

TD N 6 : Techniques chromatographique et Techniques électrophorétiques

La chromatographie est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange. Le principe est basé sur les différences d'affinité des composés du mélange avec la phase stationnaire et la phase mobile. Le chromatogramme traduit la variation du soluté dans l'éluant en fonction du temps. Le terme de chromatographie recouvre donc plusieurs technologies basées sur un principe commun: l'identification par la séparation.

Il existe différents types de chromatographie suivant la méthode de séparation utilisée:

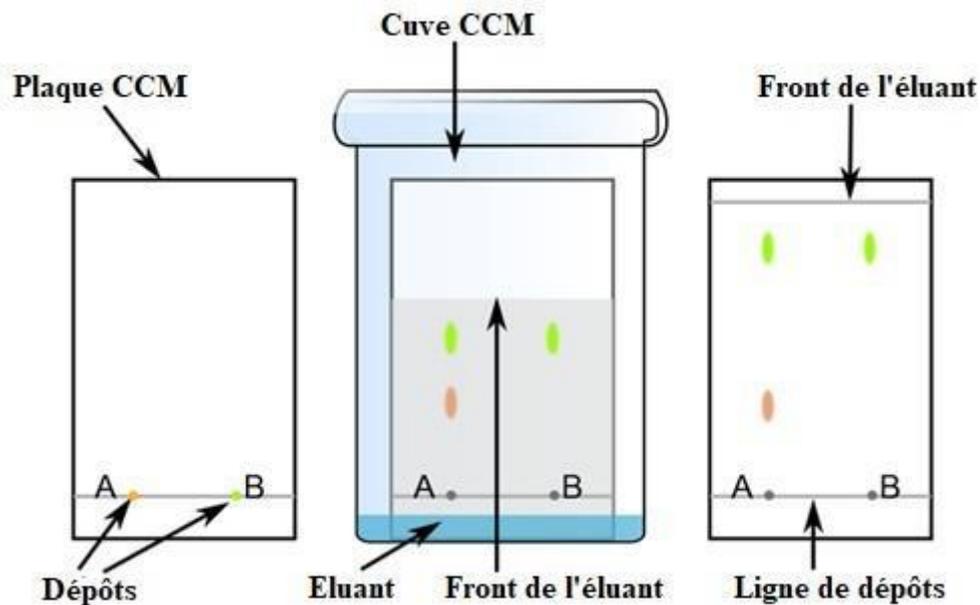
- la chromatographie en couche mince (CCM).
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est la plus simple des méthodes chromatographiques. Elle consiste à placer sur une feuille (papier, silice ou autre....) une tache et de la laisser éluer en la trempant dans un solvant ou un mélange de solvant (appelé **éluant**), l'éluant diffuse le long du support. La tache migre sur la feuille plus ou moins vite selon la nature des interactions qu'elle subit de la part du support et de l'éluant.

Après migration les taches doivent être révélées ; c'est la détection qui peut se faire soit:

- Pulvérisation d'un réactif caractéristique
- Par immersion dans un bain de permanganate de potassium
- Par pulvérisation de vapeur de diiode
- Par observation à la lumière Ultra-Violet (UV) si la plaque de silice comporte un indicateur de fluorescence.



2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

C'est une méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est une chromatographie de partage dans laquelle la phase mobile est un gaz. Elle constitue la méthode la plus puissante et la plus fine pour séparer, identifier et quantifier les corps gazeux ou volatilisables.

L'appareil utilisé pour réaliser une analyse par chromatographie en phase vapeur est appelé chromatographe. Un appareil de chromatographie en phase gazeuse comporte trois parties: un injecteur, une colonne et un détecteur, comme indiqué sur le schéma ci-dessous:

- Injecteur: Il permet d'introduire un liquide qui doit être vaporisé instantanément avant d'être transféré dans la colonne.
- Colonne: C'est l'organe principal. Elle est constituée d'un tube généralement métallique de diamètre intérieur de l'ordre du millimètre.
- Détecteur: Il permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne. La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes. Le détecteur le plus utilisé en CPG est celui à conductibilité thermique appelé catharomètre.

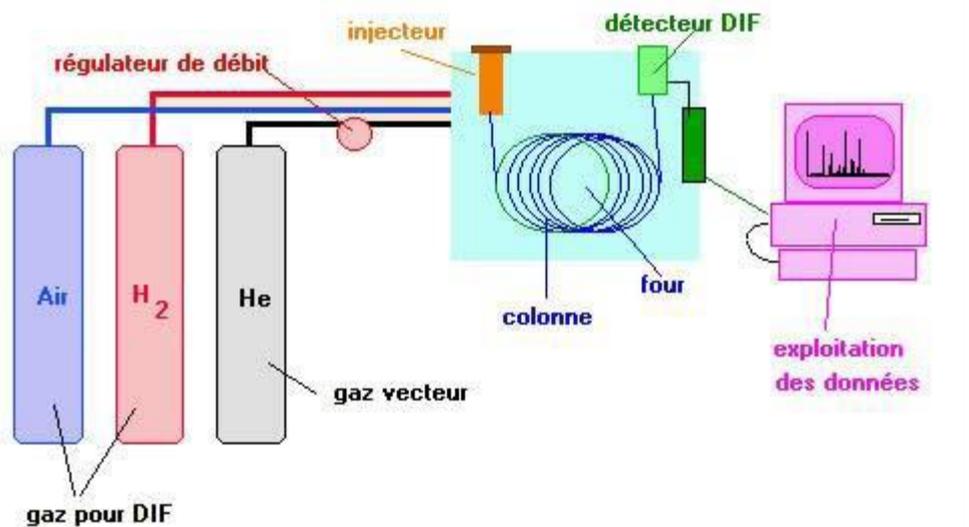


Schéma simplifié du chromatographe en phase gazeuse

3. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

C'est une technique de séparation analytique de molécules présentes dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces. La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

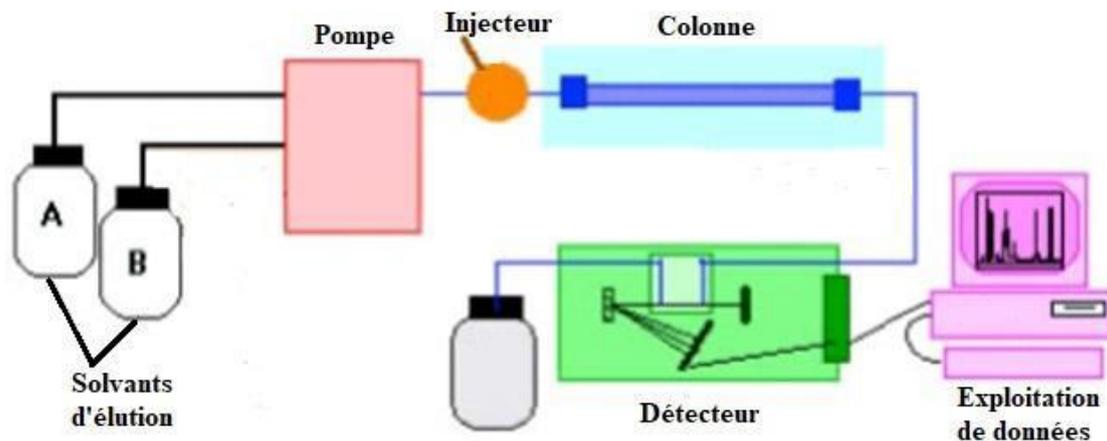
Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC).

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Le signal du détecteur est amplifié et enregistré, la température du four est maintenue constante.



II. Techniques électrophorétiques

L'électrophorèse est utilisée pour vérifier la pureté d'une fraction chromatographique et pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine inconnue à l'aide des protéines standards.

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

1. Types d'électrophorèse

L'électrophorèse peut être en des conditions non dénaturantes ou en des conditions dénaturantes.

1.1. Electrophorèse en des conditions non dénaturantes

Les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. La vitesse de migration dépend de la charge native de la molécule et de sa structure tridimensionnelle.

1.2. Electrophorèse en des conditions dénaturantes

Les molécules sont soumises à un traitement dénaturant avant la séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. La séparation est donc en fonction de la masse moléculaire. Les agents de dénaturation sont le SDS

(Sodium Dodécyl Sulfate) et le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures des protéines. Le SDS est un dénaturant doux et un surfactant, il agit sur les protéines de plusieurs façons:

- Si la protéine est oligomérique, ses sous unités sont séparées les unes des autres.
- Il se fixe sur les protéines, les tapissant de charge négative. Les protéines transformées en manopolyanions, possèdent toutes la même mobilité électrophorétique. La charge négative globale permet la migration vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement en fonction de leur masse moléculaire. Selon le support électrophorétique, il existe deux types d'électrophorèse:

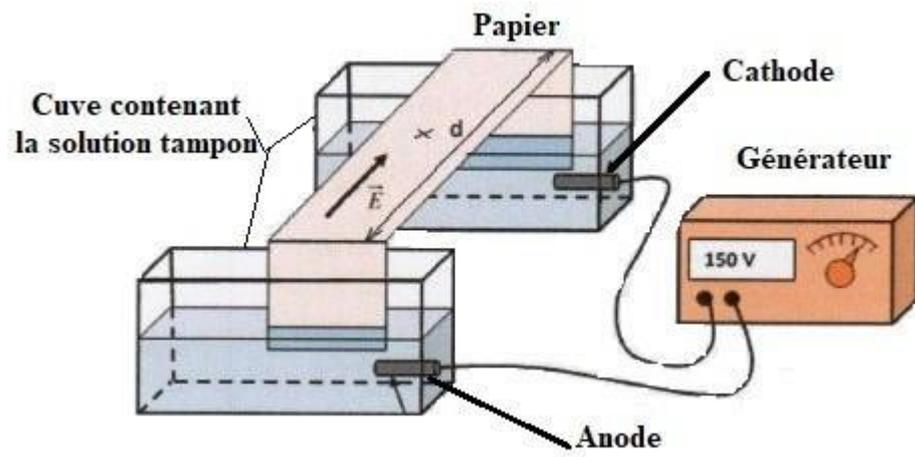
2. Electrophorèse en veine liquide (électrophorèse libre)

Il s'agit de la première méthode électrophorétique décrite. La solution échantillon est placée dans un tube en U et recouverte d'une solution tampon de densité plus faible que celle de l'échantillon pour éviter les courants de convection. Les électrodes sont placées dans le tube où l'on applique le champ électrique. La migration dans ce cas s'effectue au sein d'un liquide constitué par une solution tampon de pH et de concentration convenable dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce type de d'électrophorèse présente de multiples inconvénients (Appareillage coûteux, mise en oeuvre longue et délicate, séparation incomplète des particules).

3. Electrophorèse de zone sur support

Les mobilités obtenues en ce type d'électrophorèse sont plus faibles que celles de l'électrophorèse en veine liquide. Ce type utilise un support poreux stabilisant la phase liquide. Le mélange à séparer est déposé sur un support convenable, homogène, poreux, inerte et imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide (PAGE), etc. Les différents types d'électrophorèse de zone sont souvent nommés en fonction du type de support (papier, ester de cellulose, gel, etc.).

Electrophorèse sur papier, sur acétate de cellulose, sur gel (amidon, agar, agarose, polyacrylamide). Les fractions séparées par électrophorèse de zone migrent comme des zones individuelles. La taille des pores pour le support en gel peut influencer la vitesse de migration (ralentissement du déplacement des grosses molécules).



Appareillage d'électrophorèse.