

La Chromatographie d'Exclusion Diffusion

Pr Serigne Omar SARR

Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie,
Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie

Bâtiment de pharmacie, 1^{ier} étage

Tel: 338241381, Email: chimiedakar@gmail.com

OBJECTIFS

1. Enoncer le principe de la chromatographie d'exclusion-diffusion
2. Etablir l'expression de 2 grandeurs fondamentales en chromatographie d'exclusion-diffusion
3. Décrire 2 types de gel utilisés en chromatographie d'exclusion-diffusion
4. Décrire 3 caractères des gels utilisés en chromatographie d'exclusion-diffusion
5. Citer 3 applications de la chromatographie d'exclusion-diffusion

PLAN

INTRODUCTION

1. Principe
2. Aspects théoriques
3. Aspects pratiques
4. Applications

CONCLUSION

INTRODUCTION

- Encore appelée chromatographie sur gel ou d'exclusion stérique, la CED est une méthode de séparation de molécules de taille et de formes différentes en solution.
- Connue depuis longtemps, cette technique de séparation s'est développée à partir de 1959 grâce aux travaux de Porath et Flodin sur la nature des phases stationnaires (gel).

INTRODUCTION

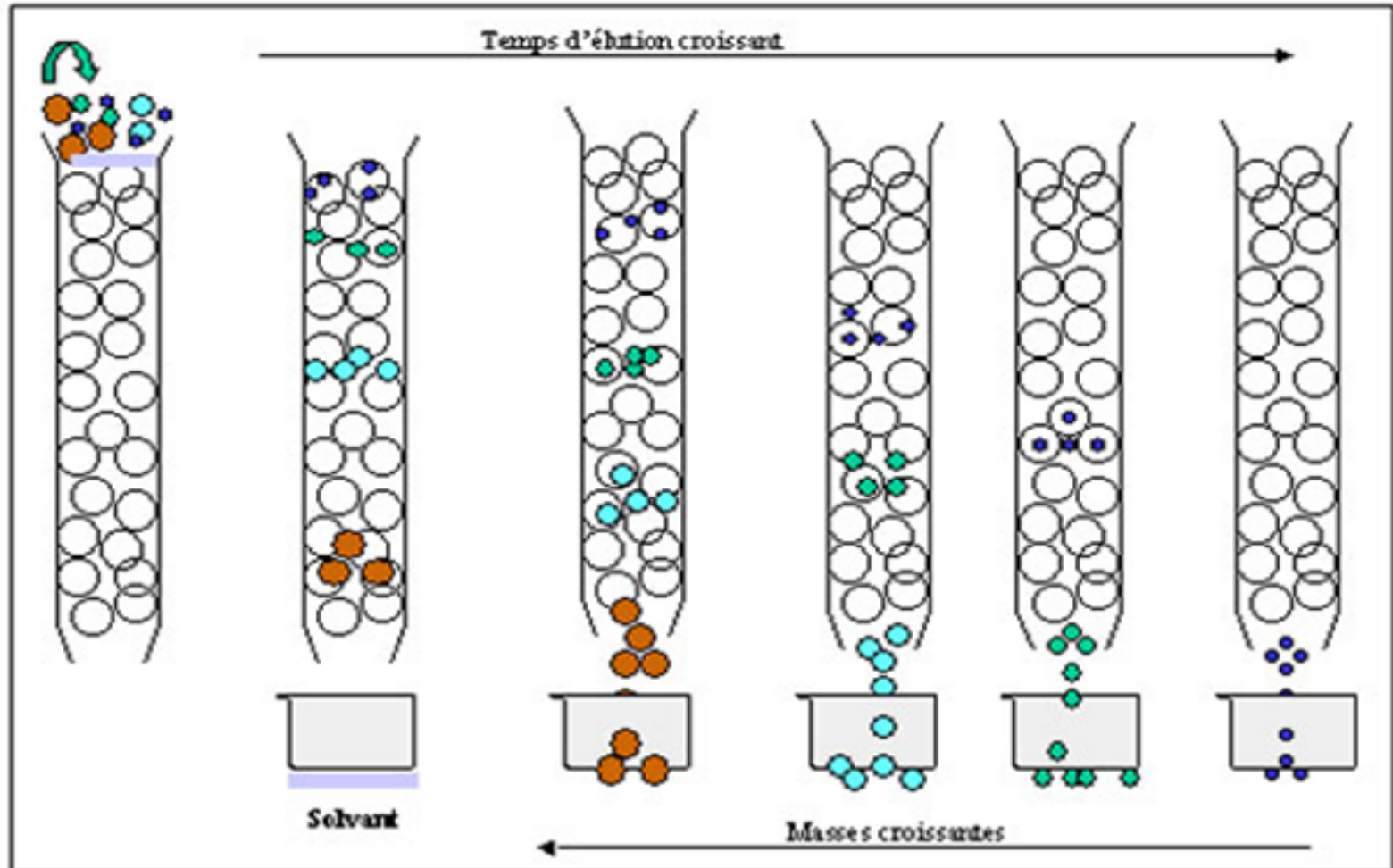
- L'intérêt de cette technique est lié à ses nombreuses applications dans divers domaines.
- D'abord réservée à la séparation des protéines et polypeptides en biochimie, elle est devenue, avec le développement (de la nature) des phases stationnaires une méthode d'analyse générale permettant non seulement la séparation mais également la purification et l'analyse de mélanges complexes.
- Il s'agit d'une technique inscrite dans de nombreuses pharmacopées dont la pharmacopée européenne.

1. Principe

- C'est la séparation des constituants d'un mélange liquide exploitant leur différence de distribution selon leur taille et leur forme entre deux phases :
- ✓ Une phase stationnaire (gel) poreuse dans laquelle diffusent des substances de taille $<$ diamètre des pores tandis que celles de taille $>$ diamètre des pores en sont exclues
- ✓ Une phase mobile qui élue les substances non-retenues (exclues) et celles retenues, dans l'ordre décroissant des poids moléculaires (taille).

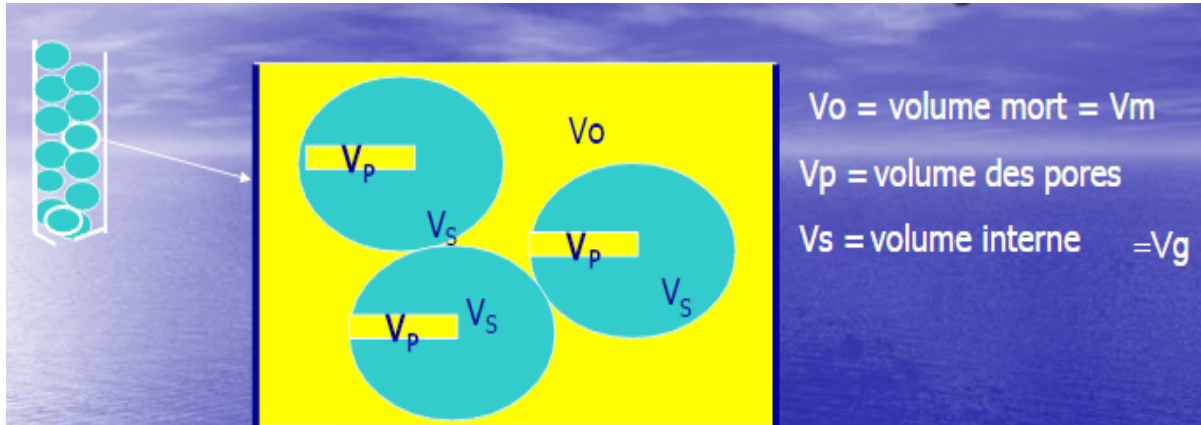
2. Aspects théoriques

2.1 Illustration d'une séparation



2. Aspects théoriques

2.1 Illustration d'une séparation



Aspect d'un gel sur colonne

2. Aspects théoriques

2.2 Grandeurs fondamentales

➤ Coefficient de diffusion K_d

$$K_d = \frac{C_S}{C_M}$$

- C_S = [soluté] dans la phase intra-granulaire (P.S)
- C_M = [soluté] dans le liquide extra-granulaire (P.M)
- Si $K_d=1$, diffusion parfaite
- Si $K_d=0$, exclusion totale
- Si $K_d>1$, + autre phénomène

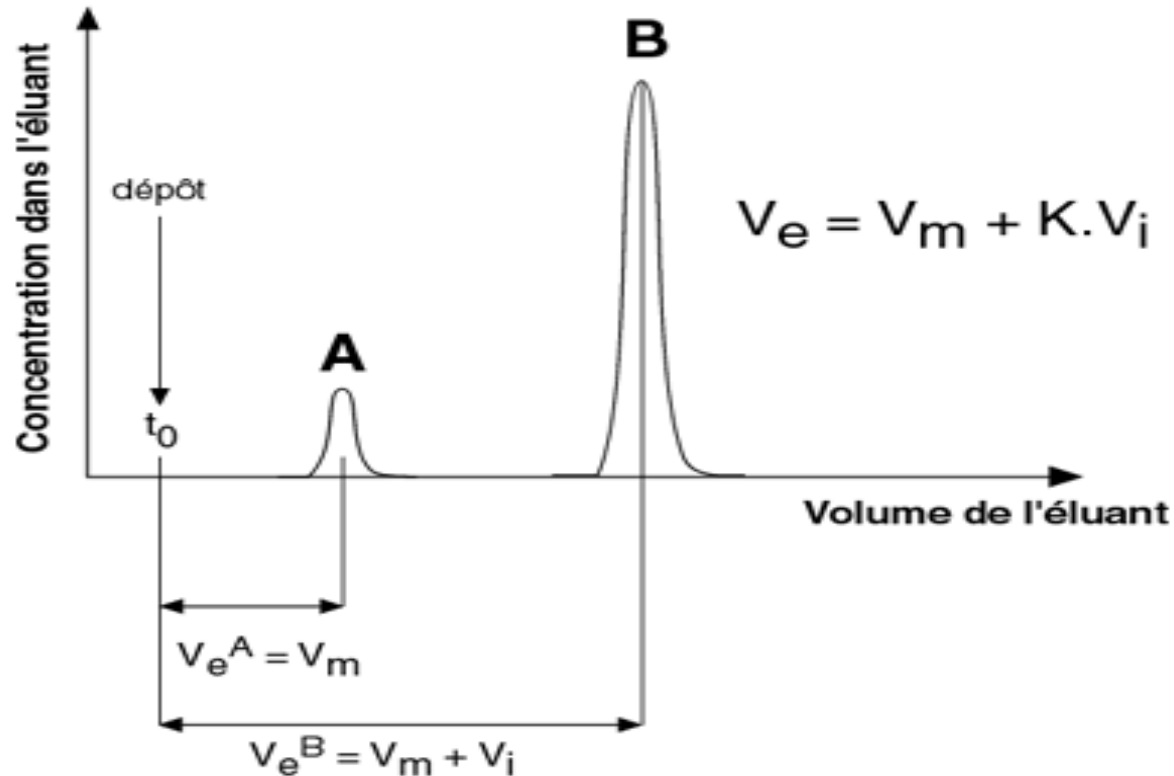
2. Aspects théoriques

2.2 Grandeurs fondamentales

➤ Volume de rétention ou d'éluion (V_E)

- $V_E = V_M + K_d \cdot f \cdot V_p$
- f = fraction du volume poreux (V_p) accessible au soluté
- $0 < f < 1$
- $f = 0$, exclusion totale
- $f = 1$, tous les pores de la PS sont accessibles au soluté

2. Aspects théoriques



Courbes d'éluion des composés A et B

2. Aspects théoriques

2.2 Grandeurs fondamentales

➤ Facteur de rétention K'_B (capacité)

$$K'_B = Kd \frac{V_P}{V_M}$$

➤ Facteur de sélectivité ou de rétention relative (α)

$$\alpha = \frac{K'_B}{K'_A}$$

2. Aspects théoriques

2.2 Grandeurs fondamentales

➤ Efficacité ou nombre de plateaux théoriques N

$$N = 16 \left(\frac{T_r^2}{\omega^2} \right)$$

- T_r =temps de rétention
- ω =largeur à la base du pic

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

- L=longueur de la colonne
- H=hauteur d'un plateau théorique

2. Aspects théoriques

2.2 Grandeurs fondamentales

➤ Résolution R_S

$$R_S = \frac{\sqrt{N_B}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{K'_B}{1 + K'_B}$$

- N_B = Nombre de plateaux théoriques (soluté B)
- α = sélectivité
- K'_B = facteur de rétention

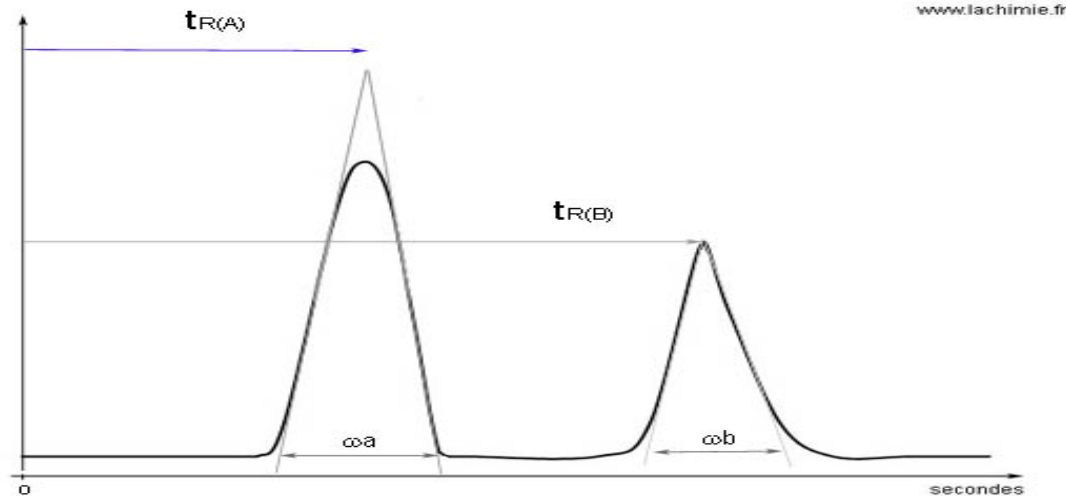
2. Aspects théoriques

2.2 Grandeurs fondamentales

➤ Résolution R_S



$$R_S = 2 \frac{Tr_B - Tr_A}{\omega_B + \omega_A}$$

- Tr = temps de rétention
- ω = largeur à la base du pic



3. Aspects pratiques

3.1 Phase mobile

- Dissoudre échantillon ≠ gel
- Gonfler le gel
- Compatible avec détecteur
- H₂O  filtration sur gel
- Solvant organique  perméation de gel

3. Aspects pratiques

3.2 Phase fixe ou gels

➤ Caractères des gels

- Diamètre des pores

- ✓ Défini/ Degré réticulation

exple : SEPHADEX G10 , SEPHADEX G200

3. Aspects pratiques

3.2 Phase fixe ou gels

➤ Caractères des gels

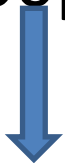
- Taille et forme des particules

- ✓ Equilibres rapides

- ✓ Perles sphériques

- ✓ 40-120 μm \longrightarrow SEPHADEX

- ✓ 60-300 μm \longrightarrow AGAROSE



Chromatographie classique

- ✓ 10-80 μm \longrightarrow Chromatographie liquide haute performance

3. Aspects pratiques

3.2 Phase fixe ou gels

➤ Caractères des gels

- Inertie

- ✓ pH : 2-8

- ✓ Gels organo-résistants

Exple: SEPHADEX LH-20

- Affinité pour le substrat

- ✓ Réduite

3. Aspects pratiques

3.2 Phase fixe ou gels

➤ Caractères des gels

- Consistance

✓ Nature et réticulation  Xérogels


Aérogels

3. Aspects pratiques

3.2 Phase fixe ou gels

➤ Xerogels

■ Gels mous

- H_2O
- pression < 2 bars et faible débit
- K' tend vers 3

3. Aspects pratiques

3.2 Phase fixe ou gels

➤ Xerogels

■ Gels semi-rigides

- Réticulation (pontage) élevée
- Gonflement + faibles
- Pression et débit élevés
- K' : 0,8-1,2
- Nature aromatique hydrophobe → perméation de gel

Exple : Gel de DEXTRAN (SEPHADEX[®])

Gel de polyacrylamide, Gel d'agarose

3. Aspects pratiques

3.2 Phase fixe ou gels

➤ Aérogels

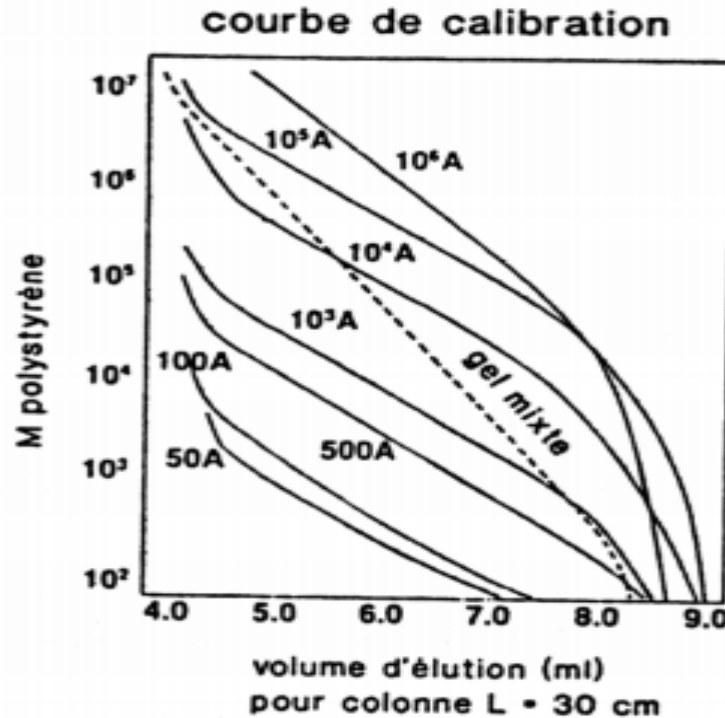
- Rigides (verres poreux et silice poreuse désactivée)
- PM : $3 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^7$ Da
- Résolutions meilleures



CLHP

3. Aspects pratiques

Choix d'une phase stationnaire



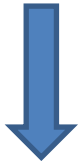
Séparation de substances sur différentes phases stationnaires

3. Aspects pratiques

3.3 Procédés analytiques

➤ Chromatographie sur couche mince

- Analytique
- Préparative



dépôt-développement-révélation

3. Aspects pratiques

3.3 Procédés analytiques

➤ Chromatographie sur colonne

- Classique ($L/\varnothing = 10/1$)
- CLHP ($\varnothing \sim 8\text{mm}$)



Injection-élution-détection

3. Aspects pratiques

3.3 Procédés analytiques

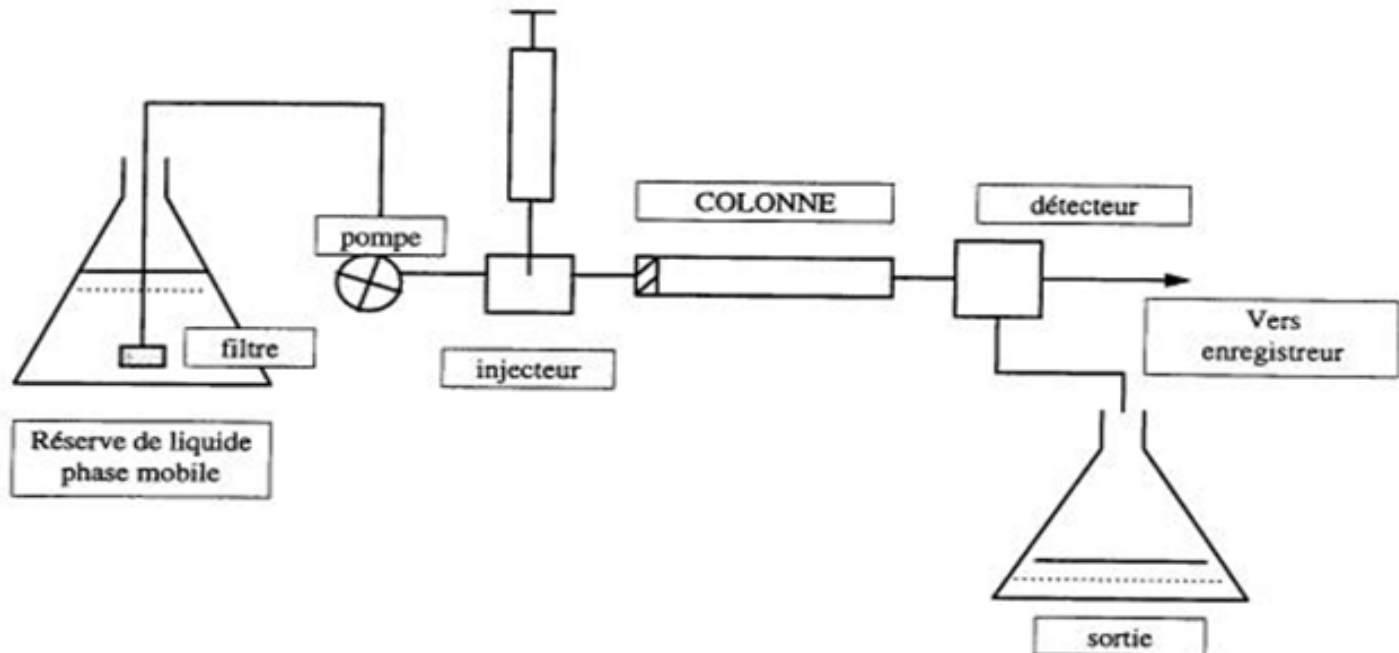


Schéma de principe d'un chromatographe liquide haute performance

3. Aspects pratiques

3.3 Procédés analytiques

➤ Détecteurs

- Réfractomètre différentiel+
 - ✓ Peu sensible : 100ng
 - ✓ Etalonnage

- Détecteur viscosimétrique
 - ✓ Etalonnage

- Détecteur évaporatif à Diffusion de lumière
 - ✓ Sensibilité: 500ng
 - ✓ Etalonnage

4. Applications

- Séparation de petites molécules et de macromolécules
- Déssalage d'une solution de macrolides / gel très réticulé
- Séparation de l'iode non fixe dans la purification d'un traceur après marquage d'une protéine/ ^{131}I

4. Applications

- Séparation des lymphocytes des monocytes/gel Dextran
- Purification des IgM du plasma en vue d'un diagnostic de rubéole
- Purification de facteur VIII antihémophilique

4. Applications

- Détermination de masses moléculaires
 - Etalonnage
 - Cytochrome C : 12600
 - Myoglobine : 17500
 - Ovalbumine : 45000
 - Albumine : 68000
 - γ -globulines : 160000

CONCLUSION

- Le domaine privilégié de la CED est celui de la séparation de polymères ou de macromolécules de masses moléculaires élevées.
- Cependant, le développement croissant de nouveaux types de phases stationnaires et de détecteurs sensibles (viscosimétrie, refractométrie, DEDL,...) lui ouvrent de nouvelles perspectives analytiques, notamment dans le contrôle de qualité des médicaments biosimilaires.