

Techniques chimiques pour la biologie



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE



Université Cadi Ayyad

**Faculté polydisciplinaire
Safi**



Filière science de la vie (S₃)

Module:

Techniques chimiques pour la biologie

Pr. Faissal AZIZ

faissalaziz@gmail.com / Faziz@kth.se

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance

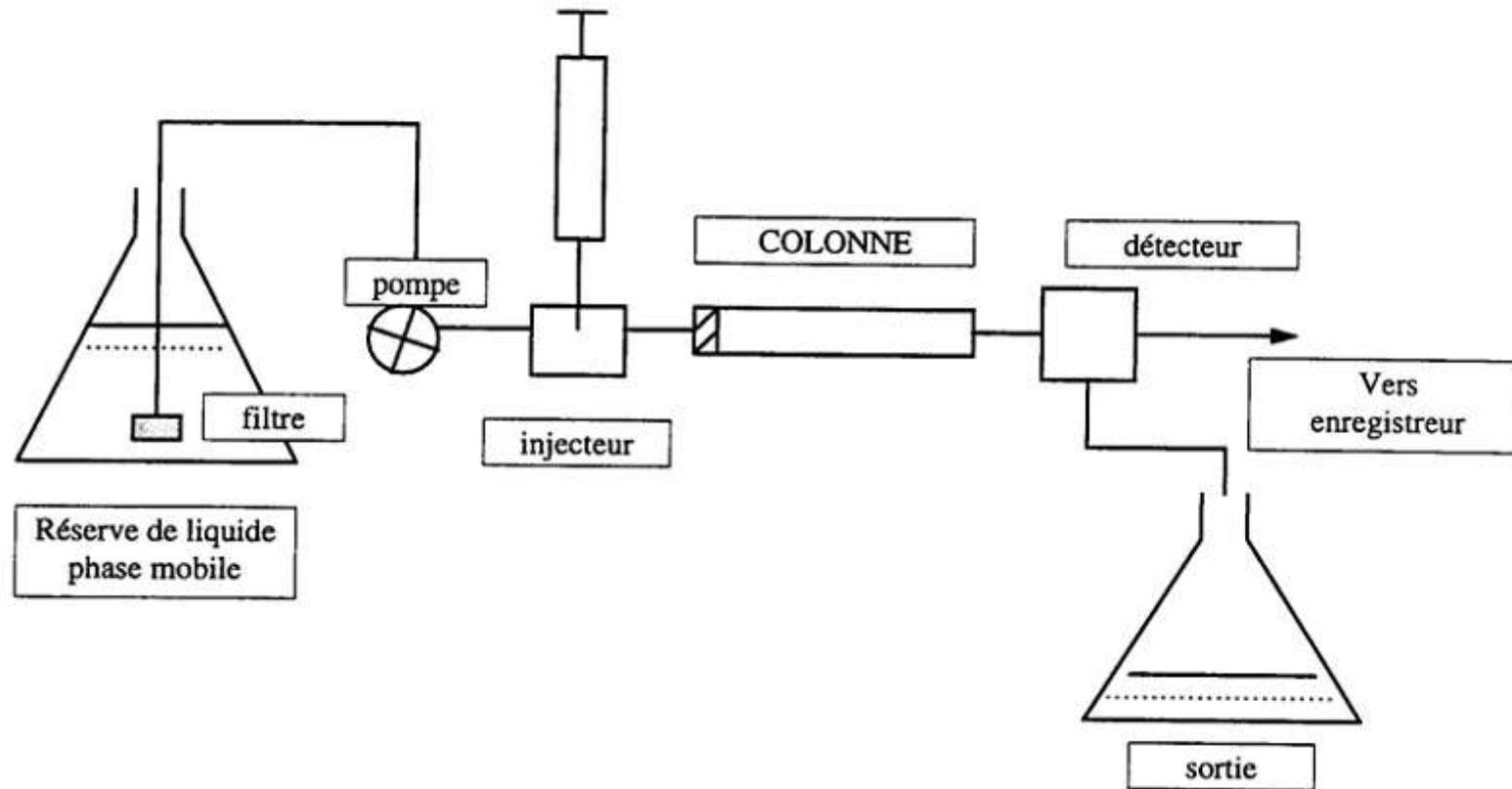
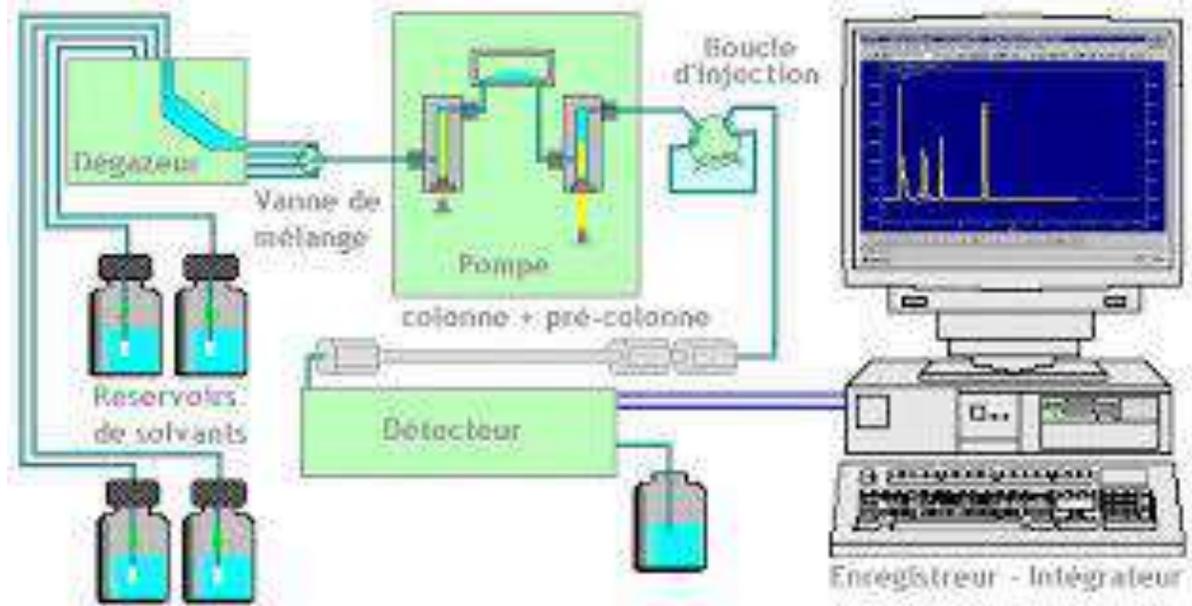


Figure 3 : principe de fonctionnement de l'HPLC



Les organes

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

b) **La pompe** : elle est muni d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.

- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

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

c) **Vanne d'injection** : c'est un injecteur à boucles d'échantillonnage.

d) 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 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

e) La phase stationnaire

- La phase normale:

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

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

- La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice **greffées par des chaînes** linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H_2O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

- La phase mobile :

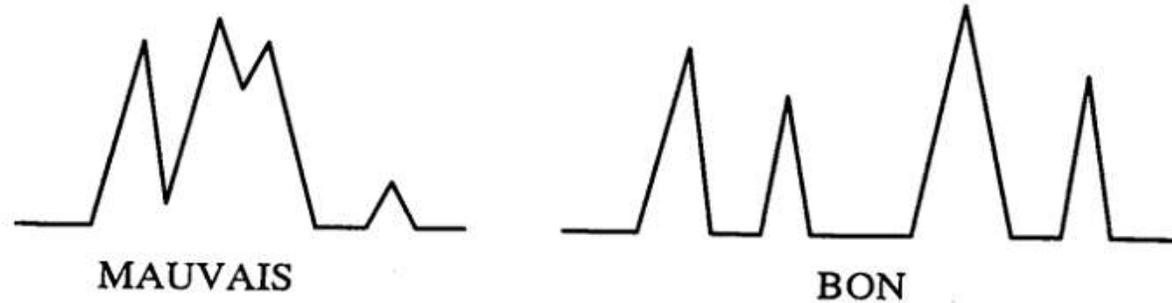
L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;
- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés.

III) Application de la chromatographie à l'analyse

1) Analyse des chromatogrammes

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.



Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible.

La composition de la phase mobile est un paramètre particulier à la HPLC. Il faut donc préciser pour chaque analyse :

- le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support...
- la nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, débit, mode de détection λ en nm.
- la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur, etc...

2) Analyse qualitative

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \rightarrow \boxed{t_{R2} > t_{R1}}$$

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = e^{((\Delta rG_{o1} - \Delta rG_{o2})/RT)}$$

si $\alpha = 1 \Rightarrow$ les pics coïncident

si $\alpha = 1.05$ la séparation est possible

colonne qui est mesurée en nombre de plateau théorique :

Nombre de molécule sortant

de la colonne en fonction du temps

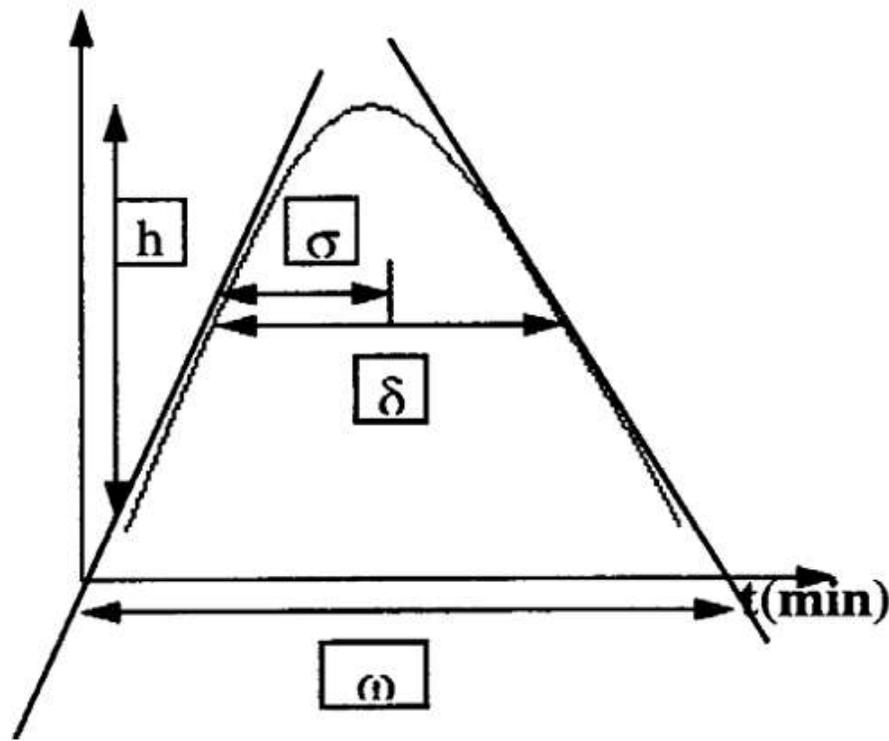
Le temps de rétention (t_R en min) est une caractéristique de chaque soluté dans les conditions opératoires fixées.

On peut comparer le t_R de deux solutés en définissant :

- le facteur de sélectivité α entre les deux solutés :

- l'efficacité d'une

colonne qui est mesurée en nombre de plateau théorique :



σ : écart type : distance entre le point d'inflexion (point où la dérivée seconde s'annule) et la moitié de la courbe.

δ : largeur du pic à mi-hauteur

ω : largeur à la base (unité de temps)

n = nombre de plateaux théoriques :
 $n = (t_R / \sigma)^2 = 5,54(t_R / \delta)^2 = 16(t_R / \omega)^2$

HEPT (hauteur équivalente de plateaux théoriques)

HEPT = L/n (L = hauteur de colonne, n nombre de plateaux théoriques)

Résolution de la colonne pour la séparation de deux solutés bien déterminés.

$$R = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_1 + \omega_2)}$$

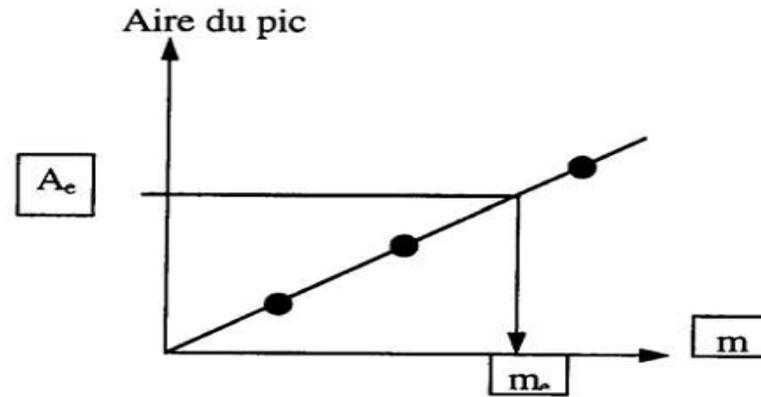
$R > 1$ bonne séparation

$R < 1$ mauvaise séparation \Rightarrow donc les paramètres appliqués à la colonne ne sont pas les bons.

3) Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

Méthode de l'étalonnage externe :



Il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante du produit afin de faire une courbe d'étalonnage $Aire = f(\text{masse ou concentration du produit})$, pour un volume injecté constant V . L'injection ultérieure du

même volume V de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la masse ou la concentration recherchée. Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire **qu'une mesure** avec l'étalon et à utiliser une règle de trois :

$$A_e / M_e = A_{et} / m_{et}$$

A: Aire des pics

e : échantillon

et : étalon

m : masse du produit remplaçable par la concentration

**Chromatographie sur
Couche Mince
(CCM)**

Principe :

La CCM appartient aux chromatographies planaires : la **Phase Solide** est déposée sur un support plan et la **Phase Mobile** se déplace par capillarité.

Réalisation-principe : dépôt à la surface de la phase stationnaire, puis la phase mobile se déplace par capillarité : le processus de migration est une suite continue **d'ADSORPTIONS** et **DESORPTIONS** élémentaires : chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front de solvant

3) Phases mobiles et phases stationnaires

i) Support + phase stationnaire (phase fixe)

⇒ **Support** inerte rigide ou souple (verre, aluminium, polyamide ...)

⇒ **+ phase stationnaire** en couche mince = solides en général agglomérés par un liant (qui permet également d'assurer l'adhérence sur le support) :

- * Gel de silice (polaire)
- * Alumine (pour les composés basiques)
- * Cellulose (pour les substances très polaires)

ii) Phase mobile

- * Peut être un mélange de solvant (polaire/non polaire : cf échelle de polarité) : les substances de faibles polarité migrent plus rapidement que les composés polaires.
- * Migre par capillarité

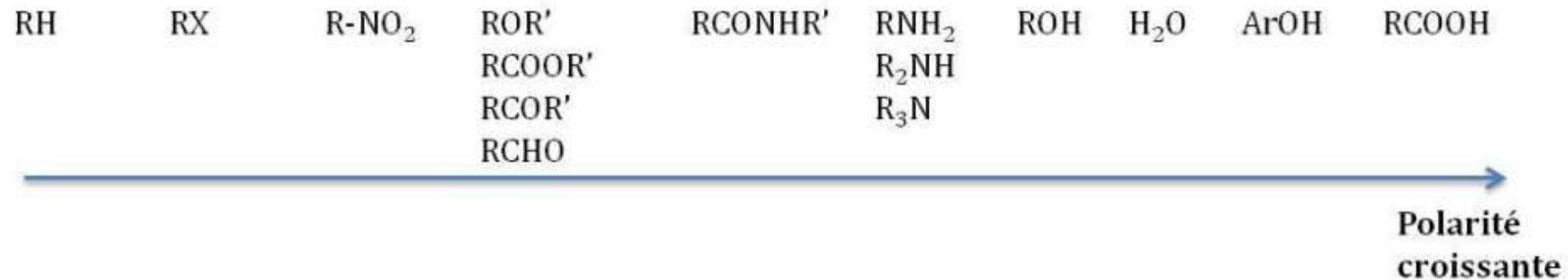
NB : en général, la phase stationnaire est plus polaire que la phase mobile.

4) Interactions entre le composé et les deux phases

Elles constituent le facteur principal de l'efficacité de séparation.

La vitesse de déplacement dépend de deux forces :

- Attraction du soluté par l'adsorbant : **forces électrostatiques** retenant le composé sur la phase stationnaire (interactions de VDW, liaisons H) : c'est la polarité qui intervient ici.



- Entraînement du soluté par l'éluant (solubilité du composé dans la phase mobile) :
 - * Par DISSOLUTION (les solutés ont tendance à se dissoudre dans l'éluant et à migrer avec lui) = **TIRE** les composés.
 - * Par DEPLACEMENT (les molécules d'éluant recherchent les mêmes sites d'adsorption que les molécules de solutés et déplacent alors ces derniers) = **POUSSE** les composés.

II. Conditions opératoires

1) Choix de l'éluant (phase mobile)

☞ Critères de choix essentiellement fondés sur la solubilité et la **POLARITE**

Composés de polarité :

- * Faible (hydrocarbures) : hexane, éther de pétrole, toluène.
- * Moyenne : mélanges de solvants miscibles !!
- * Polaires : acétate d'éthyle, acétone, méthanol (décroche les composés polaires)

⇒ **série éluotrope** (pouvoir éluant d'un liquide = capacité à entraîner des composés polaires)

Ether de pétrole

Cyclohexane

Tétrachlorométhane

Trichloroéthène

Toluène

Benzène

Dichlorométhane

Ether diéthylique

Ethanoate d'éthyle

Pyridine

Propanone

Propanol

Ethanol

Méthanol

Eau

Acide éthanoïque

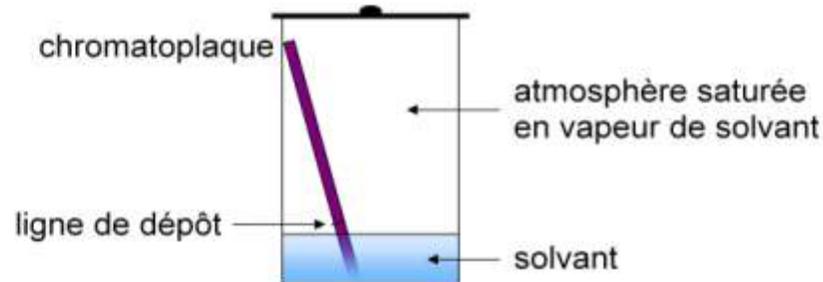


« pouvoir éluant »
croissant

2) Réalisation

- * Echantillon en solution (2 à 5% dans un solvant qui peut être différent de l'éluant)
- * Utilisation d'un capillaire de surface plane
- * Tâche circulaire et petite (< 3 mm)
- * Volume déposé faible (qq μL)

- * Dépôt à 1 cm des bords
- * Sécher avant et après la montée capillaire (après avoir indiqué le front de solvant)
- * Cuve non déplacée, verticale, fermée
- * Cuve préalablement saturée en vapeurs d'éluant (pour éviter l'évaporation du solvant par l'air, et avoir ainsi une migration reproductible)
- * Pince pour introduire et retirer la CCM.



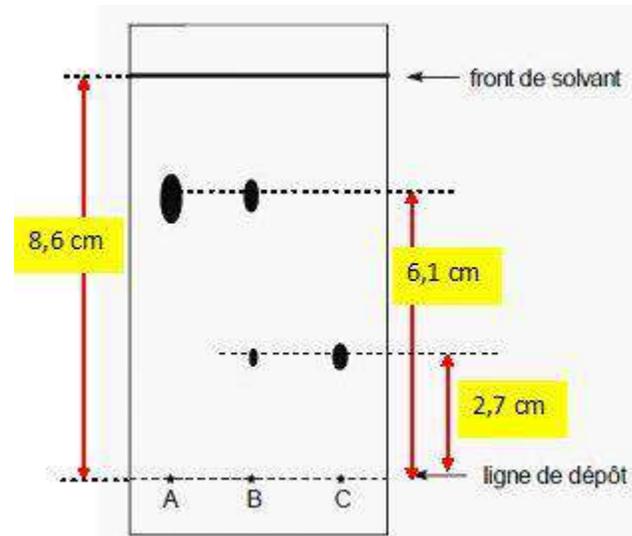
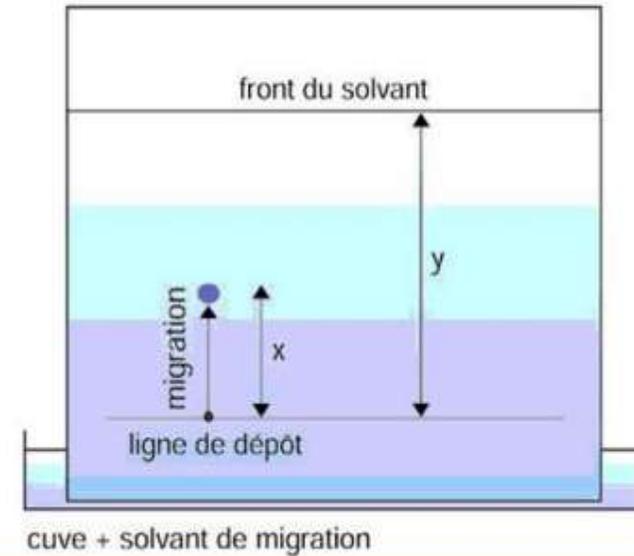
4) Interprétation : calcul de Rf (retardating factor ou rapport frontal)

Chaque soluté est caractérisé par son rapport frontal :

$$R_f = d_i/d_s$$

d_i : distance parcourue par le composé (mesurée au centre de la tache)

d_s : distance parcourue par le front du solvant



Travaux Dirigés

Exercice 1

On veut séparer 3 acides-aminés : l'acide L-glutamique, la L-leucine et la L-lysine par chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$). Les pH isoélectriques de l'acide L-glutamique, de la L-leucine et de la L-lysine sont respectivement : 3,22 ; 5,98 ; 9,74, à 25°C .

On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7.

Question :

1 - Quels acides aminés sont élués et dans quel ordre ?
(On considérera que les interactions acide aminé-résine sont uniquement d'ordre électrostatiques).

1 - Cet exercice met en jeu une chromatographie échangeuse d'ions.
Une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate (-SO₃⁻) est chargée négativement et est donc une résine échangeuse de cations.

Lorsque le pH est supérieur au **pHi (pH > pHi)**,
l'acide aminé est chargé négativement (forme anionique).

Lorsque le pH est inférieur au **pHi (pH < pHi)**,
l'acide aminé est chargé positivement (forme cationique).

Le tableau ci-dessous donne les charges des 3 acides aminés, à pH = 2 et à pH = 7.

<u>acide aminé :</u>	<u>pHi :</u>	<u>charge à pH = 2 :</u>	<u>charge à pH = 7 :</u>
Acide L-Glutamique (Glu)	3,22	+	-
L-Leucine (Leu)	5,98	+	-
L-Lysine (Lys)	9,74	+	+

Ainsi, à pH = 2, les trois acides aminés sont chargés positivement, et seront retenus lors du passage sur la colonne.

A pH = 7, seuls Glu et Leu, chargés négativement, seront élués. Lys reste fixé à la colonne. Glu est élué en premier (pHi = 3,22) puis Leu l'est ensuite (pHi = 5,98).

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

