}/\text{min}$	2-50 μg (5000 fmol)
1mm	Micro LC	40 $\mu\text{l}/\text{min}$	0,05-10 μg (1000 fmol)
300 μm	Capillaire LC	4 $\mu\text{l}/\text{min}$	1 ng-1 μg (500 fmol)
75 μm	Nano LC	200 nl/min	0,02-0,05 ng (1 fmol)

Les colonnes

Colonnes classiques, micro colonne, colonne capillaire et nano colonne



De la génomique à la protéomique : l'apport de la spectrométrie de masse
Jean-Marc Strub (5-10 décembre – Roscoff)

Les détecteurs

Le détecteur doit permettre de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés en sortie de colonne. Il n'existe en CLHP pas de détecteur universel mais des détecteurs spécifiques.

DÉTECTEURS EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

- Pas de détecteur universel, le détecteur utilisé dépend de la nature du soluté

Deux types de détection basés:

- sur les propriétés générales (solvant + soluté); ex: indice de réfraction, conductivité, constante diélectrique...
- sur les propriétés des solutés; ex: UV, polarographie, radioactivité,...

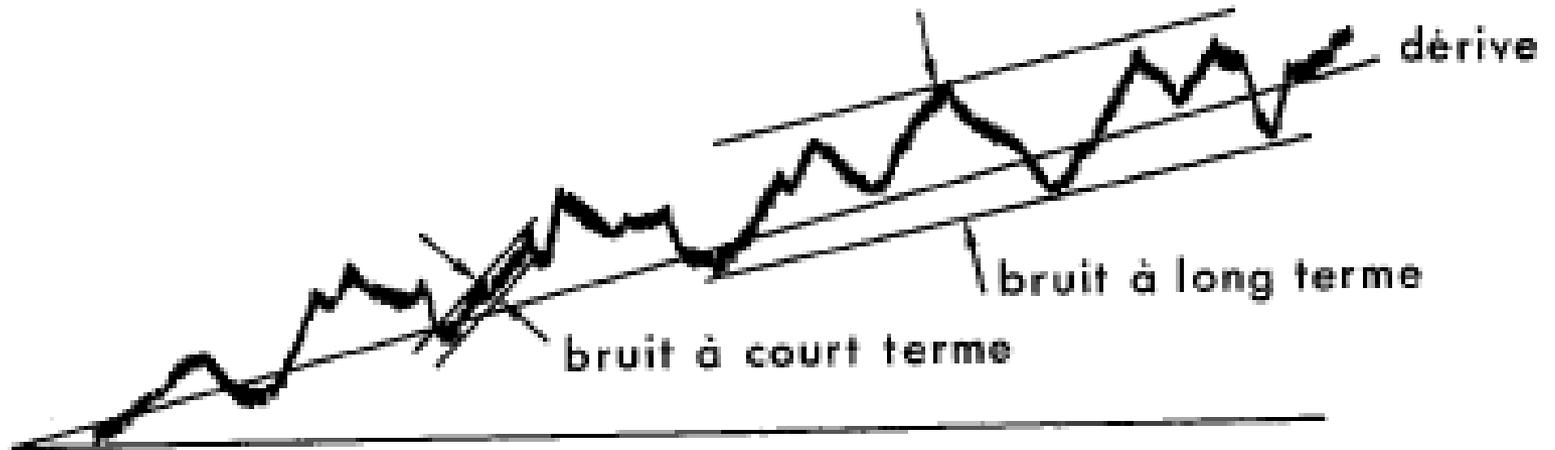
Principaux paramètres des détecteurs

Bruit: se définit comme la variation du signal non attribuable au passage du soluté dans la cellule.

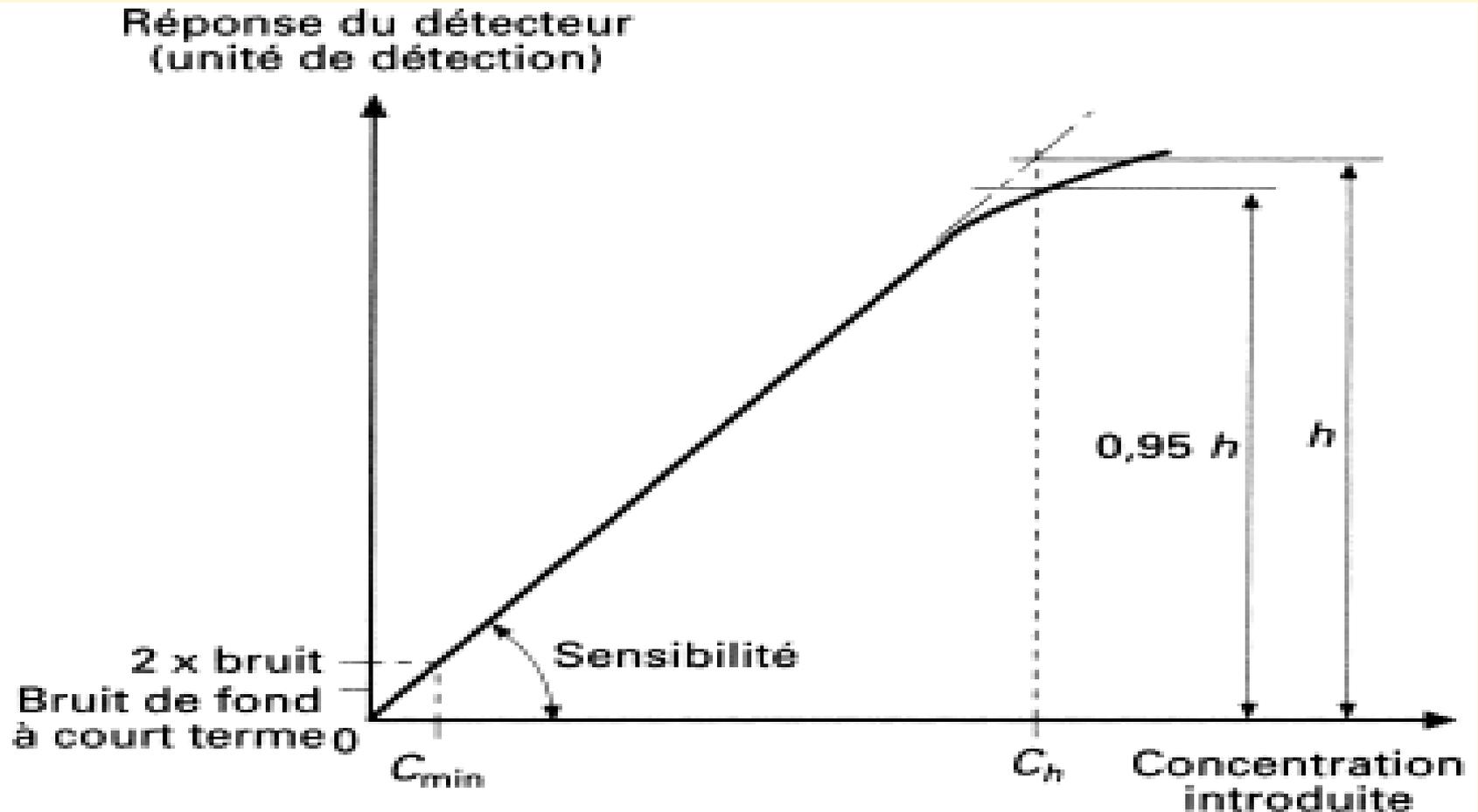
Sensibilité: Concentration minimale de soluté détectable pour un signal au moins égal à trois fois la hauteur du bruit de fond.

Linéarité: région où il y a une proportion linéaire entre le signal et la concentration du soluté.

Différents type de bruit de détecteurs chromatographiques

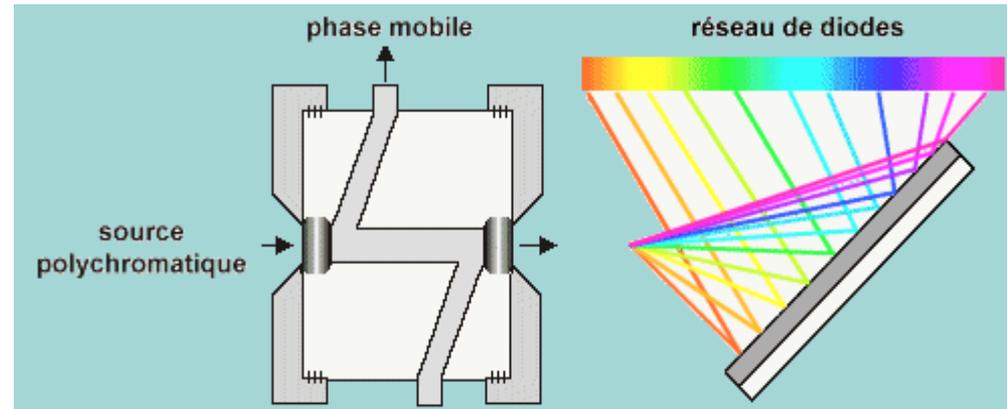
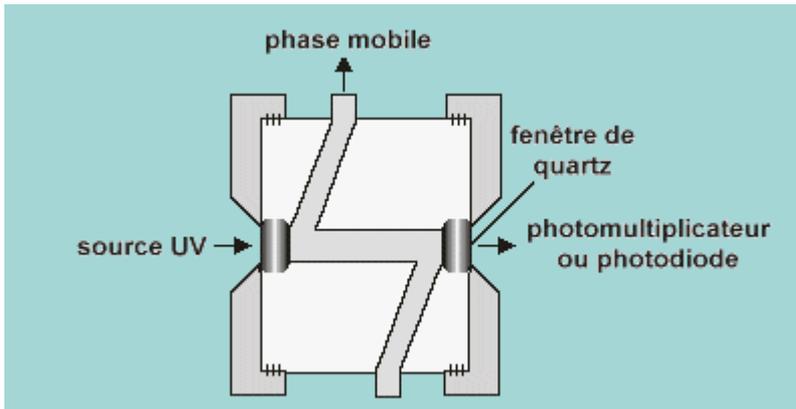


Variation de la réponse du détecteur en fonction de la concentration de soluté introduite



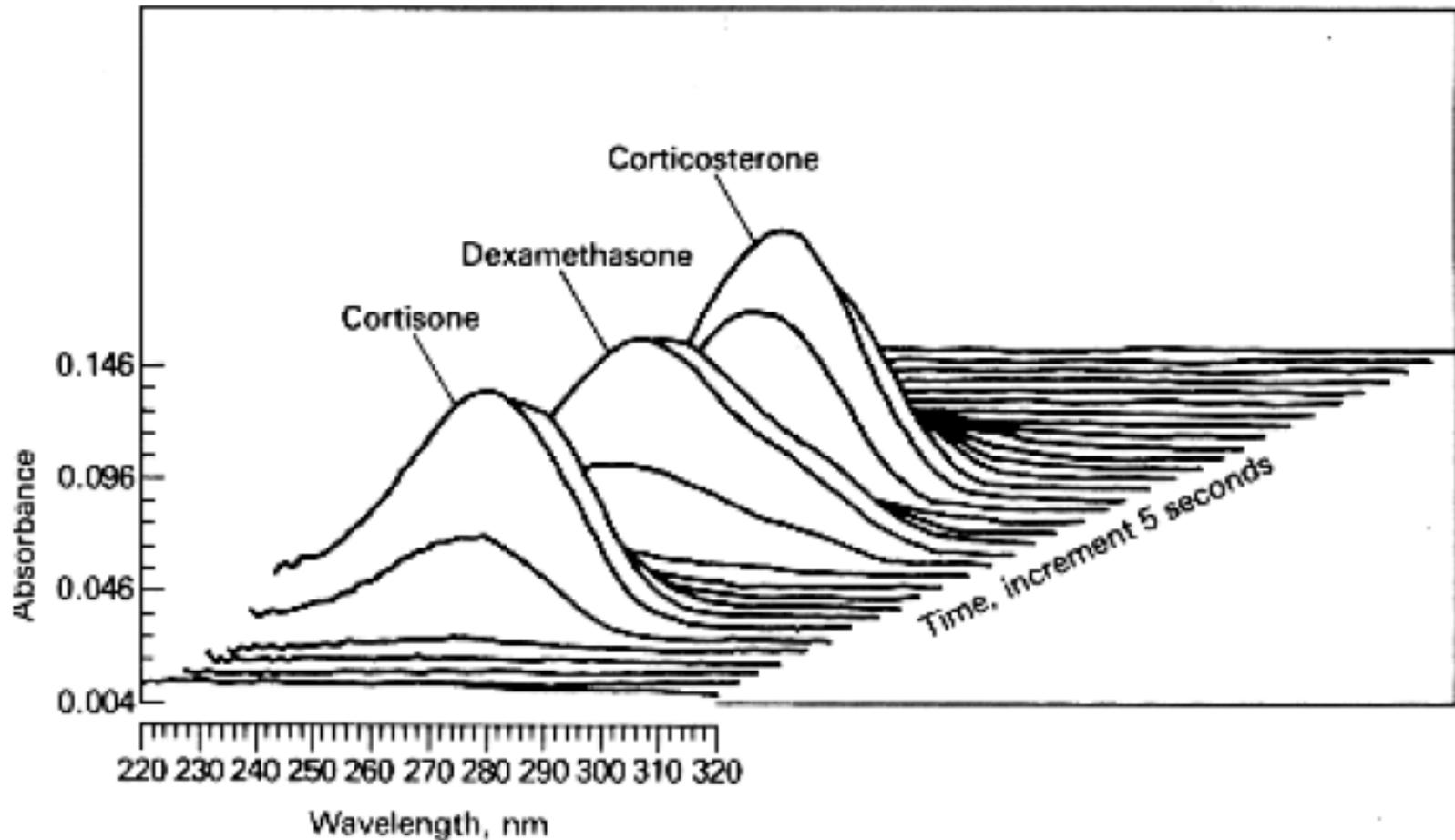
Spectroscopie dans l'ultraviolet et le visible

- Mesure l'absorbance absolue d'un solvant + soluté à longueur d'ondes fixe 254 ou 280 nm ou à longueur d'ondes variable entre 190 et 800 nm.



Cellule en forme de Z, afin de minimiser l'élargissement des pics hors colonne, le volume de la colonne est réduit au maximum (1 à 10 μ l)

Enregistrement tridimensionnel (absorbance-temps-longueur d'onde)



Loi de Beer-Lambert :

$$A = D.O = \log (I_0 / I) = \varepsilon l c$$

A: absorbance,

D.O: la densité optique,

I₀: l'intensité lumineuse incidente,

I: l'intensité lumineuse transmise,

ε: le coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée en L mol⁻¹ cm⁻¹,

l : l'épaisseur traversée en cm

C: la concentration en mol.L⁻¹.

Avantages:

Sensibilité: détection de substances de concentration égale à 5×10^{-7} et 5×10^{-8} M

Sélectivité: il est possible de choisir une ou des longueurs d'ondes correspondant à certaines substances choisies plutôt que toutes. Les détecteurs pouvant mesurer l'absorbance à quatre longueurs d'ondes simultanément permettent de s'assurer de l'homogénéité d'un pic et ainsi se rendre compte d'une possible coélution.

- renseignements spectraux sur substances par le spectre UV (réseau de diodes);
- peu sensible aux variations de débit et de température;
- utilisation et entretien facile;
- peut être utiliser en mode gradient d'élution.

Inconvénients:

- les substances doivent être chromophores
- facteurs de réponse différents pour chaque composés

Limites d'utilisation de divers solvants dans l'ultraviolet

Solvants	Longueur d'onde limite d'utilisation dans l'UV (« UV cutoff ») (nm)	Viscosité à 25 °C (cP)	Point d'ébullition (° C)
<i>n</i> -Pentane	195	0,22	36
<i>n</i> -Hexane	190	0,30	69
Cyclohexane	200	0,90	81
<i>n</i> -Heptane	195	0,40	98
Triméthyl 2,2,4-pentane (isooctane) ..	197	0,47	99
Benzène	280	0,60	80
Toluène	285	0,55	110
Tétrachlorure de carbone	265	0,90	77
Chloroforme	245	0,53	61
Dichlorométhane (chlorure de méthylène)	233	0,41	40
Dichloro 1,2 éthane	228	0,78	83
Diéthoxyde (éther diéthylique)	218	0,24	35
Di-isopropyloxyde (éther isopropylique)	220	0,38	68
Tétrahydrofuranne	212	0,46	66
Dioxanne	215	1,20	101
Acétate d'éthyle	256	0,43	77
Acétonitrile	190	0,34	82
Acétone	330	0,30	56
Propanol 2 (isopropanol)	205	1,90	82
Éthanol	210	1,08	78
Méthanol	205	0,54	65
Diméthylformamide	268	0,80	153
Eau		0,89	100

FLUORIMÉTRIE

Certains composés organiques absorbent des radiations dans l'ultraviolet et réémettent une fraction de la lumière absorbée à une longueur d'onde supérieure, d'intensité proportionnelle à l'intensité lumineuse absorbée et donc à la concentration.

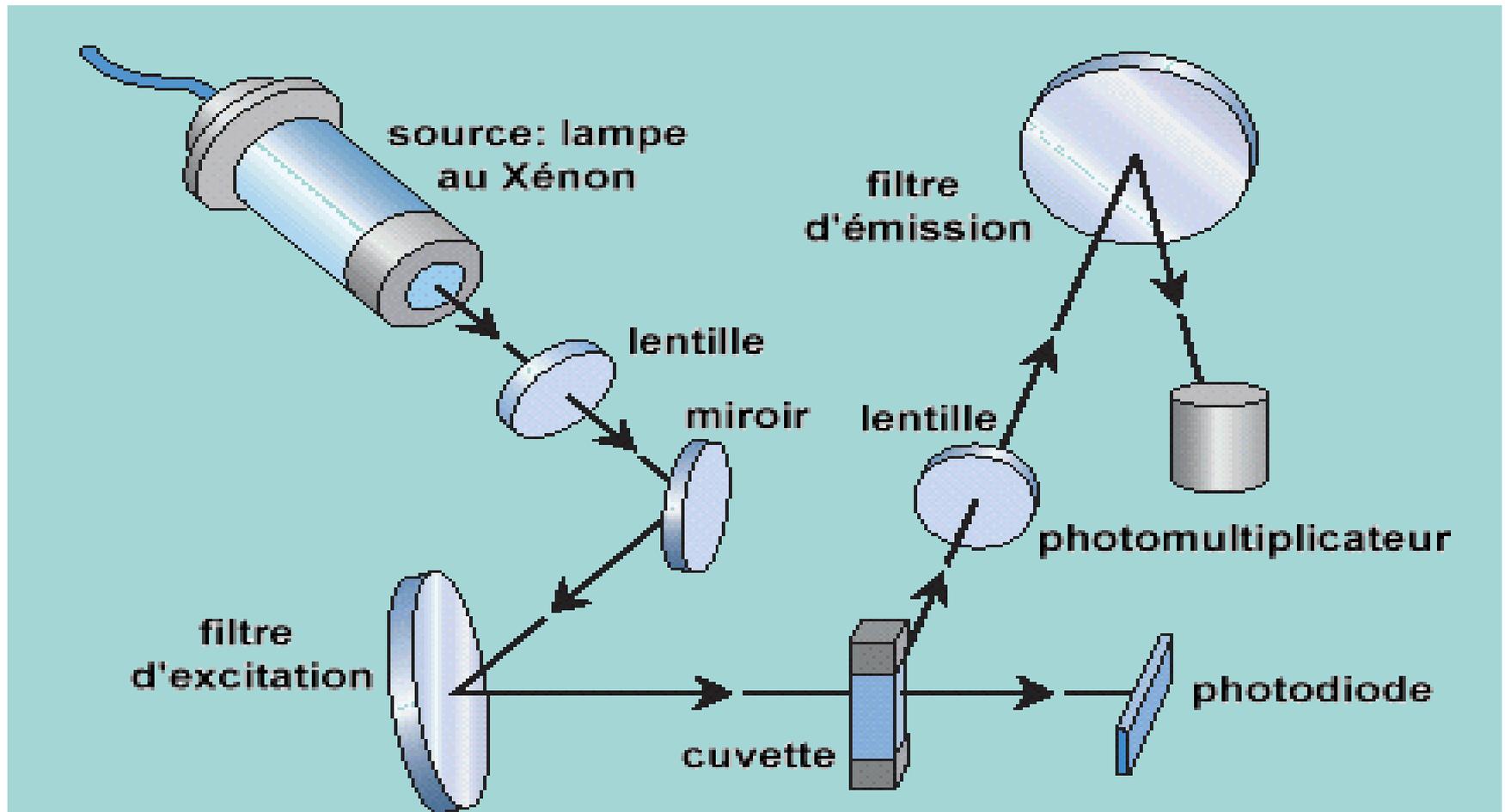
La fluorimétrie mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. L'émission de lumière est mesurée à angle droit du faisceau d'excitation.

FLUORIMÉTRIE

- La loi fondamentale de la fluorimétrie indique que l'intensité du rayonnement émis par fluorescence (I_f) est proportionnelle, pour un volume de solution donné, à l'intensité lumineuse absorbée :

$$I_f = k I_{\text{abs}} = k (I_0 - I)$$

FLUORIMÉTRIE

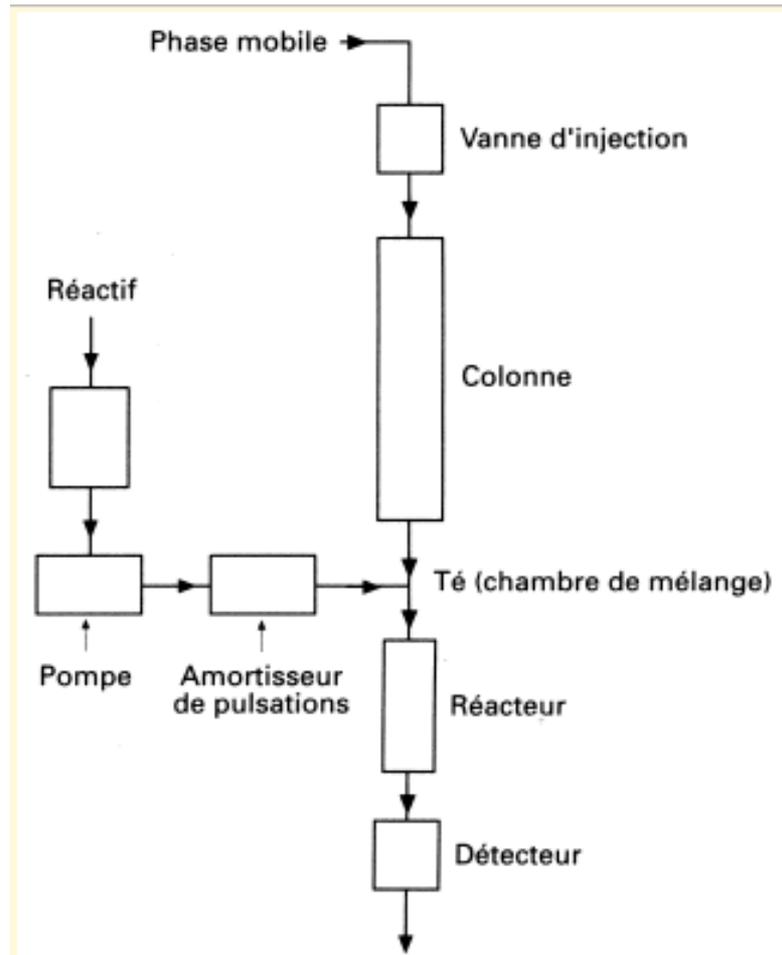


FLUORIMÉTRIE

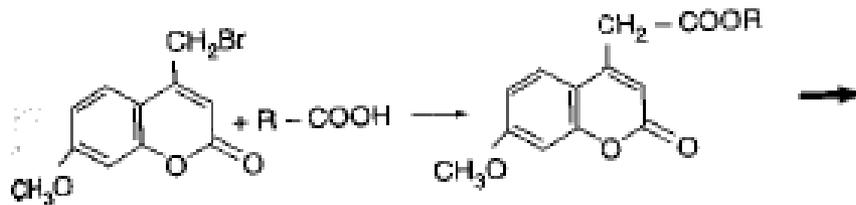
La détection fluorimétrique est utilisée pour les composés fluorescents ou les dérivés fluorescents de certains composés (synthèse de dérivés fluorescents).

Ces dérivés fluorescents sont préparés soit avant injection, soit en sortie de colonne chromatographique.

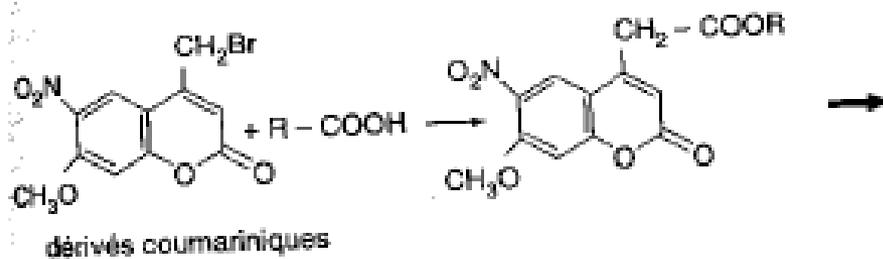
Principe d'un dispositif de dérivation postcolonne



Exemple de greffage de dérivés fluorophores



Détection par fluorimétrie



Avantages:

- encore plus sensible que le détecteur UV
- très spécifique
- peu sensible aux variations de débit et de température
- peut être utiliser en mode gradient d'élution

Inconvénients:

- les substances doivent être fluorescentes
- sensible à l'oxygène dissous dans la phase mobile.

RÉFRACTOMÉTRIE

Mesure de manière continue la différence d'indice de réfraction entre une phase mobile (éluant + substance) circulant dans la cellule de mesure et l'éluant circulant dans la cellule de référence.

La limite de détection dépend à la fois de la nature du soluté et de celle de la phase éluante.

Le réfractomètre mesure la variation d'indice de réfraction en sortie de colonne (par rapport à l'indice de réfraction de la phase mobile)

RÉFRACTOMÉTRIE

- La réponse donnée par le réfractomètre (R1):

$$R1 = Z \sum p_i (n_i - n_0)$$

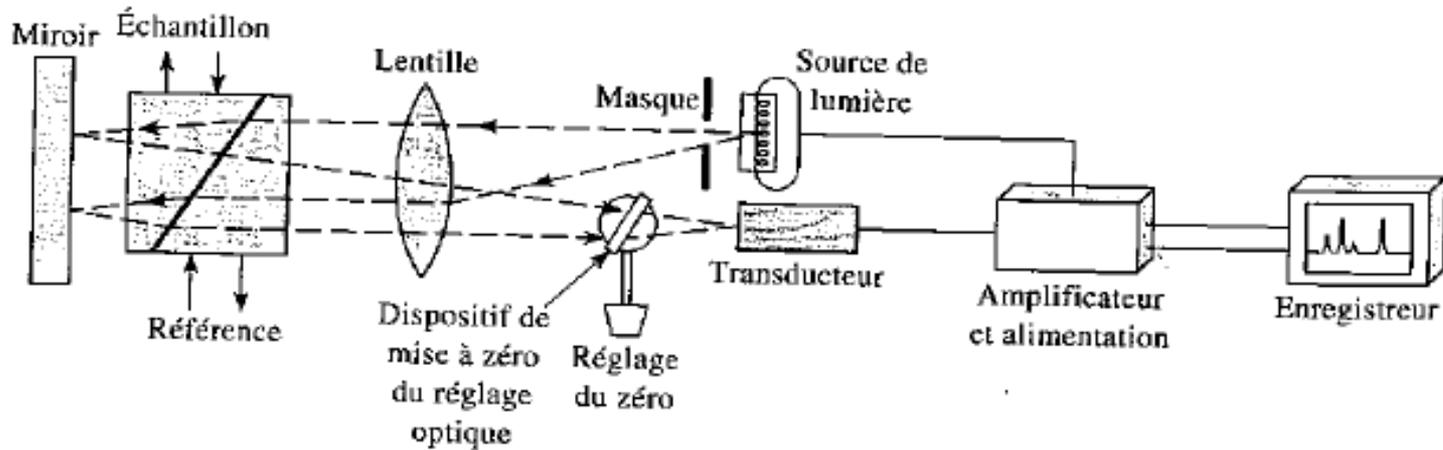
Z = cte caractéristique de l'appareil

n_i = indice de réfraction du soluté i

n_0 = indice de réfraction de la phase mobile

p_i = fraction massique du soluté i dans l'effluent

RÉFRACTOMÉTRE



La phase mobile traverse l'un des compartiment de la cellule avant de pénétrer dans la colonne, tandis que l'autre compartiment est occupé par l'effluent (soluté + phase mobile). Ces deux compartiment sont séparés par une lame de verre orientée de sorte que le rayonnement incident soit dévié lorsque les indices de réfraction des deux milieux ne sont pas égaux. La variation du signal, amplifié et enregistré fournit le chromatogramme

RÉFRACTOMÉTRIE

Avantages:

- détecteur universel qui n'est limité que dans le cas où la substance à analyser possède un indice de réfraction égal à celui de l'éluant
- facteur de réponse semblable pour produits de même classe

RÉFRACTOMÉTRIE

Inconvénients:

- manque de sensibilité en général
- très sensible vis-à-vis la température qui doit être contrôlée à 0,001
- sensible aux variations de débit
- gradient d'élution utilisable seulement dans le cas où les différents solvants ont des indices de réfraction semblables

Détection électrochimique

Différents types de détecteurs:

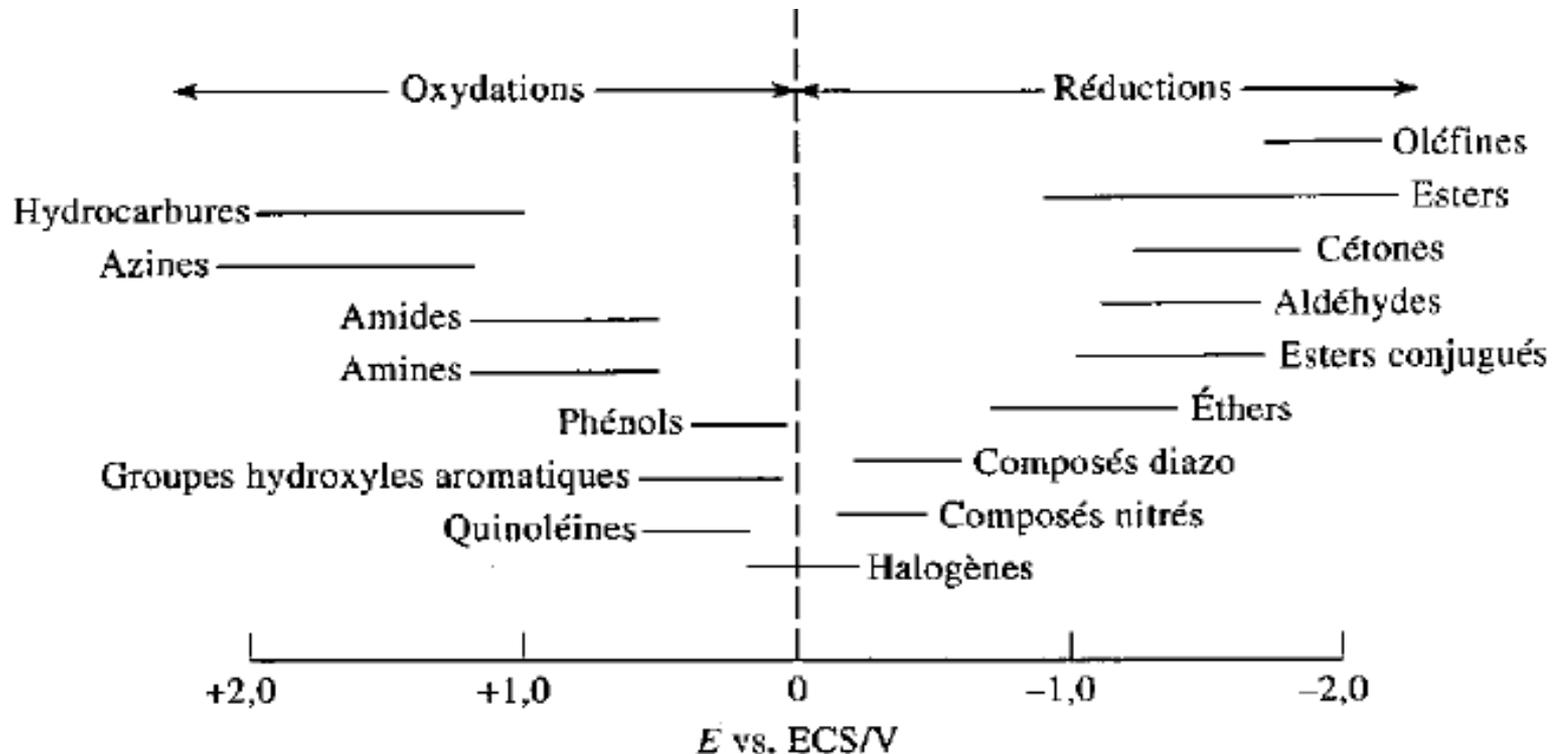
- **Ampérométrie**
- **Coulométrie**
- **La polarographie**
- **La mesure de conductivité**

Détection électrochimique

- On mesure le courant qui circule dans une cellule d'électrolyse lors de l'oxydation ou de la réduction du soluté contenu dans la phase mobile.

Détection électrochimique

- Détection de molécules douées de propriétés oxydoréductrices



Avantages:

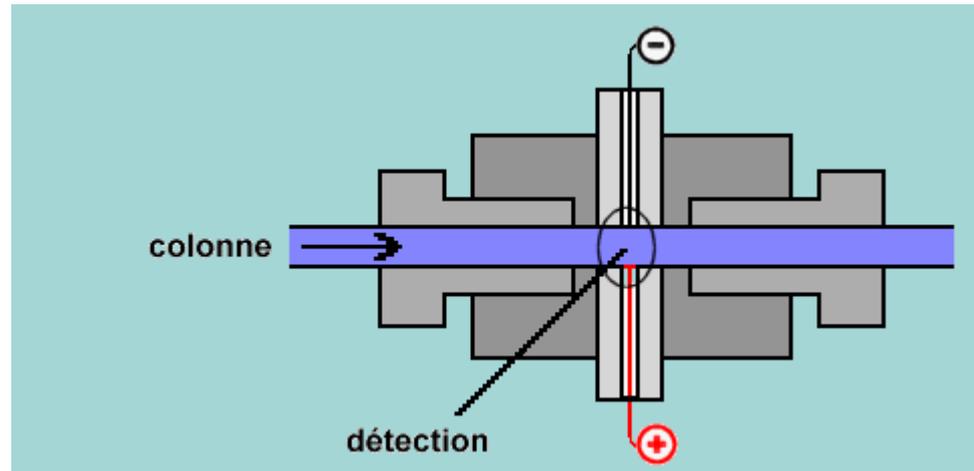
- très spécifique pour les ions métalliques, anions inorganiques, composés nitrés, acides aminés et alcaloïdes;
- très sensible.

Inconvénients:

- modification de l'échantillon;
- sensible à la phase mobile (pH);
- sensible à la présence d'oxygène dissous;
- sensible au débit et à la température;
- entretien constant des cellules.

CONDUCTIVITÉ

- Mesure la conductivité électrique due à la présence d'un soluté dans la phase mobile (de façon absolue ou différentielle).



CONDUCTIVITÉ

Avantage:

détecteur utilisé pour solutés ioniques.

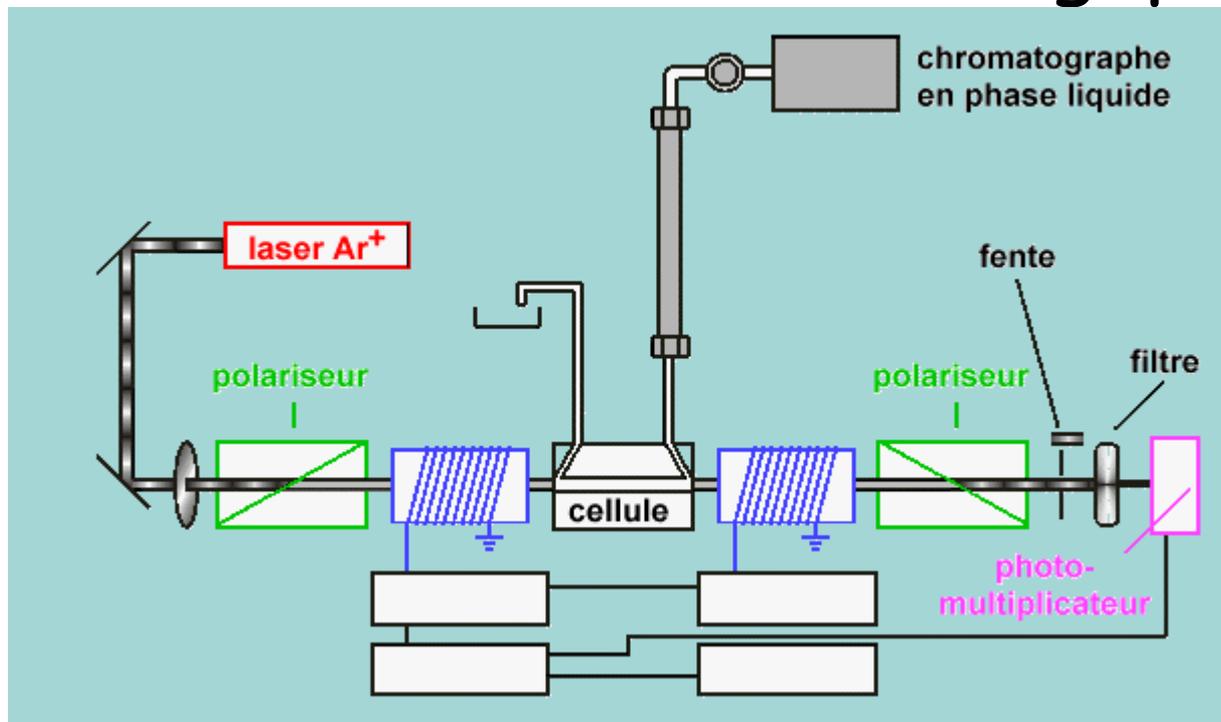
Inconvénient:

sensibilité très grande à la température.

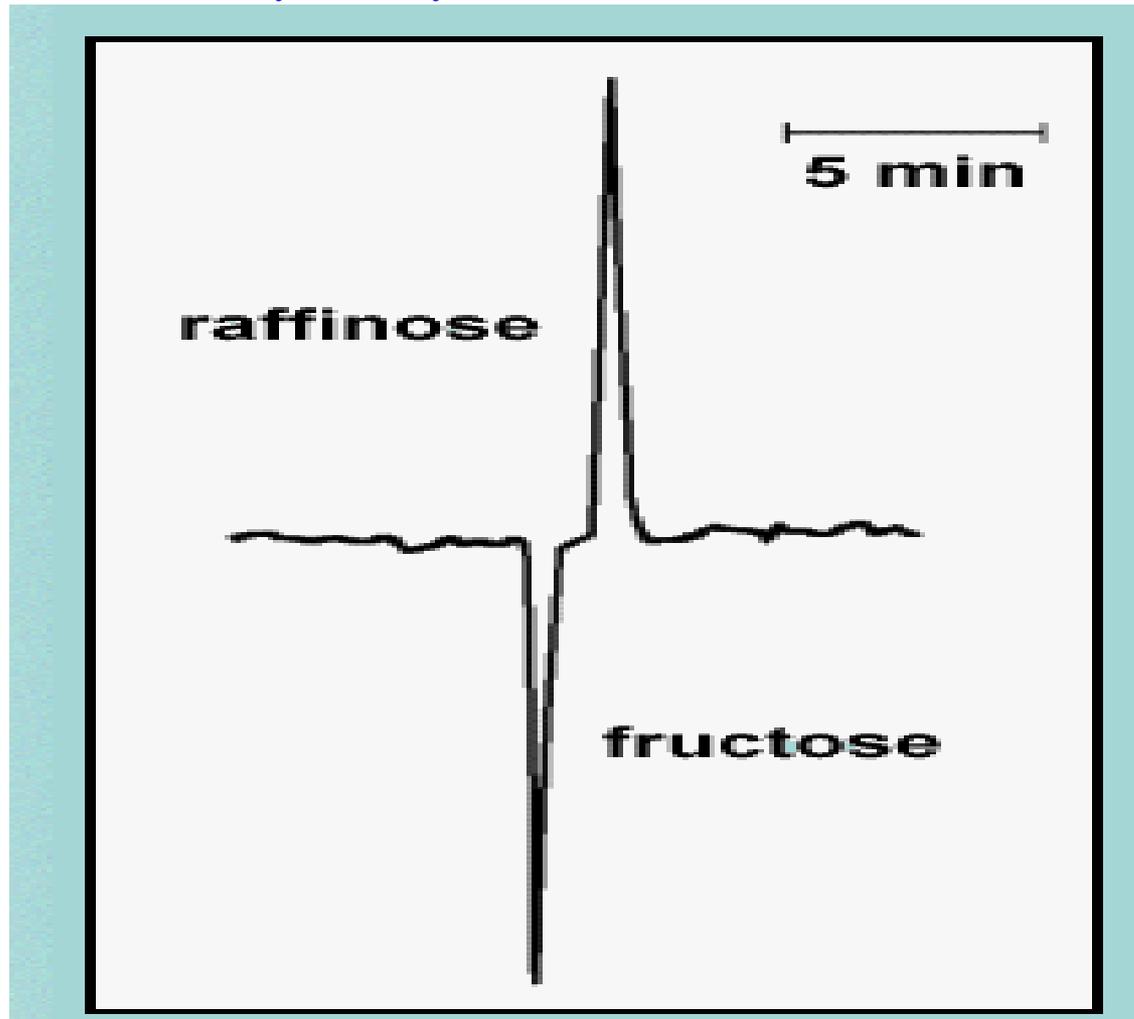
POLARIMÉTRIE

Mesure l'activité optique de substances possédant un ou des centres d'asymétrie.

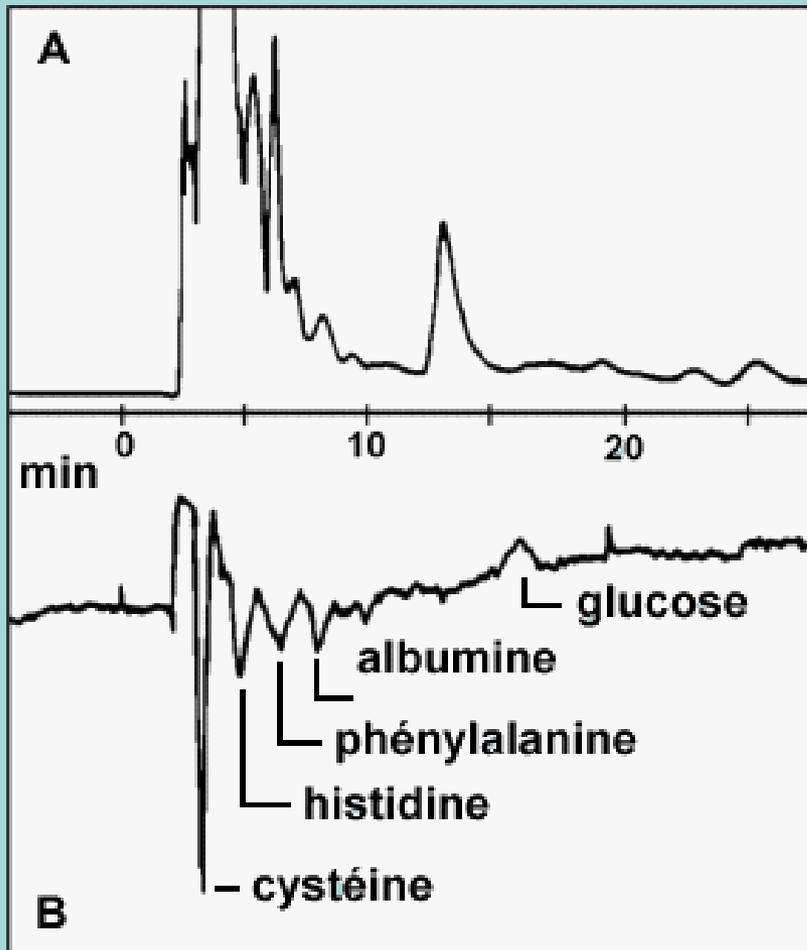
Cette activité optique est généralement associée à l'activité biologique.



Séparation du fructose et du raffinose par polarimétrie.



Séparation de composants de l'urine par polarimétrie



Séparation de composants de l'urine et détection:

A, par spectrophotomètre UV à 254 nm;

B, par polarimétrie. les substances non retenues sortent entre 0 et 2 min. Les quatre ou cinq pics qui suivent peuvent représenter des acides aminés puis qu'ils possèdent des indices de rotation négatifs. Enfin le pic à environ 16 minutes est attribué au glucose. C'est le seul pic dont la présence est due à une substance dont l'indice de rotation est positif.

Le couplage HPLC-RMN

- .L'utilisation de ce détecteur en chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été longtemps retardé par le manque de sensibilité de la RMN par rapport aux autres méthodes de détection utilisées jusque là (spectrophotométrie UV-visible et spectroscopie infra-rouge,... ou spectrométrie de masse).
- Néanmoins, depuis ces dix dernières années, la limite de détection de la RMN couplée à la HPLC est passée de l'échelle du microgramme à celle de la ***centaine de nanogrammes***.

Le couplage HPLC-RMN

- Avantage très important du couplage HPLC/RMN, par rapport aux autres méthodes de couplage, résulte du fait que **l'échantillon ne subit ni décomposition, ni altération durant l'analyse** : l'échantillon peut subir d'autres méthodes d'analyses complémentaires par la suite.

Le couplage HPLC-RMN

- La détection RMN *permet d'obtenir un ensemble d'informations structurales sur la composition d'un mélange*, sans impliquer un étalonnage préalable du système de chromatographie avec tous les composants susceptible d'être présents.
- On pourra, par exemple, sans difficulté déterminer les structures et les proportions de composés isomères nouveaux, alors que la plupart des spectrométries (masse, UV-visible, IR,...) ne permettent d'identifier que des produits déjà connus et référencés.

Le couplage HPLC-RMN

- **Applications**

- Analyse de la pureté des médicaments, Etude de suivi de métabolites dans les fluides biologiques,

- La chimie combinatoire, l'étude de la composition d'extraits de plantes, l'analyse de qualité en agroalimentaire, l'élucidation structurale de drogues modifiées...

Détecteurs en chromatographie phase liquide

Type	Limite de détection		Sensibilité	
	commercial	optimum	au débit	à la température
Absorption UV	100 pg - 1 ng	1 pg	non	faible
Fluorescence	1 - 10 pg	10 fg	non	faible
Réfractométrie	100 ng - 1 µg	10 ng	oui	$10^{-4} / ^\circ\text{C}$
Électrochimie	10 pg - 1 ng	100 fg	oui	1,5% / °C
Conductimétrie	500 pg - 1 ng	500 pg	non	2% / °C
FT-IR	1 µg	100 ng	non	faible
Polarimétrie	-	1 ng	-	oui
Spectrométrie de masse	100 pg - 1 ng	1 pg	-	-

Le couplage LC/MS ou LC/MS/MS

- Le couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse (CL/SM) est particulièrement utile pour l'analyse de composés polaires, peu volatils ou thermiquement instables.
- Il permet de déterminer *en ligne* la masse moléculaire des constituants d'un mélange et d'avoir des informations quant à leur structure (techniques SM/SM).