

UE5 Sciences Analytiques

UE5B Techniques séparatives

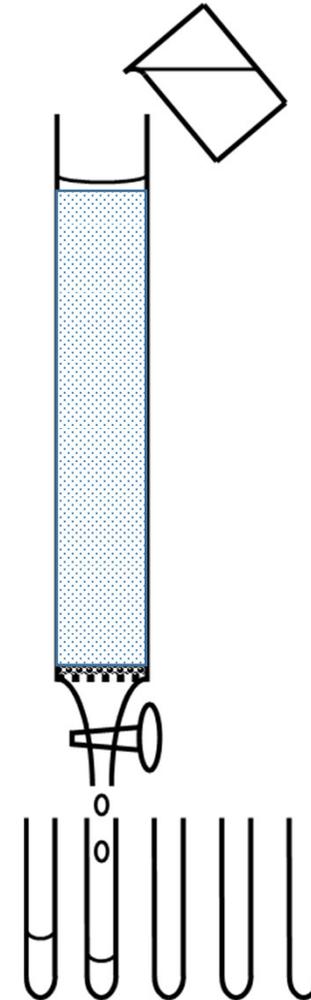
- Techniques chromatographiques
- Techniques d'électrophorèse
- Analyse Quantitative par les techniques séparatives

Pierre Chaminade
Lip(Sys)² Chimie Analytique Pharmaceutique
Université Paris-Saclay

1-Techniques chromatographiques

Place de la chromatographie dans les méthodes séparatives

- Technique séparative fondée sur
 - une interaction soluté-phase stationnaire
 - (ce qui la distingue des techniques électrophorétiques)
 - une élution par une phase mobile
 - Simple transport quand la phase est gazeuse (Chromatographie en phase gazeuse)
 - Transport et interactions soluté-phase mobile quand la phase est liquide.
 - Chromatographie en phase liquide

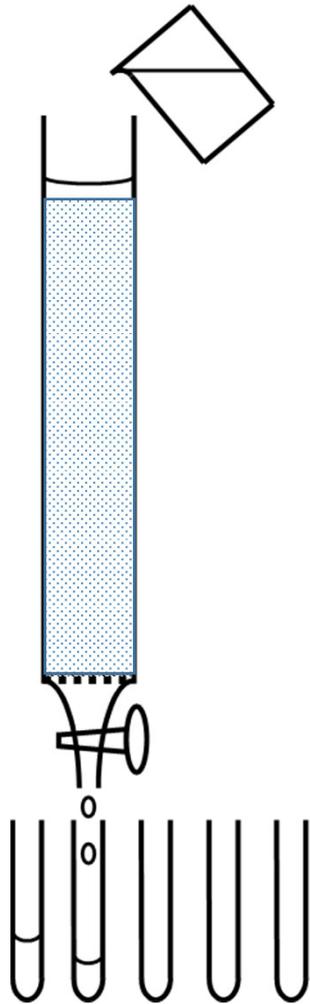


Le processus chromatographique

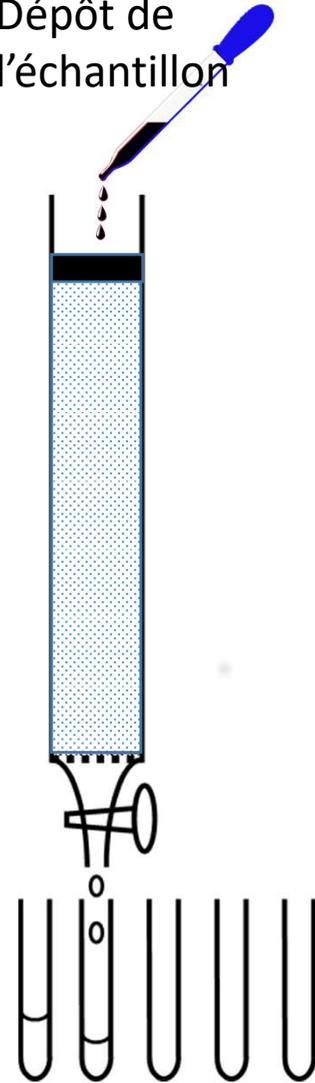
2022/2023

UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie

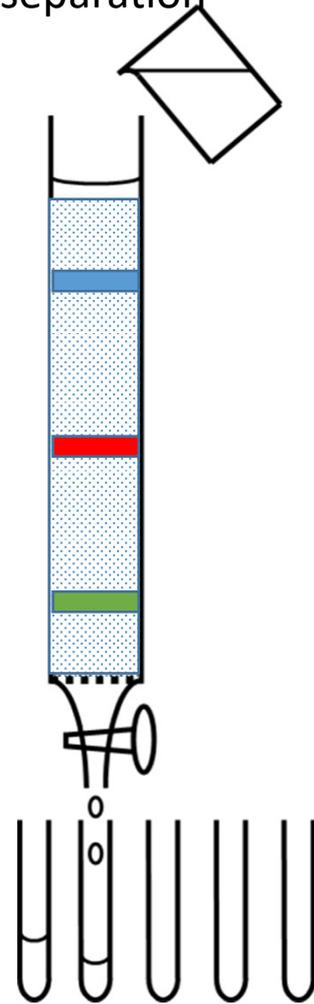
Conditionnement



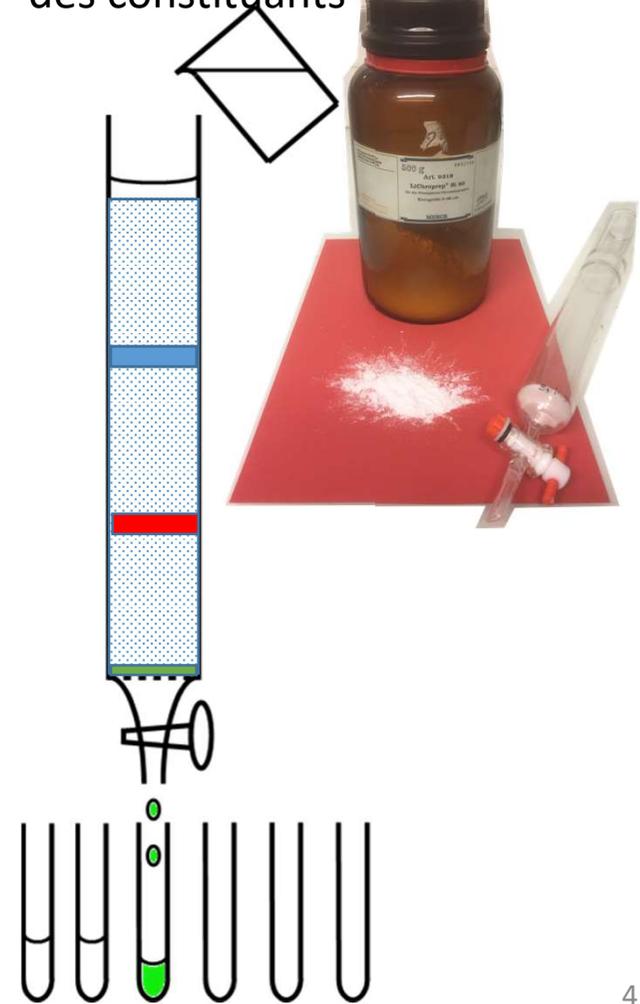
Dépôt de l'échantillon



Migration et séparation

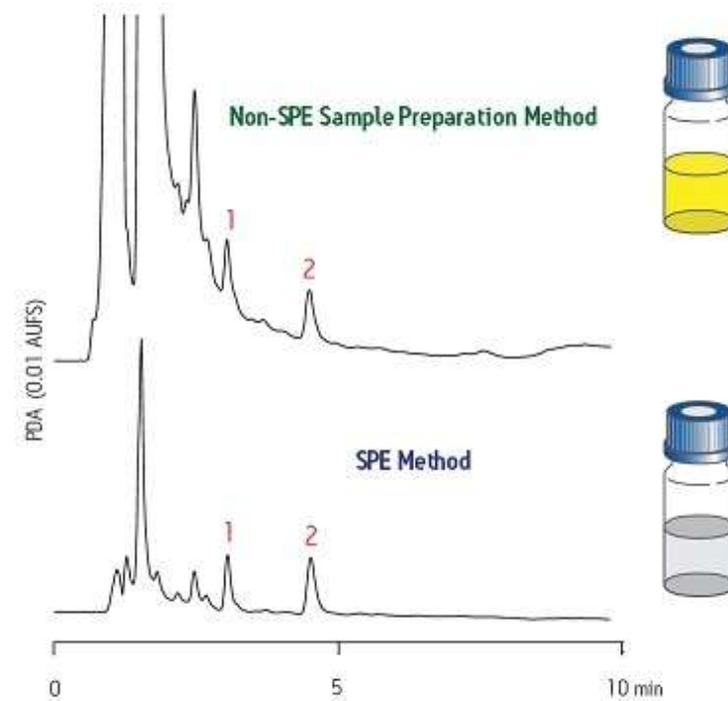
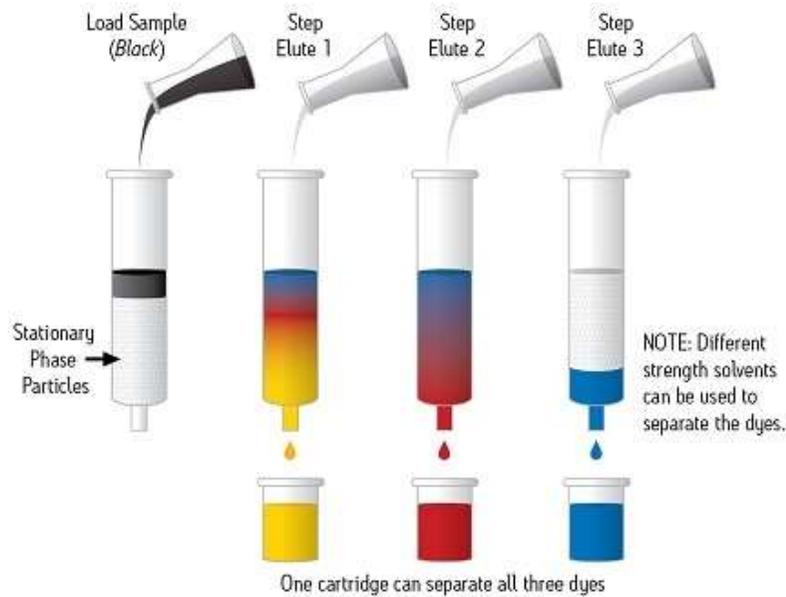


Elution/collecte des constituants



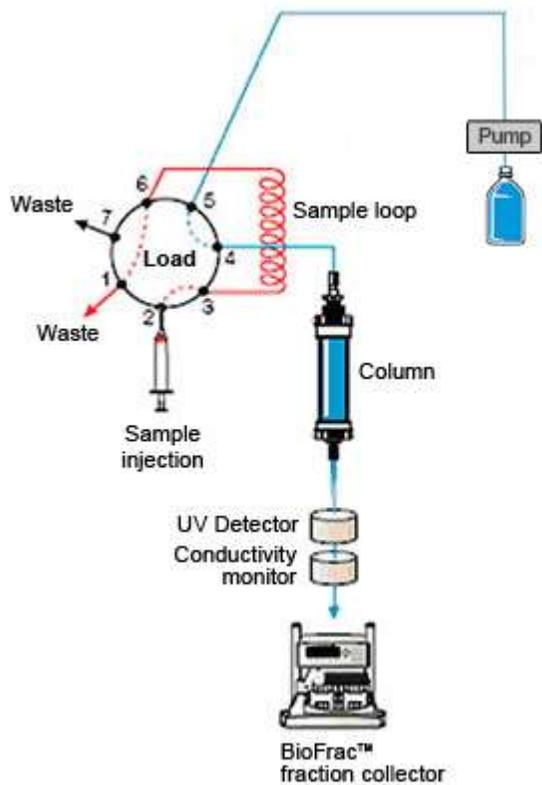
1.1 Quelques déclinaisons de la chromatographie

Extraction sur phase solide (SPE)

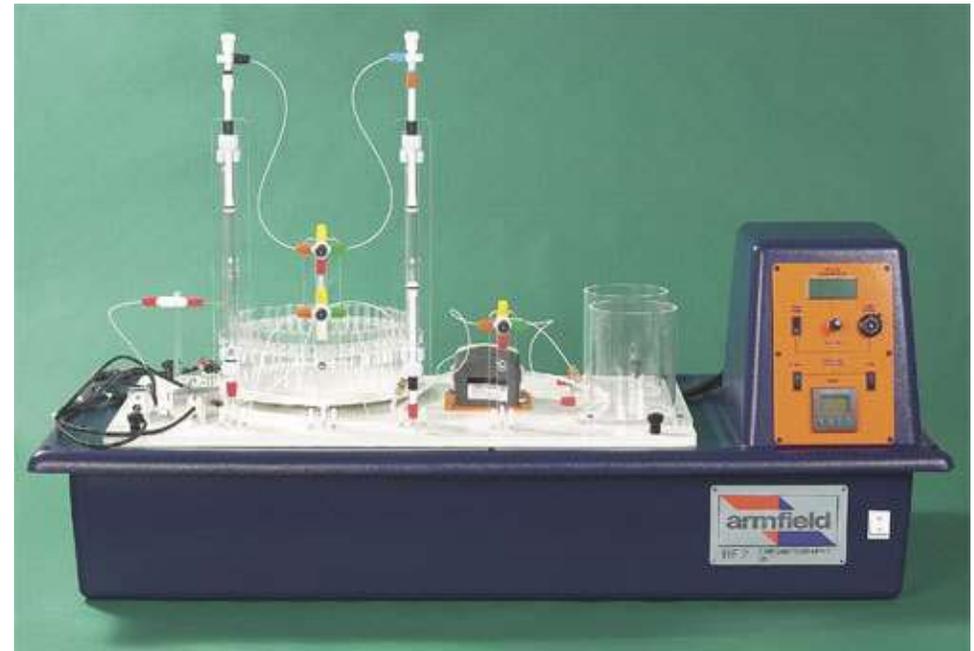


Utilisée en technique de préparation d'échantillon ou de fractionnement simple.

Chromatographie dite Basse Pression

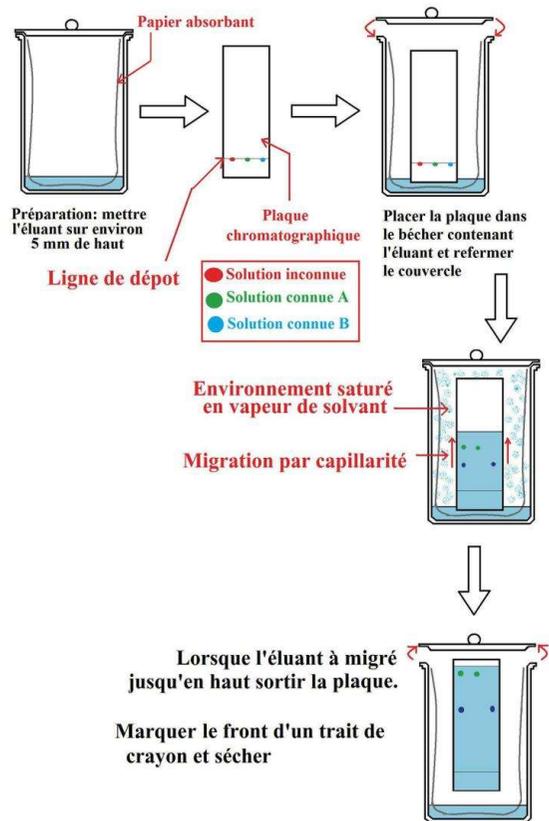


<http://www.bio-rad.com/fr-fr/applications-technologies/introduction-low-pressure-chromatography>



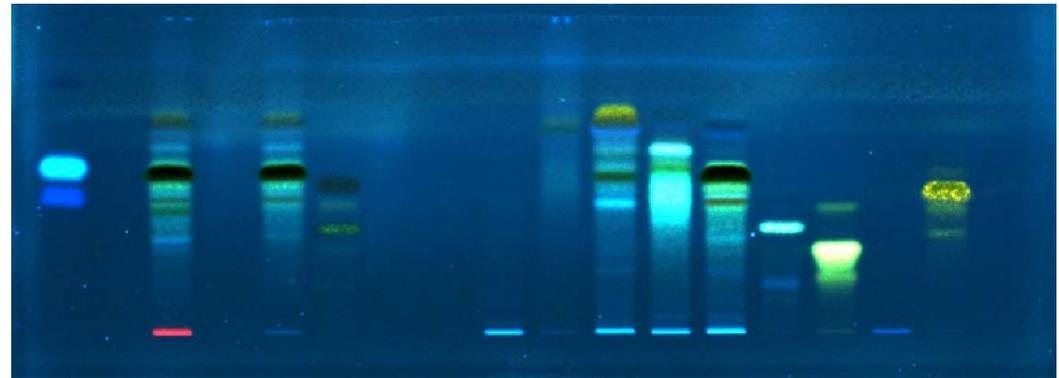
Purification de protéines suivant différents mécanismes

Chromatographie sur couche mince ou planaire ou CCM ou TLC



CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Illustration: Frédéric Magniez



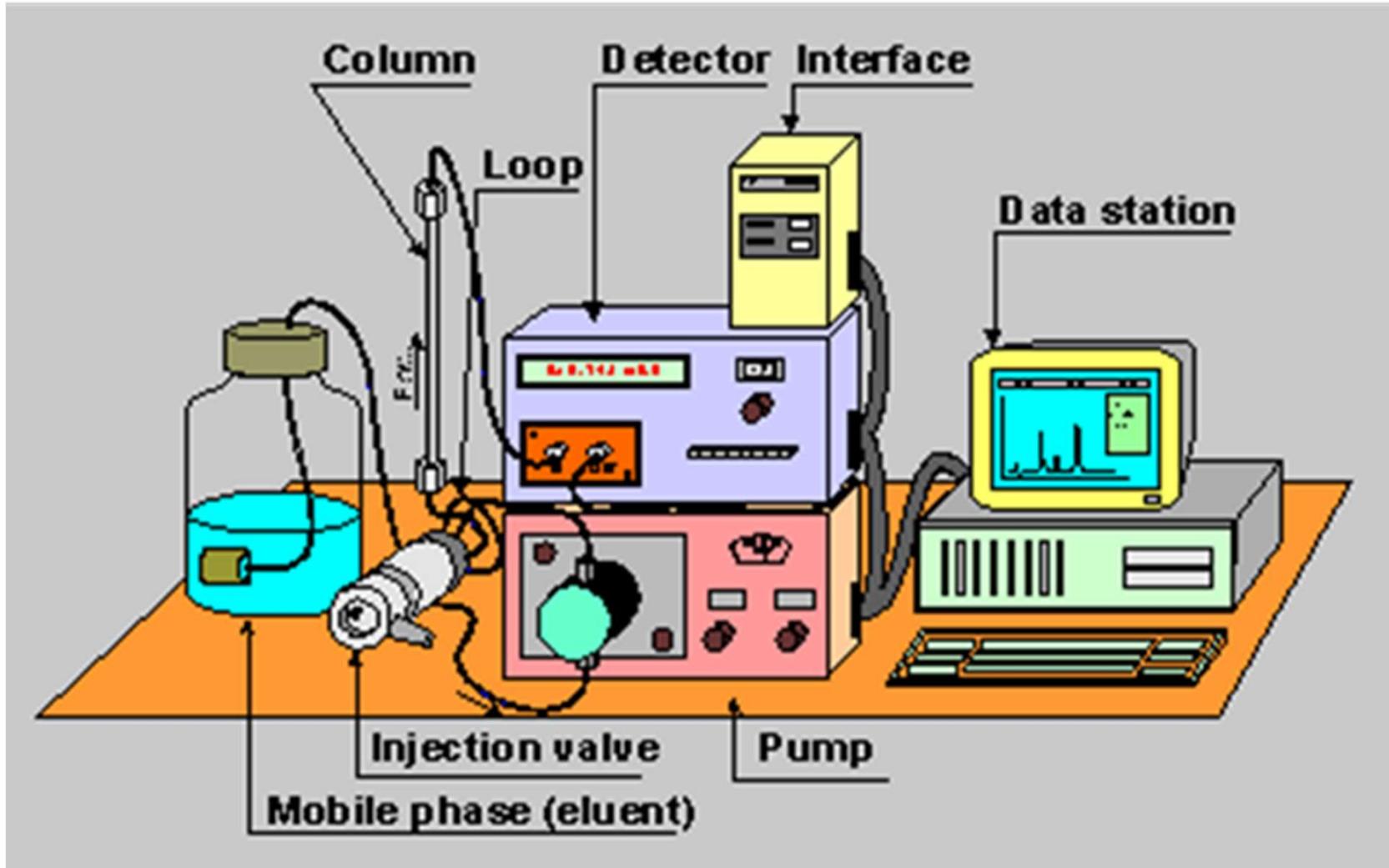
Identification par HPTLC (Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance) des familles moléculaires présentes dans des extraits de plante

www.icoa.fr

Version simple en cuve ou instrumentale sur support haute performance

<http://www.technobio.fr/article-27825936.html>

Chromatographie Hautes Performances (CLHP/HPLC)

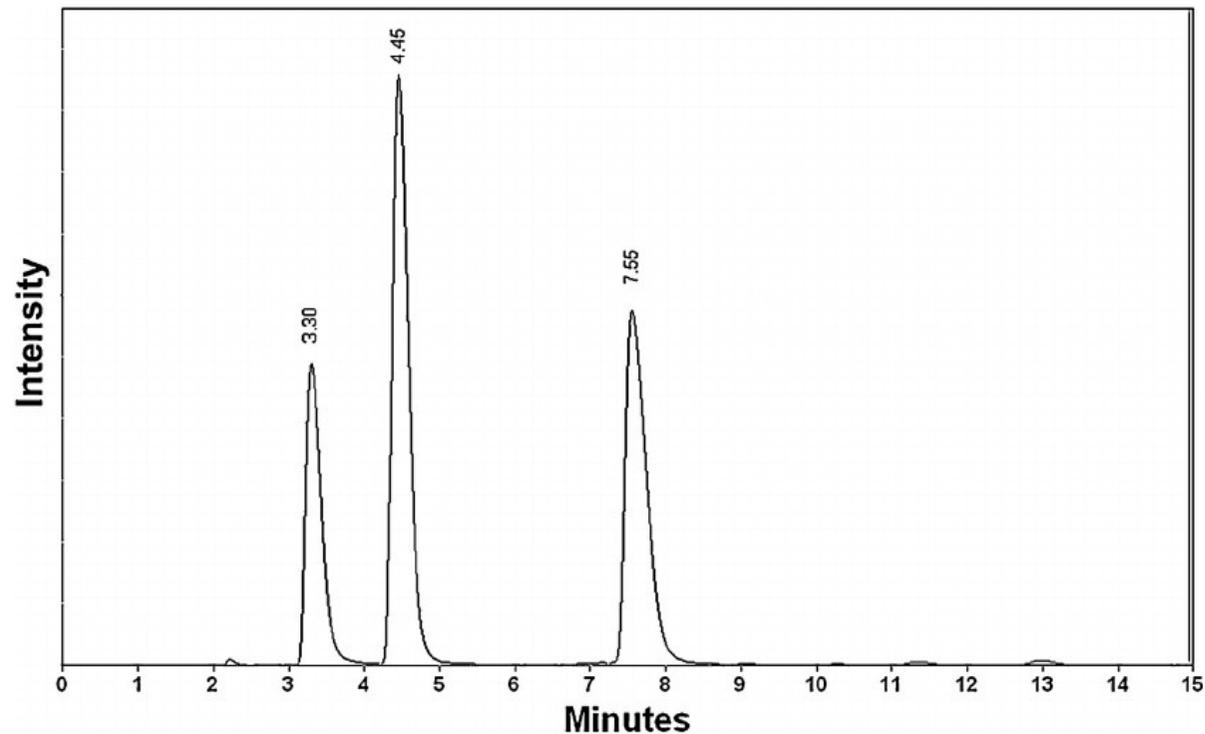


2022/2023 CLHP (ou CPG). Le chromatogramme

UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie

Enregistrement du signal du détecteur en fonction du temps écoulé depuis l'injection de l'échantillon dans la colonne.

Chaque constituant (ici il y en a 3) est repéré par le temps écoulé depuis l'injection et le sommet du pic ou temps de rétention.



En vrai (ancien modèle)



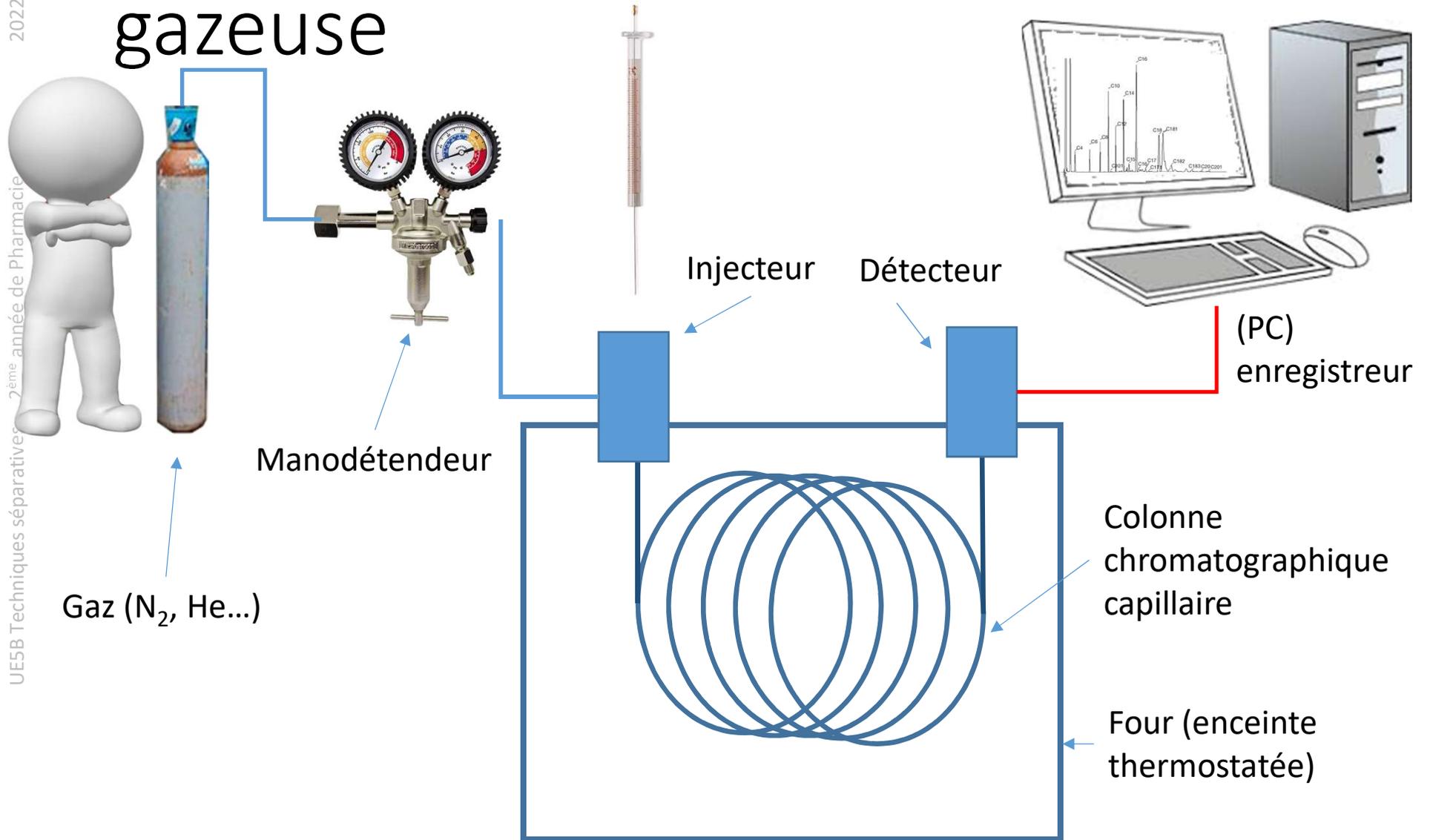
https://fr.wikipedia.org/wiki/Chromatographie_en_phase_liquide_%C3%A0_haute_performance

En vrai (modèle récent).

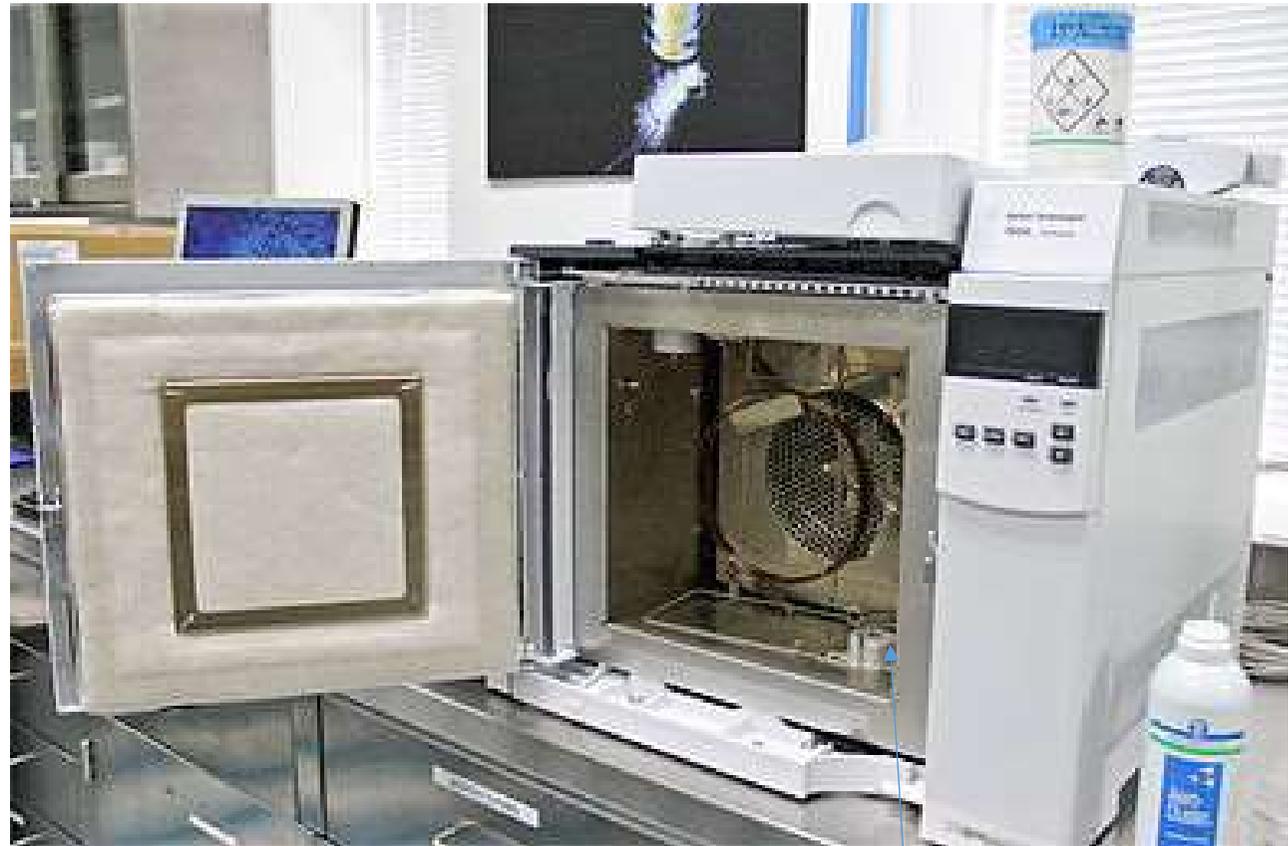


https://fr.wikipedia.org/wiki/Chromatographie_en_phase_liquide_%C3%A0_haute_performance

Chromatographie en phase gazeuse



En vrai



Colonne capillaire positionnée dans le four de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse

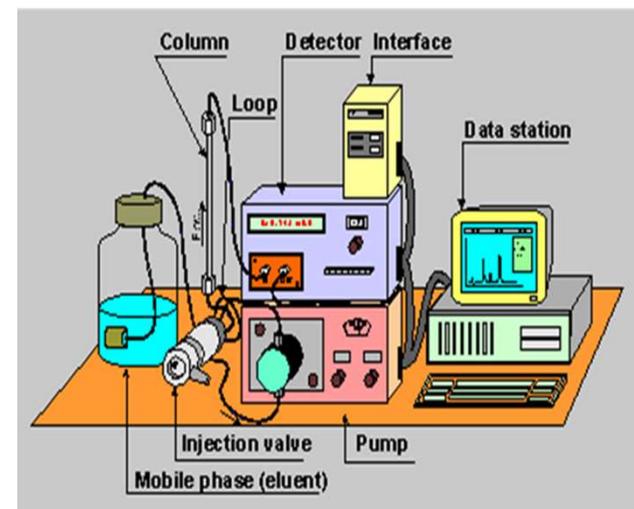
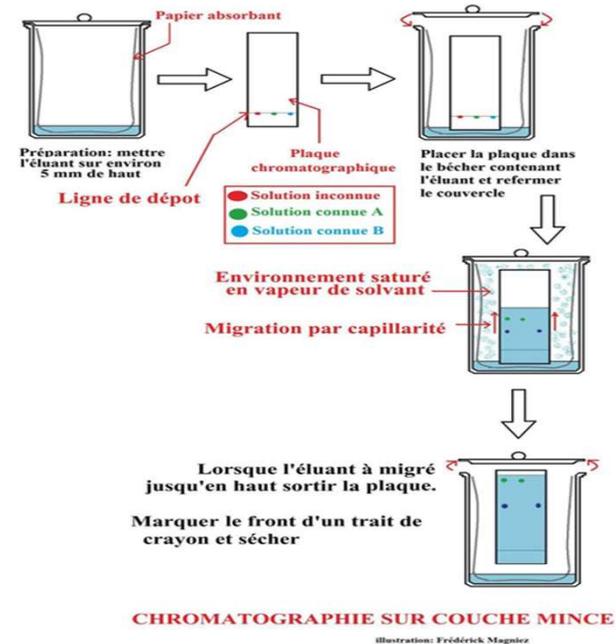
1-2 Chromatographie en phase liquide

Facteurs clefs de la CL

2022/2023

UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie

- Interactions soluté – phase mobile, soluté phase stationnaire et phase mobile phase stationnaire
 - Dépend de la
 - La nature de la phase stationnaire
 - La composition de la phase mobile
 - Des propriétés physicochimiques du soluté
- Paramètres instrumentaux
 - Débit de phase mobile
 - Efficacité de la colonne chromatographique



Généralités sur la CL

1.2.1 La phase mobile et la notion de polarité

- Interactions soluté-solvant (soluté-phase mobile)
- Notion et échelle de polarité
- Triangle de sélectivité des solvants de Snyder

1.2.2 La balance hydrophile/lipophile du soluté

- Les indices de Rekker et le coefficient de partage octanol/eau

1.2.3 La nature de la phase stationnaire

- Phase stationnaire de silice ... la chromatographie d'adsorption
- Phase stationnaire de silice greffée apolaire La chromatographie à polarité de phase inversée
- Les autres phases stationnaires en bref

1.2.1 La phase mobile et la notion de polarité

1.2.1.1 Interactions soluté-solvant (soluté-phase mobile)

Forces intermoléculaires

- Liaisons hydrogène
- Forces de Van der Waals
- **Interactions** entre molécules par des forces électrostatiques
 - Implique la capacité des atomes à attirer les électrons ou **électronégativité**

Electronégativité: Échelle de Pauling

→ Rayon atomique décroît → **Énergie d'ionisation** s'accroît → **Électronégativité** s'accroît →

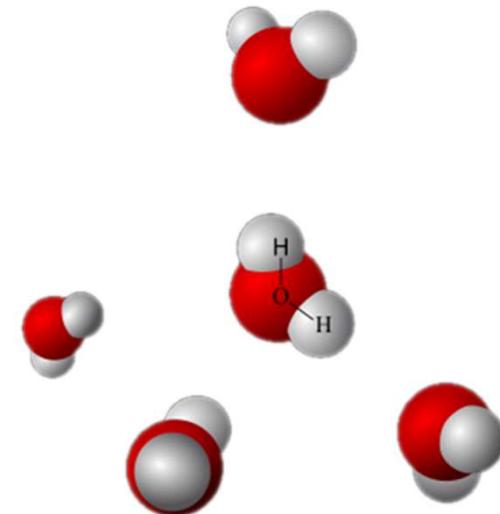
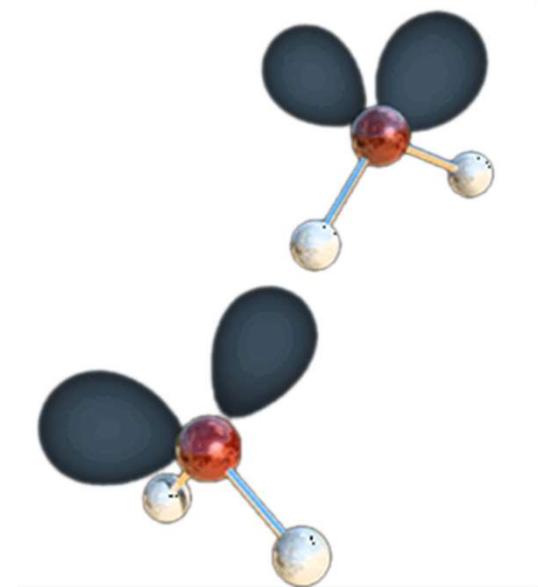
H 2,2																		He
Li 0,98	Be 1,57											B 2,04	C 2,55	N 3,04	O 3,44	F 3,98		Ne
Na 0,93	Mg 1,31											Al 1,61	Si 1,9	P 2,19	S 2,58	Cl 3,16		Ar
K 0,82	Ca 1	Sc 1,36	Ti 1,54	V 1,63	Cr 1,66	Mn 1,55	Fe 1,83	Co 1,88	Ni 1,91	Cu 1,9	Zn 1,65	Ga 1,81	Ge 2,01	As 2,18	Se 2,55	Br 2,96		Kr
Rb 0,82	Sr 0,95	Y 1,22	Zr 1,33	Nb 1,6	Mo 2,16	Tc 2,1	Ru 2,2	Rh 2,28	Pd 2,2	Ag 1,93	Cd 1,69	In 1,78	Sn 1,96	Sb 2,05	Te 2,1	I 2,66		Xe 2,6
Cs 0,79	Ba 0,89	* Lu 1	Hf 1,3	Ta 1,5	W 1,7	Re 1,9	Os 2,2	Ir 2,2	Pt 2,2	Au 2,4	Hg 1,9	Tl 1,8	Pb 1,8	Bi 1,9	Po 2	At 2,2		Rn
Fr 0,7	Ra 0,9	** Lr	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Nh	Fl	Mc	Lv	Ts		Og
		↓																
		* La 1,1	Ce 1,12	Pr 1,13	Nd 1,14	Pm	Sm 1,17	Eu	Gd 1,2	Tb	Dy 1,22	Ho 1,23	Er 1,24	Tm 1,25	Yb			
		** Ac 1,1	Th 1,3	Pa 1,5	U 1,7	Np 1,3	Pu 1,3	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No			

Tableau périodique des éléments utilisant l'échelle d'électronégativité de Pauling²

Échelle de Pauling. (2019). Wikipédia, l'encyclopédie libre. Page consultée à partir de https://fr.wikipedia.org/wiki/Echelle_de_Pauling

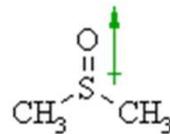
Liaison Hydrogène

- Entre un donneur et un accepteur
 - **Donneur**: molécule ou l'atome d'hydrogène est lié à un atome électronégatif: OH, NH, SH
 - **Accepteur**: molécule porteuse de d'un hétéroatome possédant un doublet électronique libre: O, N, F ...
- Eau (H_2O): O est électronégatif et possède deux doublets libres
 - les molécules d'eau sont associées entres elles par des liaisons hydrogènes
 - 1 molécule d'eau est engagée dans $2 \times 2 = 4$ liaisons avec les molécules d'eau voisines

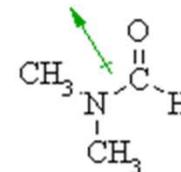


Forces de van der Waals

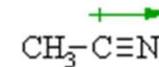
- forces de Keesom ou interactions dipôle-dipôle.
- forces de Debye ou interactions dipôle-dipôle induit
- forces de London ou interaction dipôle induit-dipôle induit
- Dipôle car la liaison entre deux atomes de différence l'électronégativité importante se traduit par l'apparition d'un moment dipolaire
 - Les électrons sont attirés par l'atome le plus électronégatif (polarisé -) au détriment de l'autre atome (polarisé +)
 - Produit de la charge par la distance en coulomb.mètre ou en Debye ($1D = 3,3356 \cdot 10^{-30} \text{ C.m}$)
 - Orienté δ^- vers δ^+



dimethylsulfovide



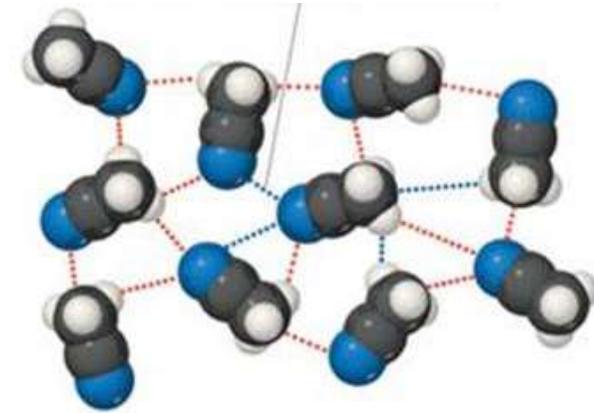
N,N-dimethylformamide



acetonitrile

Forces de V der W: Forces de Keesom

- Forces de Keesom
 - Dans les solvants comme qui, comme l'acétonitrile, possèdent un moment dipolaire permanent.
 - Concerne les solutés qui possèdent eux-aussi un moment dipolaire permanent



(b) Liquid CH_3CN

Forces d'attraction (rouge) et de répulsion (bleue) entre les molécules d'acétonitrile.

<http://schoolbag.info/chemistry/central/100.html>

Fonction	valeur (Debye)	Fonction	valeur (Debye)
Ether	1.2	ester	1.8
Sulfure	1.4	aldéhyde	2.5
acide carboxylique	1.7	cétone	2.7
alcool	1.7	nitro	3.2
halogène	1.6-1.8	nitrile et sulfoxyde	3.5

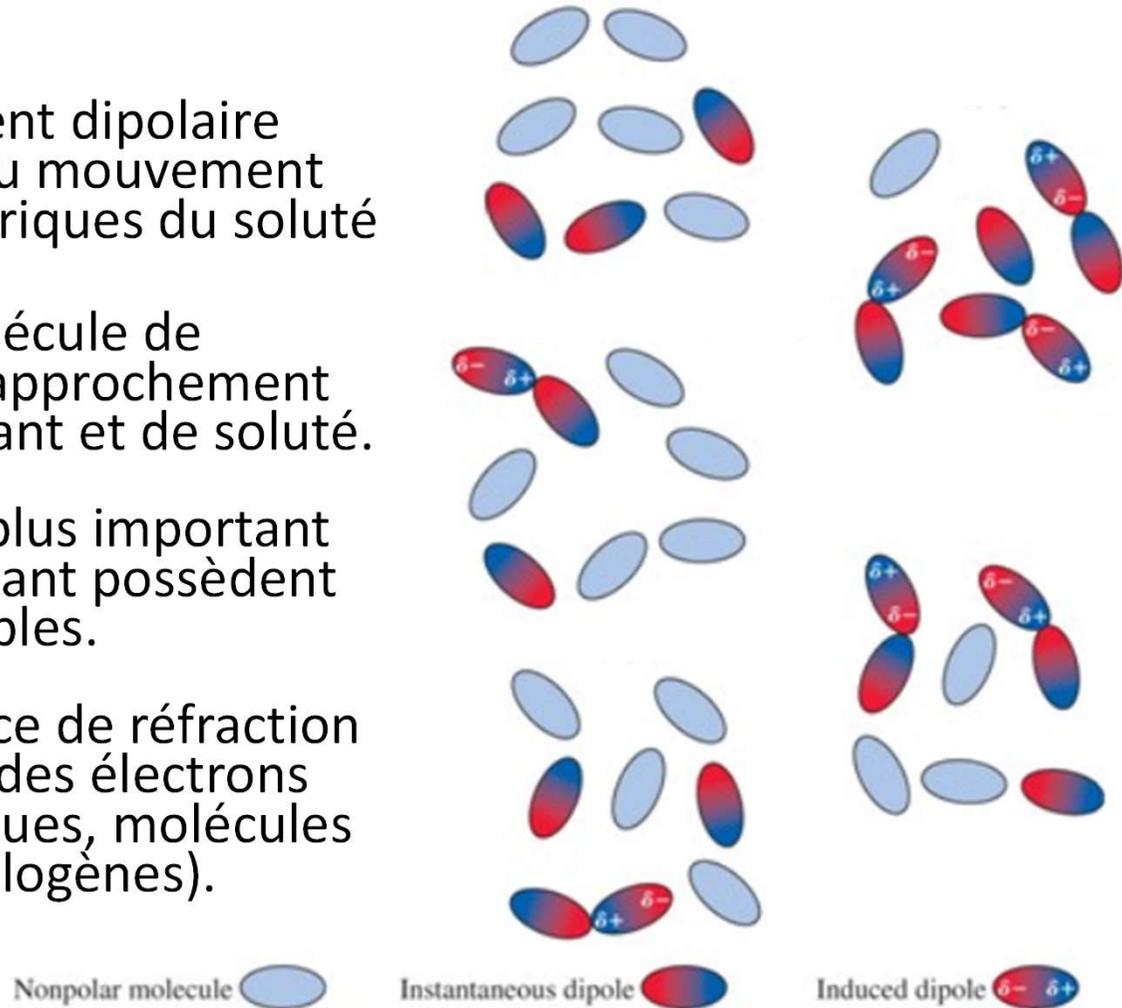
Forces de V der W: forces de Debye

- Forces de Debye
 - quand le solvant possède un moment dipolaire permanent et que le soluté est polarisable.
 - Le champ électrique généré par les molécules de solvant déforme le nuage électronique de la molécule de soluté
 - La polarisabilité d'une liaison dépend de sa longueur et de ce que les électrons sont éloignés des noyaux des atomes.

Fonction	valeur (Debye)	Fonction	valeur (Debye)
Ether	1.2	ester	1.8
Sulfure	1.4	aldéhyde	2.5
acide carboxylique	1.7	cétone	2.7
alcool	1.7	nitro	3.2
halogène	1.6-1.8	nitrile et sulfoxyde	3.5

Forces de V der W: London / dispersion

- Apparition d'un moment dipolaire transitoire en raison du mouvement des électrons périphériques du soluté ou du solvant
- Polarisation d'une molécule de solvant adjacente et rapprochement des molécules de solvant et de soluté.
- phénomène d'autant plus important que le soluté et le solvant possèdent des électrons polarisables.
- Les liquides à fort indice de réfraction possèdent en général des électrons polarisables (aromatiques, molécules substituées par des halogènes).

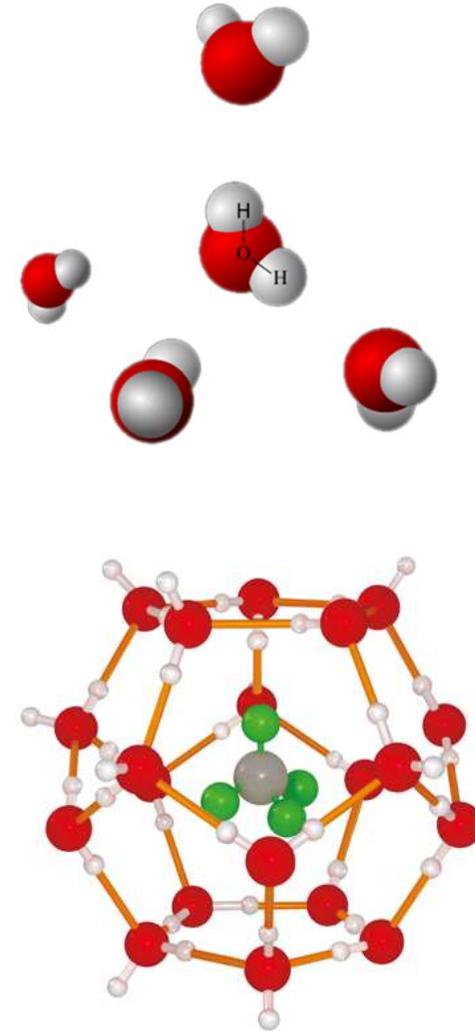


Interaction hydrophobe

- L'eau propose des interactions liaisons hydrogène et dipolaires
- Les alcanes (par exemple) ne sont capables que de forces de dispersion
- Les interactions hydrophobes ne sont pas explicables en termes d'interactions dites spécifiques (liaison H) ou dites non spécifiques (V der W).

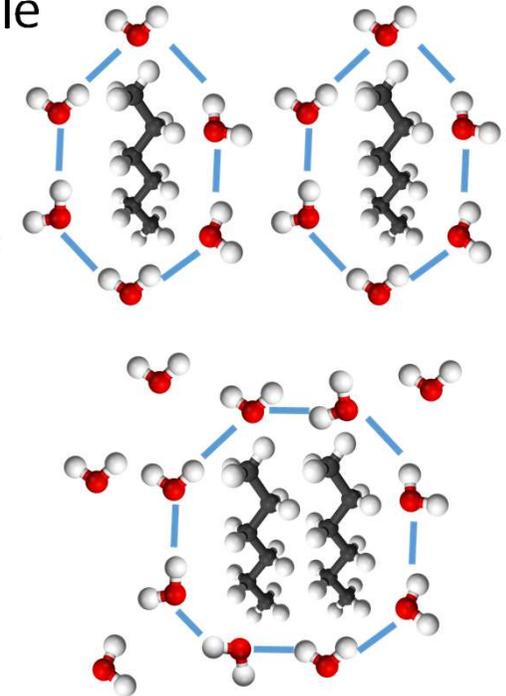
Interaction hydrophobe

- L'introduction d'alcane dans l'eau brise les liaisons H intermoléculaires
- L'eau se réorganise autour des molécules d'alcane pour former des clathrates (cages)
- Pour rappel, en principe, 1 molécule d'eau est engagée dans $2 \times 2 = 4$ liaisons avec les molécules d'eau voisines
- Dans les clathrates, les molécules d'eau s'organisent pour se rapprocher de cet optimum énergétique
- La formation des clathrates n'est pas spontanée mais demande de l'énergie pour qu'ils soient formés



Interaction hydrophobe

- S'explique par le deuxième principe de la thermodynamique:
 - L'entropie d'un système augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale qui correspond à l'équilibre
 - Eau pure = entropie (mesure du désordre) maximale (agitation moléculaire) **énergétiquement** 😊
 - Introduction d'alcane dans l'eau = organisation de l'eau autour des alcanes = diminution de l'entropie du système (car constitué très majoritairement d'eau) **énergétiquement** ☹️
 - Agrégation spontanée des alcanes entre eux
 - Interactions type force de London entre les alcanes
 - Création de « cages » plus grandes qui impliquent moins de molécules d'eau
 - L'entropie du système (l'eau) est augmentée **énergétiquement** 😊



Les forces mises en jeux

Weak Intermolecular Interactions

Force	Strength (kJ/mol)	Distance (nm)
Van der Waals	0.4-4.0	0.3-0.6
Hydrogen Bonds	12-30	0.3
Ionic Interactions	20	0.25
Hydrophobic Interactions	<40	varies

http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/Atomic_and_Molecular_Properties/Intermolecular_Forces/Specific_Interactions/Van_Der_Waals_Interactions

- Les liaisons hydrogènes sont les plus énergétiques, du même ordre de grandeur que des interactions ioniques
- Les forces de VdW sont ~10x plus faibles
- Forces de faible portée
- En revanche l'interaction hydrophobe peut être nettement plus énergétique

1.2.1 La phase mobile et la notion de polarité

1.2.1.2 Notion et échelle de polarité

Notion de polarité

1. Définition de la polarité (selon l'IUPAC):

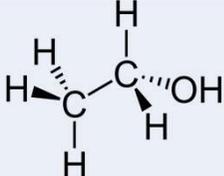
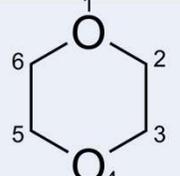
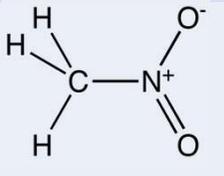
Appliqué aux solvants, propriété couvrant leur **capacité globale de solubilisation** qui dépend de l'action de différentes **interactions intermoléculaires** spécifiques et non spécifiques entre les ions ou molécules et le solvant (autres que celles aboutissant à la dégradation du soluté).

2. Aspect pratique:

1. Solvant polaire, dissout les composés hydrophiles
2. Solvant apolaire, dissout les composés lipophiles
→ Échelles de polarité

Échelle de Rohrschneider

- Échelle basée sur la solubilité de 3 composé tests dans les solvants

Composé	Éthanol	1,4 dioxane	Nitrométhane
caractère	Donneur de protons	Accepteur de protons	Interactions dipôle-dipôle
			

- Mesure des coefficients de distribution K_g des composés tests entre le solvant et la phase vapeur
- Correction de K_g à $K''g$ (volume molaire v_s du solvant, alcane homologue de même v_s)
- Solubilité exprimée par $K''g$ et combinée pour calculer P'
 - $P' = \log(K''g [\text{éthanol}]) + \log(K''g [\text{dioxane}]) + \log(K''g [\text{nitrométhane}])$
- Chaque solvant se voit attribuer une valeur P' qui représente sa polarité

Exemples de valeurs de P'

N°	Solvant	1 P'	2 Groupe de sélec- tivité	3 x_e	4 x_d	5 x_n
6	<i>n</i> -Hexane.....	0,1	—			
7	Iso-octane.....	0,1	—			
8	Tétrahydrofuranne.....	4,0	III	0,38	0,20	0,42
13	Chloroforme.....	4,1	VIII	0,25	0,41	0,33
16	Chlorure de méthylène.....	3,1	V	0,29	0,18	0,53
27	Acétate d'éthyle.....	4,4	VI	0,34	0,23	0,43
32	<i>n</i> -Octanol.....	3,4	II	0,56	0,18	0,25
43	Acétone.....	5,1	VI	0,35	0,23	0,42
56	Méthanol.....	5,1	II	0,48	0,22	0,31
39	<i>n</i> -Butanol.....	3,9	II	0,59	0,19	0,25
40	Propanol-2.....	3,9	II	0,55	0,19	0,27
41	<i>n</i> -Propanol.....	4,0	II	0,54	0,19	0,27
63	Acétonitrile.....	5,8	VI	0,31	0,27	0,42
81	Eau.....	10,2	VIII	0,37	0,37	0,25

Extrait de « Chromatographies en phases liquide et supercritique » R. Rosset, M. Caude, A. Jardy. Masson.

Le terme 'x' renseigne sur les interactions offertes par le solvant:

$$x_e = \frac{\log(K''_{g \text{ ethanol}})}{P'}$$

$$x_d = \frac{\log(K''_{g \text{ dioxane}})}{P'}$$

$$x_n = \frac{\log(K''_{g \text{ nitrométhane}})}{P'}$$

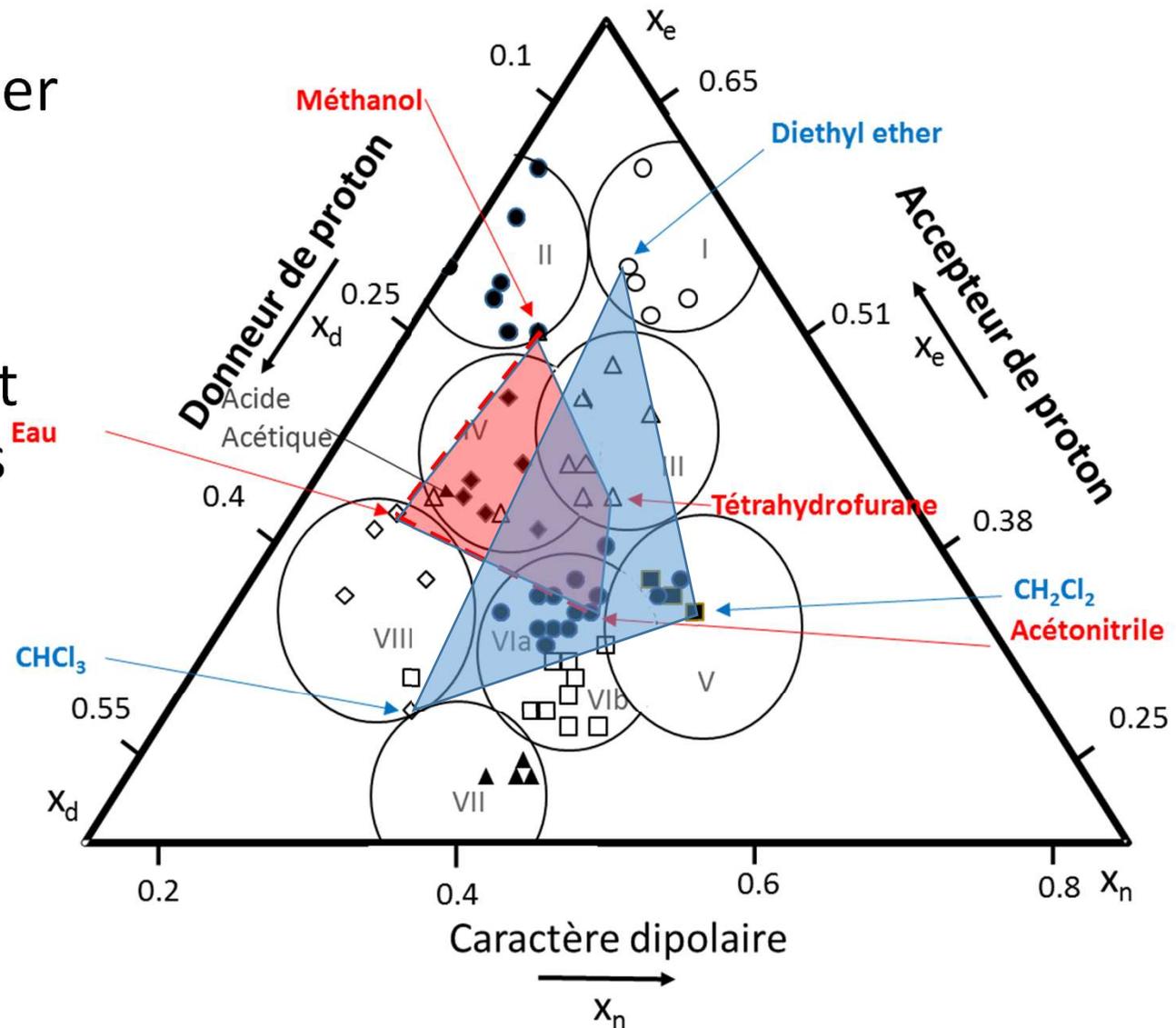
$$x_e + x_d + x_n = 1$$

Triangle de sélectivité des solvants de Snyder

2022/2023

- Permet de classer les solvants en groupe de sélectivité (solvants offrant des interactions comparables)

UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie



Échelle de polarité d'Hildebrand

- E_s^v Energie moléculaire de cohésion= Energie nécessaire pour faire passer 1 mole de solvant de l'état liquide à l'état gazeux dans les conditions normales.
- V_s volume molaire du solvant S
- Les différentes interactions sont quantifiées en scindant l'énergie moléculaire de cohésion en énergies partielles de
 - d'interactions de dispersion : δ_d
 - d'interactions type dipôle-dipôle : δ_n
 - d'interactions liaison hydrogène : δ_h
- A partir de ces valeurs on peut calculer de paramètre de solubilité global (ou total) δ_0

$$\delta = \sqrt{\frac{E_s^v}{V_s}}$$

$$\delta_0 = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_n^2 + \delta_h^2}$$

Échelle de polarité d'Hildebrand

Nom	$\delta, \text{cal}^{1/2} \text{cm}^{-3/2*}$				
	1 δ	2 δ_0	3 δ_d	4 δ_n	5 δ_h
Alcane					
<i>n</i> -Butane.....	6,8	6,9	6,9	0,0	0,0
<i>n</i> -Pentane.....	7,0	7,1	7,1	0,0	0,0
<i>n</i> -Hexane.....	7,3	7,3	7,3	0,0	0,0
<i>n</i> -Heptane.....	7,4	7,5	7,5	0,0	0,0
<i>n</i> -Octane.....	7,6	7,6	7,6	0,0	0,0
Dodécane.....	7,9	7,8	7,8	0,0	0,0
Hydrocarbures halogénés					
Chlorure de méthyle.....	9,7	8,3	7,5	3,0	1,9
Chlorure de méthylène.....	9,7	9,9	8,9	3,1	3,0
Chloroforme.....	9,3	9,3	8,7	1,5	2,8
Éthers					
Tétrahydrofur.....	9,1	9,5	8,2	2,8	3,9
Cétones					
Acétone.....	9,9	9,8	7,6	5,1	3,4

Nom	$\delta, \text{cal}^{1/2} \text{cm}^{-3/2*}$				
	1 δ	2 δ_0	3 δ_d	4 δ_n	5 δ_h
Composés azotés					
Acétonitrile.....	11,9	12,0	7,5	8,8	3,0
Alcools					
Méthanol.....	14,5	14,5	7,4	6,0	10,9
Éthanol.....	12,7	13,0	7,7	4,3	9,5
Octanol-1.....	10,3	10,3	8,3	1,6	5,8
Eau.....	23,4	23,4	7,6	7,8	20,7

Extrait de « Chromatographies en phases liquide et supercritique » R. Rosset, M. Caude, A. Jardy. Masson.

1.2.2 La balance hydrophile/lipophile du soluté

Les indices de Rekker et le coefficient de partage octanol/eau

Notion de lipophilie : coefficient de partage octanol / eau

- Une molécule est lipophile quand elle se dissout dans les graisses
- Par opposition, une molécule est hydrophile quand elle se dissout dans l'eau
- La balance hydrophile/lipophile d'une molécule peut être appréciée par son coefficient de partage $P_{o/w}$ entre l'octanol et l'eau



Coefficient de partage octanol/eau

- Le coefficient de partage P d'un composé correspond au rapport de concentration : $C_{\text{octanol}}/C_{\text{eau}}$, pour un composé à l'équilibre entre les deux phases.
- Dans la pratique on considère $\text{Log}P$ dont les grandeurs sont plus faciles à utiliser.
 - Si $\text{Log}P < 0$ (alors $P < 1$) la molécule est hydrophile
 - Si $\text{Log}P > 0$ la molécule est lipophile
 - (si $\text{log}P=0$ la molécule est amphiphile)

Constantes de Rekker

$$\log P = \sum_i f_i + \sum_k f'_k$$

N°	Fragment	f_i <i>n</i> -octanol	N°	Fragment	f_i <i>n</i> -octanol
1	C ₆ H ₅	1,886	40	(al)NH	- 1,825
2	C ₆ H ₄	1,688	41	(ar)NH	- 0,964
3	C ₆ H ₃	1,431	42	(al)N	- 2,160
4	CH ₃	0,702	43	(ar)N	- 1,012
5	CH ₂	0,530	44	(ar)SO ₂ NH ₂	- 1,530
6	CH	0,235	45	(ar)SO ₂ NH	- 1,992
7	C(quart.)	0,15	46	(ar)SO ₂ N	- 2,454
8	CH ₂ =CH	0,935	47	(al)CONH ₂	- 1,970
9	CH=C	0,73	48	(ar)CONH ₂	- 1,109
10	H	0,175	49	(al)CON	- 2,894
11	H(neg)	0,462	50	(al)NHCOO	- 1,943
12	(al)COOH	- 0,954	51	(ar)NHCOO	- 0,795
13	(ar)COOH	- 0,093	52	(al)OOCNH ₂	- 1,481
14	(al)COO	- 1,292	53	(al)NO ₂	- 0,939
15	(ar)COO	- 0,431	54	(ar)NO ₂	- 0,078
16	(al)CO	- 1,703	55	(al)C≡N	- 1,066
17	(ar)CO	- 0,842	56	(ar)C≡N	- 0,205
18	(al)O	- 1,581	57	(ar)C=N	- 1,88
19	(ar)O	- 0,433	58	(ar)CH=CH-NO ₂	0,395
20	(al)OH	- 1,491	59	(ar)CH=C-NO ₂	0,220
21	(ar)OH	- 0,343	60	(ar)CH=CH-COO	0,042
22	(ar)COH	- 0,38	61	(ar)CH=CH-CONH	- 1,100
23	(al)OCH ₂ COOH	- 1,155	62	(al)SH	0,00
24	(ar)OCH ₂ COOH	- 0,581	63	(ar)SH	0,62
25	(al)CF ₃	0,757	64	(al)S	- 0,51
26	(ar)CF ₃	1,331	65	(ar)S	0,11
27	(al)CCl ₃	1,79	66	(al)S-S	0,37
28	(al)F	- 0,462	67	(al)SO	- 2,75
29	(ar)F	0,399	68	(ar)SO	- 2,05
30	(al)Cl	0,061	69	(ar)SO ₂	- 1,87
31	(ar)Cl	0,922			
32	(al)Br	0,270			
33	(ar)Br	1,131			
34	(al)I	0,587			
35	(ar)I	1,448			
36	C ₂ H ₄ N ⁺	0,526			
37	C ₂ H ₃ N ₂ ^b	- 0,119			
38	(al)NH ₂	- 1,428			
39	(ar)NH ₂	- 0,854			

(^a): groupement pyridile
 (^b): groupement imidazole
 Constante magique : 0,268
 Effet de proximité (1C) : 0,861
 Effet de proximité (2C) : 0,574

- Permettent le calcul du LogP d'une molécule par addition des contributions de ses groupements fonctionnels
- Intéressant en chromatographie pour comparer le caractère hydrophile/lipophile de différents composés.
- Par exemple:
 - un méthyl augmente le caractère lipophile (+0,702)
 - Un hydroxy augmente le caractère hydrophile (valeur négative -1.491 ou -0.343 selon qu'il est lié à un cycle aromatique ou à une chaîne aliphatique)

Extrait de « Chromatographies en phases liquide et supercritique » R. Rosset, M. Caude, A. Jardy. Masson.

Calcul de LogP en pratique

The screenshot illustrates the practical calculation of LogP. It shows the DrugBank website interface for Diazepam (DB00829) and the ACD/3D Viewer software window. The ACD/3D Viewer displays the calculated LogP value of 2.91 +/- 0.89 for the diazepam structure. A dialog box prompts the user to learn more about the calculation method.

DrugBank Entry:

- Name:** Diazepam
- Accession Number:** DB00829 (APRD00642, DB07699)
- Type:** Small Molecule
- Groups:** Approved, Illicit
- Description:** A benzodiazepine with anticonvulsant, anxiolytic, sedative, muscle relaxant, and amnesic properties and a long duration of action. Its actions are mediated by enhancement of gamma-aminobutyric acid activity. It is used in the treatment of severe anxiety disorders, as a hypnotic in the short-term management of insomnia, as a sedative and premedicant, as an anticonvulsant, and in the management of alcohol withdrawal syndrome. (From Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30th ed, p589)

ACD/3D Viewer Output:

Calculated LogP: 2.91 +/- 0.89

Interested how this value was calculated? Want to compare it with experimental data?

Does your compound contain ionizable groups? You should consider using the pH dependent octanol-water distribution coefficient, logD

Visit our Web site: www.acdlabs.com

Chemical structure: CN1C=NC2=C(C=C1)C(=O)N2C3=CC=CC=C3Cl

Le LogP des composés ionisables

- Pour un acide faible



Le logP correspond à la balance hydrophile/lipophile de la forme non ionisée et est observable à $pH \ll pKa$

La forme ionisée A^- est toujours plus hydrophile que AH

- Pour une base faible



Le logP correspond à RNH_2 et est observé à $pH \gg pKa$

La forme ionisée RNH_3^+ est toujours plus hydrophile que RNH_2

LogD, Log du Coefficient de Distribution

LogD prend en compte la concentration totale des espèces dans les deux phases aqueuse et organique à un pH donné.



$$\text{Log}D_{(pH)} = \frac{([AH] + [A^-])_{\text{octanol}}}{([AH] + [A^-])_{\text{eau}}}$$



$$\text{Log}D_{(pH)} = \frac{([RNH_3^+] + [RNH_2])_{\text{octanol}}}{([RNH_3^+] + [RNH_2])_{\text{eau}}}$$

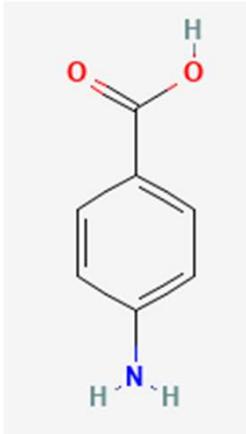
Acidités/Basicités multiples, Zwitterions ...

$$\text{Log}D_{(pH)} = \frac{(\sum[\text{espèces}])_{\text{octanol}}}{(\sum[\text{espèces}])_{\text{eau}}}$$

LogD exemple

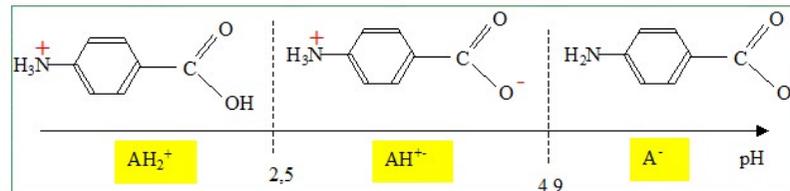
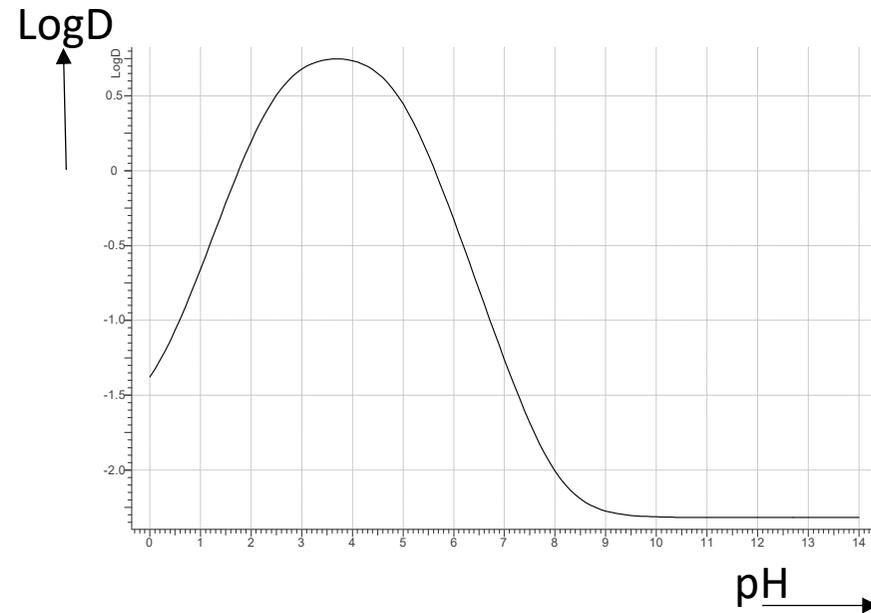
Acide 4-aminobenzoïque

LogP \approx 0,8



Acide carboxylique
pKa \approx 4,9

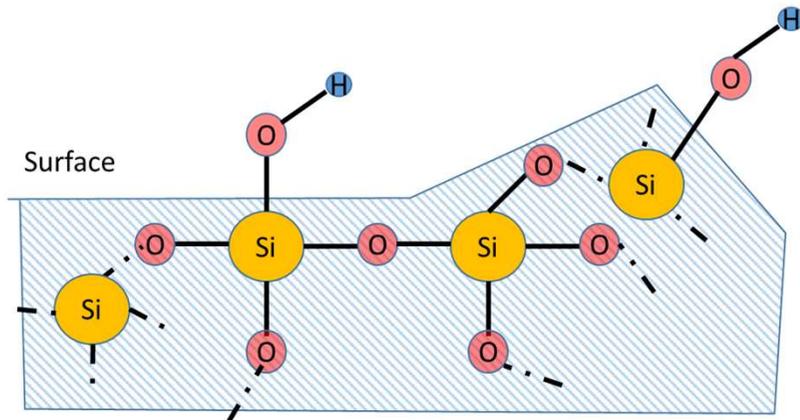
Fonction amine
pKa \approx 2,5



1.2.3 La nature de la phase stationnaire

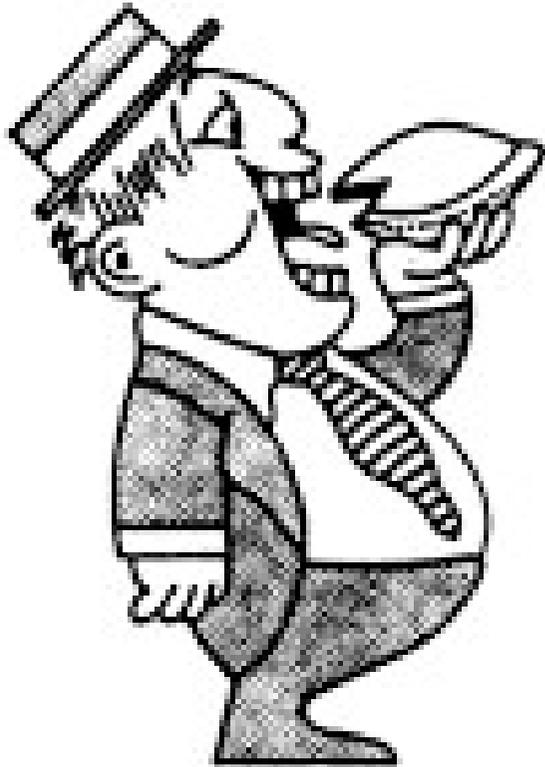
- Phase stationnaire de silice ... la chromatographie d'adsorption
- Phase stationnaire de silice greffée apolaire La chromatographie à polarité de phase inversée
- Les autres phases stationnaires en bref

Phase stationnaire de silice

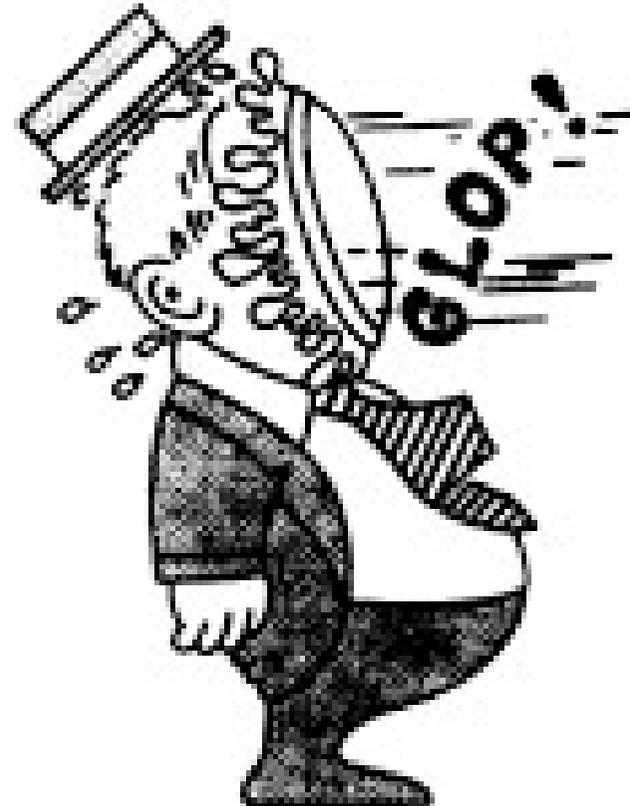


- Gel de silice constitué d'atomes de silicium liés entre eux par des ponts siloxanes
- A la surface des silanols (Si-OH) sont présents et confèrent à la silice ses propriétés d'adsorbant polaire

Adsorption et Absorption



ABsorption

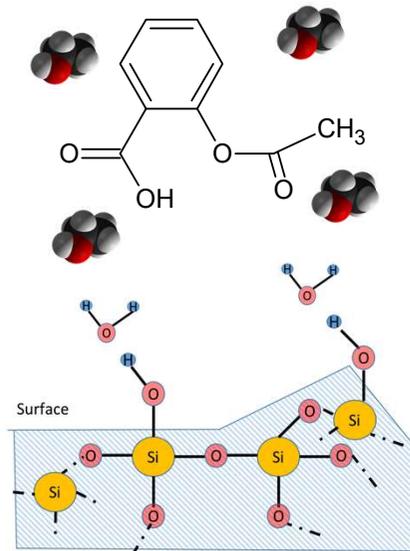
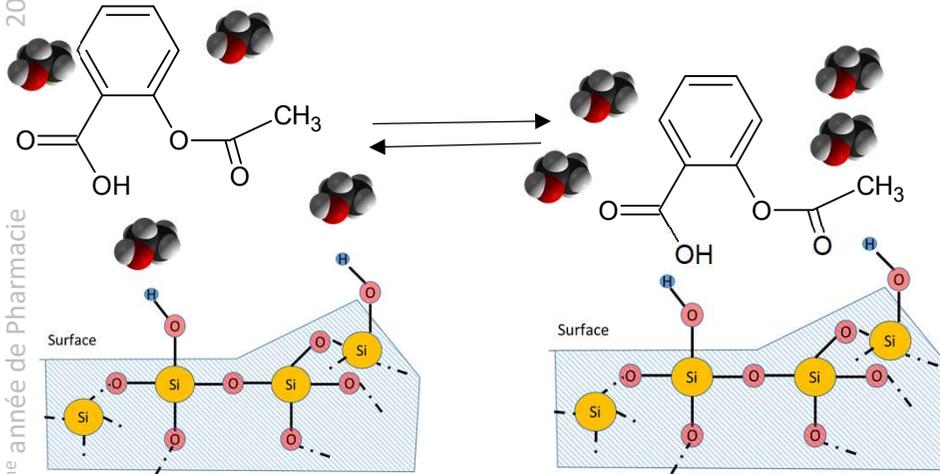


ADsorption

Phase stationnaire de silice, mécanisme d'adsorption

2022/2023

UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie



- Le soluté vient s'adsorber à la surface de la silice par interactions de ses groupements fonctionnels polaires avec les silanols.
- Le(s) solvant(s) polaire(s) de la phase mobile entre(nt) en compétition avec le soluté pour le déplacer
- Il s'installe un équilibre compétitif
- L'eau, solvant le plus polaire, s'adsorbe sur le silanols et « désactive » la phase stationnaire

Chromatographie en phase normale

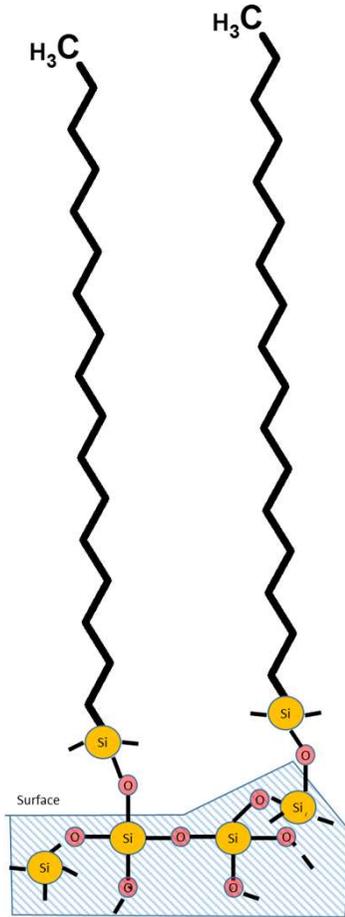
Polarité



- Phase stationnaire de silice (polaire)
- Phase mobile = mélange d'au moins deux solvants
 - Un apolaire dit faible
 - Un plus polaire (mais miscible) dit modificateur

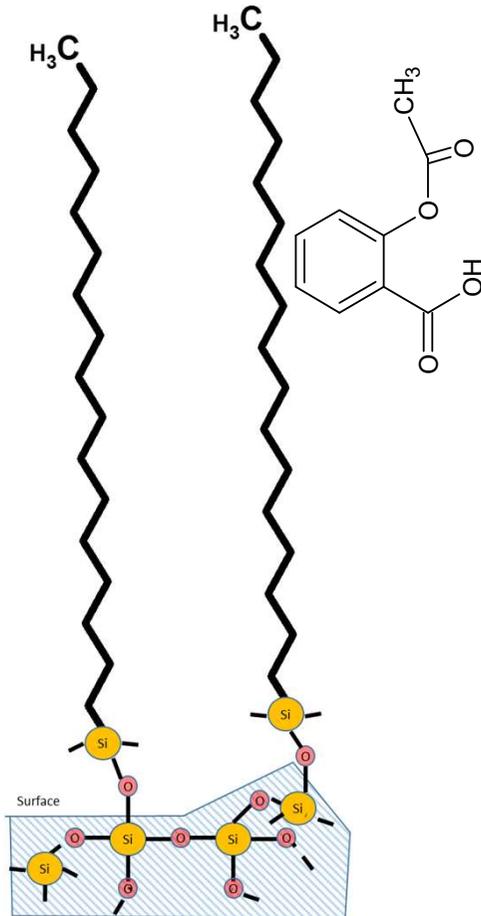
- S'adresse aux analytes solubles dans les solvants organiques
- Les analytes doivent posséder une ou plusieurs fonctions polaires (OH, NH₂, C=O...)
- Plus les analytes possèdent des fonctions polaires, plus ils sont retenus
- Sensible à la présence d'eau dans les solvants et les échantillons (extraction L/L préalable pour les échantillons biologiques)

Phase stationnaire de silice greffée apolaire



- La silice est chimiquement modifiée par greffage d'alkyle silanes sur les silanols de la surface
- La chaîne alkyle du greffon a une longueur de 18 carbones (classiquement)
- La phase stationnaire est maintenant apolaire
- La phase mobile est constituée d'eau (polaire) et d'un solvant organique (miscible) qui modifie la polarité
- La polarité des phases est inversée p/r à la Chromatographie en phase normale

Phase stationnaire de silice greffée apolaire



- Les interactions soluté – phase stationnaire ne font plus intervenir les silanols mais une interaction hydrophobe avec les greffons
- Il n’y a pas de mécanisme compétitif comme en chromatographie d’adsorption.

Chromatographie à polarité de phase inversée

Polarité



- Phase mobile = mélange d'au moins deux solvants
 - De l'eau, solvant faible
 - Un solvant organique miscible (méthanol, acétonitrile, tétrahydrofurane) qui modifie (diminue) la polarité
 - Possibilité de modifier le pH par ajout d'un tampon
 - Phase stationnaire greffée alkyle
-
- S'adresse aux analytes partiellement hydrosolubles
 - Les analytes totalement hydrosolubles (sucres) n'interagissent pas suffisamment avec la PS pour être retenus
 - Plus les analytes sont apolaires, plus ils sont retenus
 - Compatible avec les échantillons aqueux d'où sa grande popularité

D'autres phases stationnaires en bref

Phase stationnaire

1. Greffée polaire: diol, NH_2
2. Résine échangeuse de cations ou d'anions
3. Greffée avec sélecteurs chiraux (cyclodextrine, albumine...)

Analytes/application

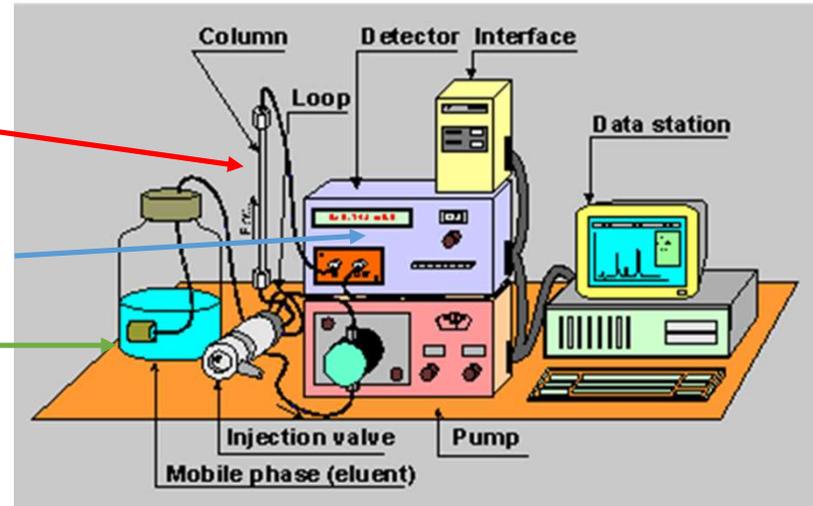
- 1.1 CL en phase normale sur phase greffée (analyte lipophile)
- 1.2 Chromatographie d'interaction hydrophile (analytes hydrophiles)
- 2 Chromatographie ionique (analytes ionisés et ionisable)
- 3 séparation d'énantiomères ou pureté énantiomérique

1.2.4 Chromatographie liquide haute performances

CLHP ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

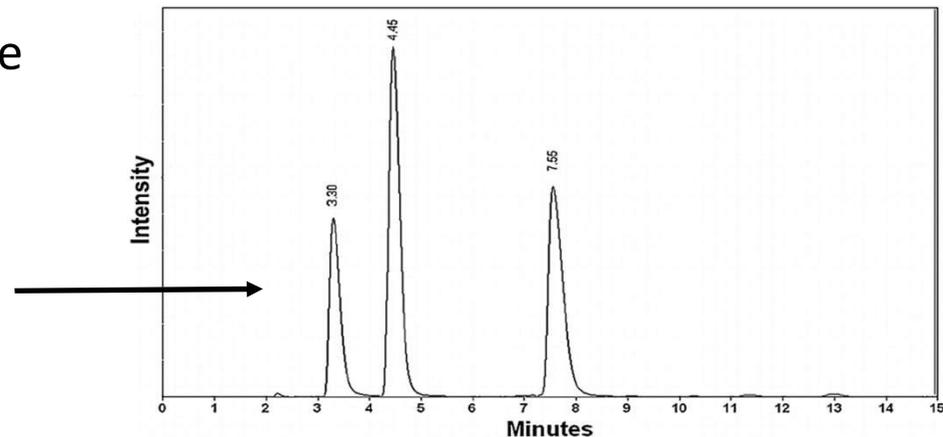
Chromatographie Hautes Performances (CLHP/HPLC)

- 1^{ère} étape de développement: choix de la **colonne** qui renferme la **phase stationnaire** et montage sur l'appareil
- 2^{ème} étape, choix et réglage du **détecteur**
- 3^{ème} étape, mise au point de la **composition de la phase mobile** (% et nature des solvants, pH).



Phase mobile délivrée par la pompe (débit réglable) sous une pression de plusieurs 100aines à 1000 bars

• Objectif: séparer les analytes en un temps minimum



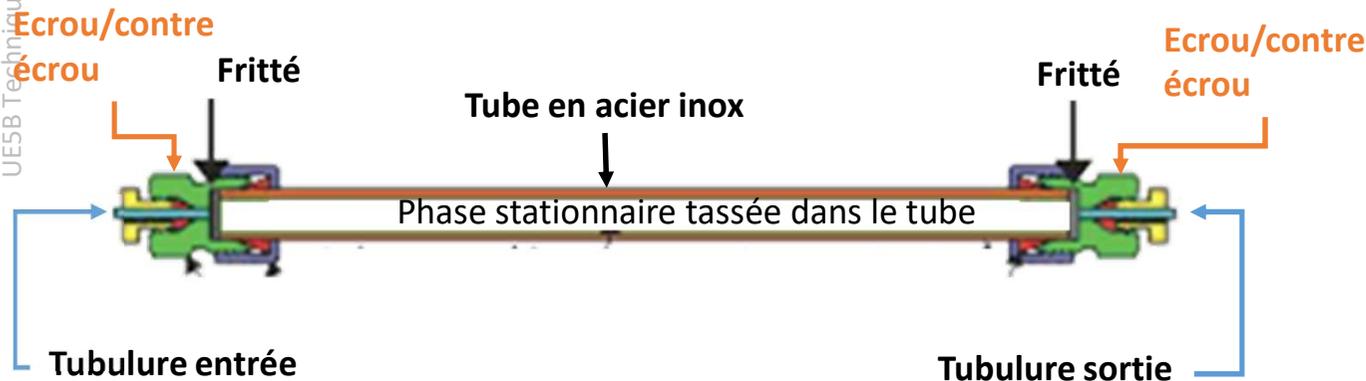
La colonne et la phase stationnaire

Colonne: tube en acier de 10-20 cm de long et 4 mm de diamètre interne.



Les **tubulures** qui connectent la colonne à la vanne d'injection et au détecteur se fixent aux extrémités

- **Phase stationnaire:** particules de silice (greffée), poreuses, sphériques
- **Diamètre des particules** 3 à 5 μm (HPLC) ou < 2 μm (UHPLC)
- **Diamètre des pores** 70 à 100Å pour les petites molécules à 300Å pour les peptides et protéines



L'écoulement de la phase mobile à travers la colonne: Loi de Darcy

Perte de charge (différence de pression entre l'entrée et la sortie) de la colonne chromatographique: **Loi de Darcy**, écoulement d'un fluide incompressible à travers un solide poreux

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot L \cdot u}{K^\circ}$$

η viscosité de la phase mobile,

K° constante de perméabilité de la colonne.

dp : diamètre des particules.

ϕ facteur de tortuosité

$$K^\circ = \frac{dp^2}{\phi}$$

$\phi \approx 500$ pour des particules poreuses régulières.

Conséquences.

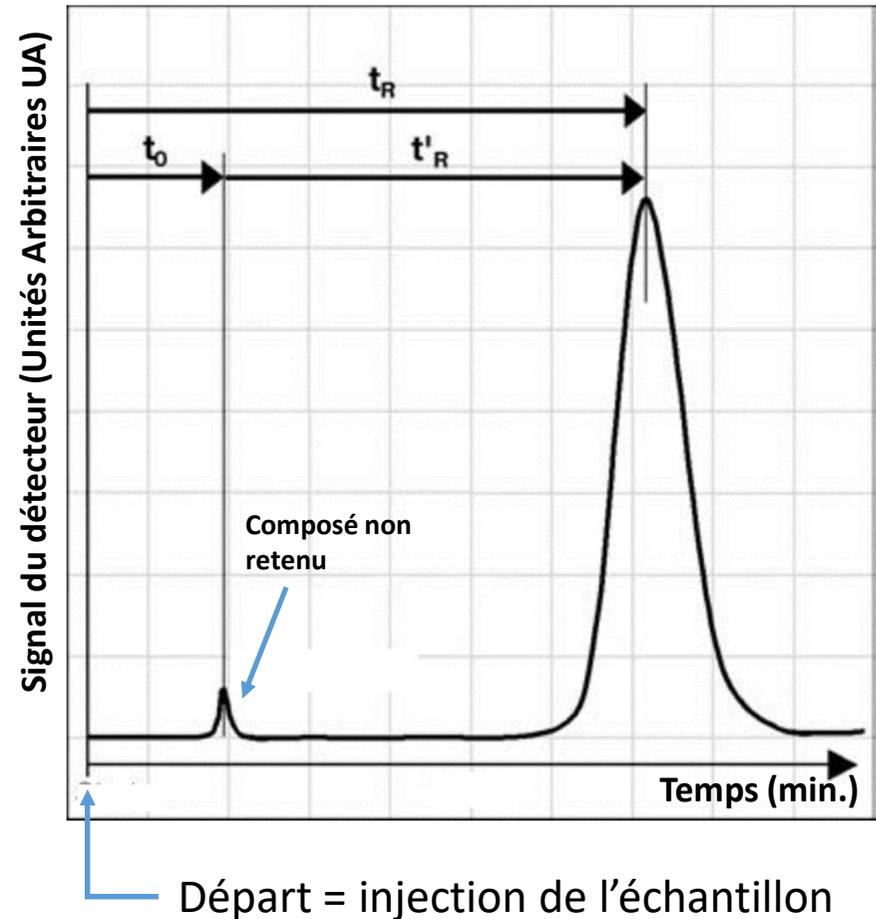
η varie avec la nature du solvant. η diminue avec la température croissante.

ΔP augmente avec la longueur de colonne, la vitesse (le débit) de la phase mobile.

ΔP est plus important pour de petits diamètres de particules.

Le chromatogramme

- Temps mort (t_0 ou t_M)
 - Temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne
 - Un composé non retenu est entraîné à la vitesse de la phase mobile
- Temps de rétention (t_R)
 - Mesuré entre l'injection et le sommet du pic
- Temps de rétention réduit $t'_R = t_R - t_0$



Le chromatogramme et l'élution

- Le système fonctionne à débit D constant
- t_0 et t_R peuvent être reliés aux volumes V de phase mobile qui imprègne la phase stationnaire (V_0) et au volume nécessaire à l'élution du soluté (V_R)

$$V_0 = t_0 D \quad V_R = t_R D$$

- V_R et V_0 sont liés à l'équilibre de séparation

$$V_R = V_0 + K V_S$$

V_S est le volume de phase stationnaire

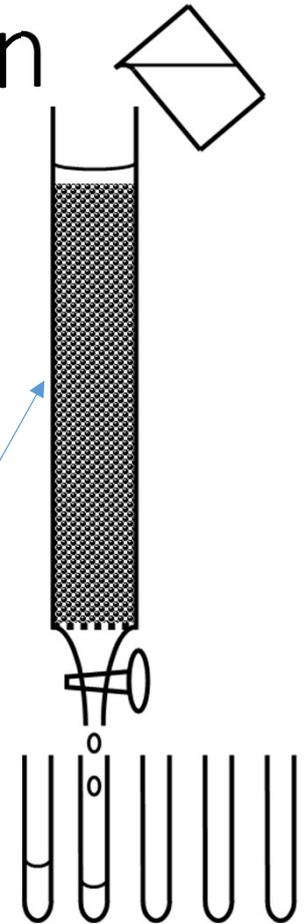
K est le coefficient de distribution du soluté entre la phase stationnaire et mobile

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

C_S est la concentration du soluté dans la phase stationnaire

C_M est la concentration du soluté dans la phase mobile

Ceci pendant la séparation à l'intérieur de la colonne



Coefficient de distribution et facteur de rétention

- Facteur de rétention k

Se défini comme

$$k = \frac{C_S V_S}{C_M V_0} = K \frac{V_S}{V_0}$$

- Se mesure comme

$$k = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Pour une colonne chromatographique donnée V_S/V_M est en approximativement constant quelque soit la composition de la phase mobile. En revanche K varie selon la nature et la composition de la phase mobile ou la température

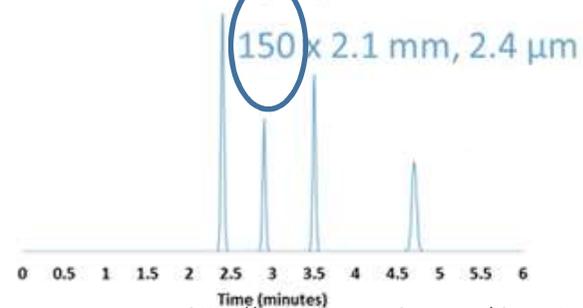
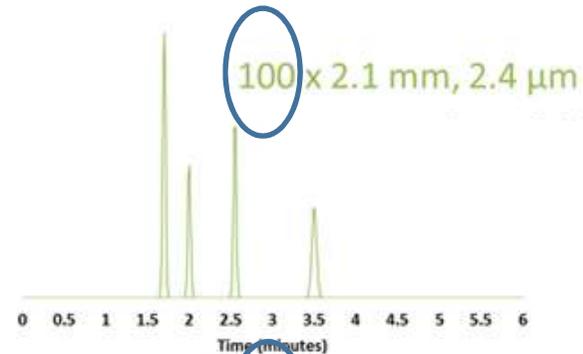
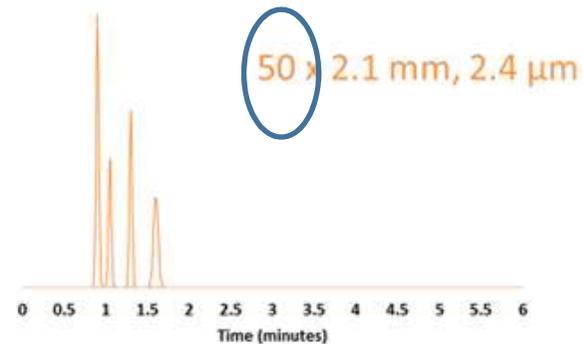
Le facteur de rétention est indépendant du débit et de la longueur (L) de colonne.

Mais t_R dépend de k et de la vitesse u de la phase mobile dans la colonne (ou du débit D)

$$t_R = t_0(k + 1) = \frac{L}{u}(k + 1)$$

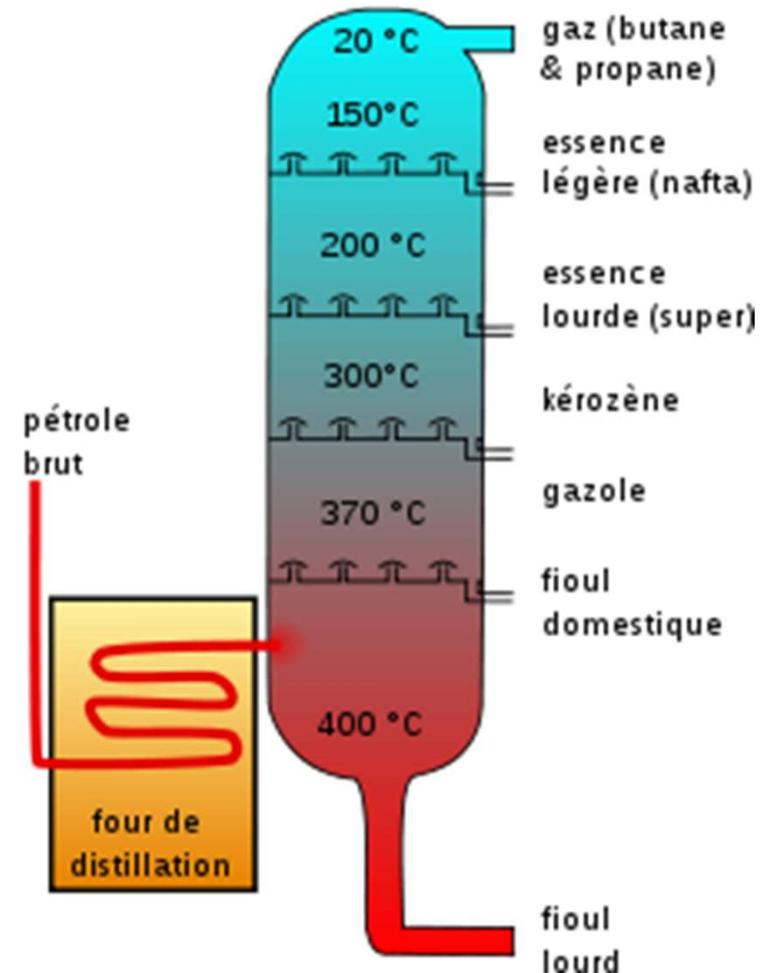
Longueur de colonne et temps de rétention.

- $t_R = t_0(k + 1) = \frac{L}{u}(k + 1)$
- Si la phase mobile et la phase stationnaire sont toutes deux conservées
 - K ne varie pas
 - V_s/V_0 est constant
 - k est constant
- t_0 augmente avec L
- et t_R avec t_0
- Augmenter la vitesse u (le débit D) diminue t_0 et t_R



Efficacité de la colonne: nombre de plateaux théoriques

- Analogie avec la distillation
- Plus une colonne (de distillation) a de plateaux plus elle permet d'isoler de fractions
- Plus une colonne chromatographique est efficace, plus elle possède de plateaux théoriques
 - Et plus les pics sont fins



Calcul du nombre de plateaux théoriques

- En assimilant le pic à une gaussienne,

$$N = t_r^2 / \sigma^2$$

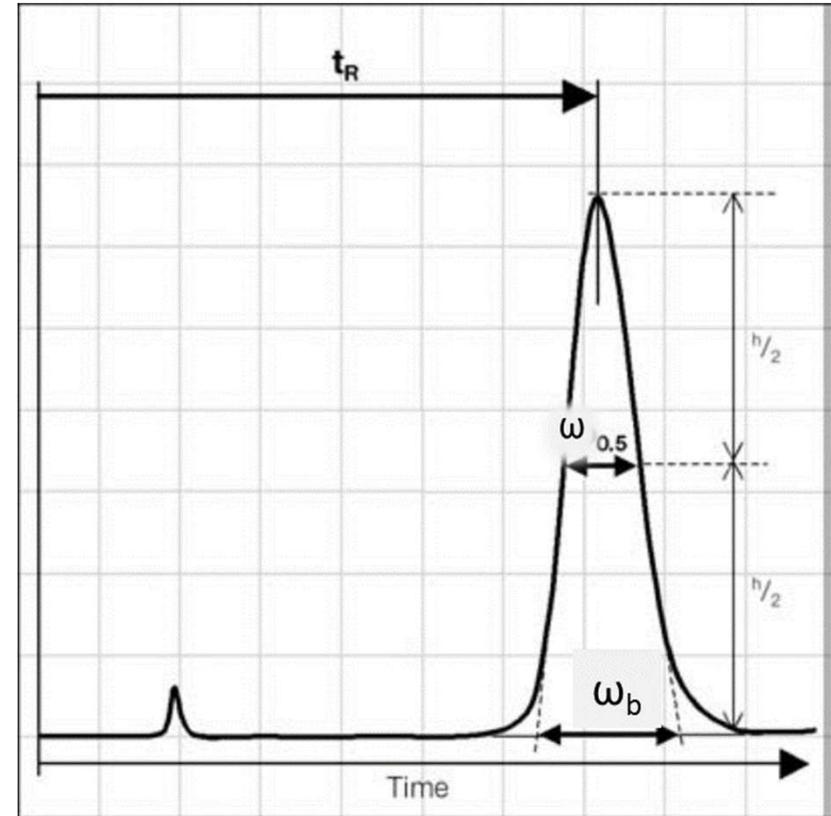
σ^2 est la variance de la gaussienne

La largeur ω à 50% de h $\omega_{0.50} = 2,354\sigma$

La largeur à la base, entre les 2 tangentes aux cotés du pic, $\omega_b = 4\sigma$

- D'où les formules usuelles:

$$N = 5,54 \frac{t_r^2}{\omega_{0.5}^2} \text{ et } N = 16 \frac{t_r^2}{\omega_b^2}$$

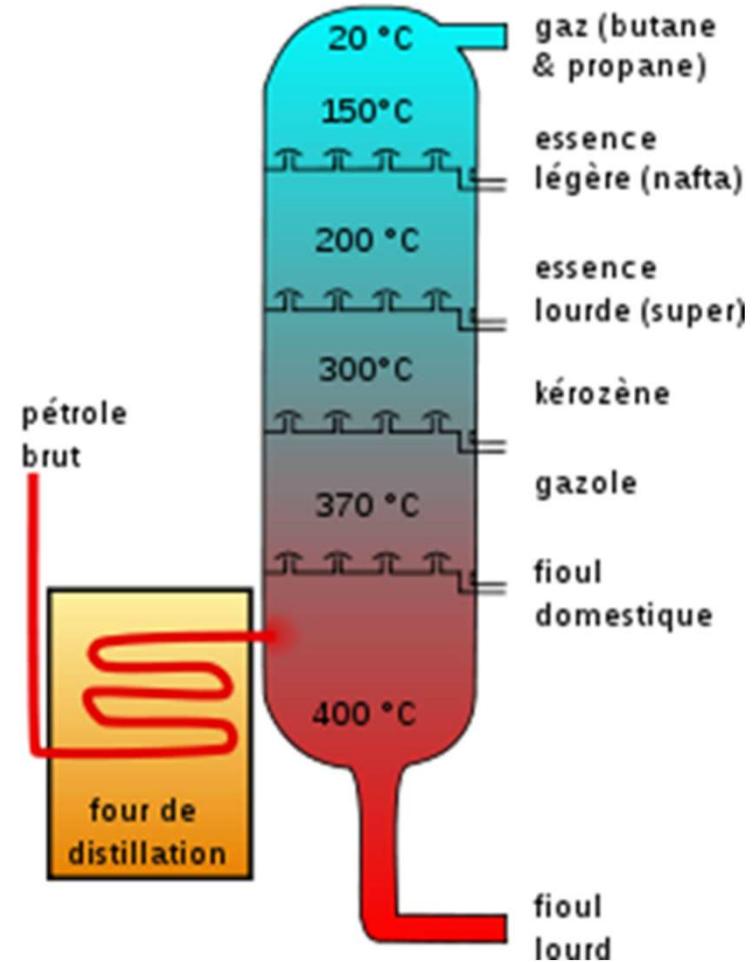


Attention: t_r est usuellement mesuré en minutes (ou secondes), il faudra exprimer la largeur dans la même unité

2022/2023

Hauteur égale à un plateau théorique

- $HEPT = \frac{L}{N}$
- Exprimée en unité de longueur, est de l'ordre du μ
- Ordre de grandeur 2 à 3 fois le diamètre des particules de la phase stationnaire
- Soit $HEPT = 10 \sim 15 \mu\text{m}$ pour une colonne remplie en $5 \mu\text{m}$



La séparation: sélectivité et résolution

2022/2023

UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie

$$\alpha_{1,2} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{k_2}{k_1}$$

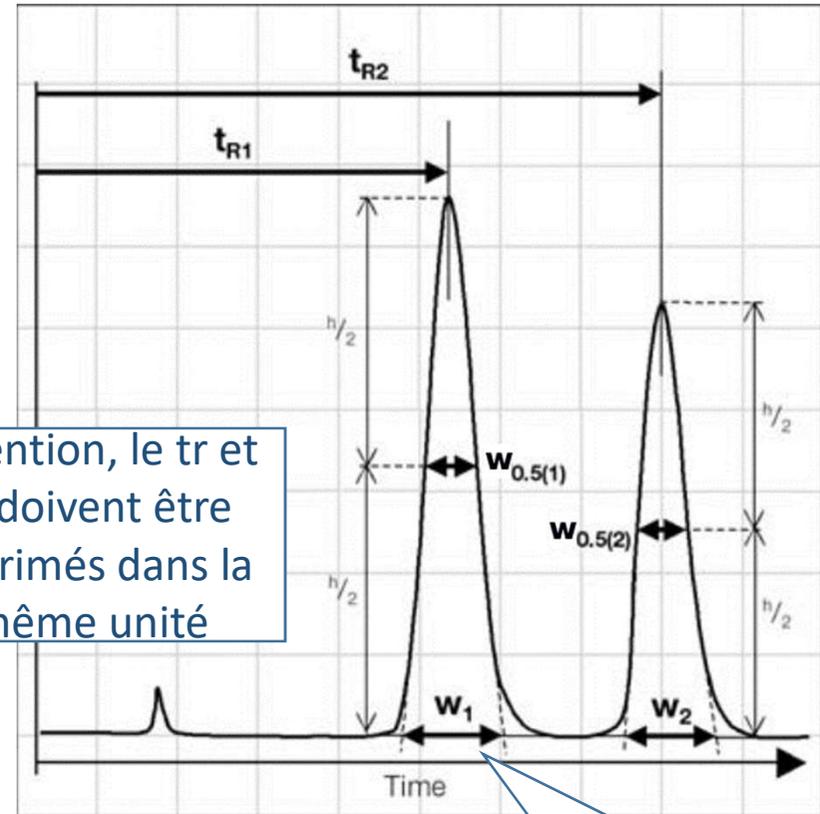
La sélectivité α exprime la distribution des pics sur le chromatogramme

$$Rs_{1,2} = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

La Résolution R_s exprime la séparation entre deux pics voisins

$R_s = 1$ correspond à 2 pics qui se recouvrent de 2% en surface

On exige en général $R_s \geq 1,5$ pour une séparation jusqu'à la ligne de base.



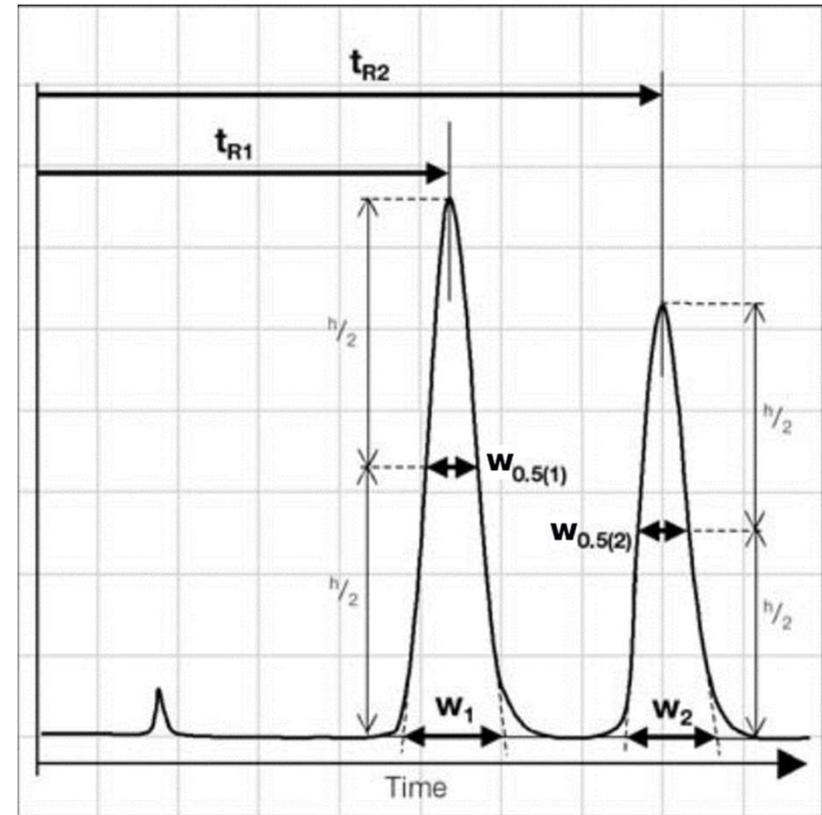
Attention, le tr et w doivent être exprimés dans la même unité

w est mesuré entre les tangentes

Résolution. Autre expression

$$Rs_{1,2} = 1,177 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_{0.5(1)} + \omega_{0.5(2)}}$$

- Il est parfois plus pratique de mesurer les largeurs de pics à mi-hauteur (notés $w_{0.5}$ ou w_h ou $w_{1/2}$)
- Le coefficient 1.177 tient compte de la proportionnalité entre w et $w_{0.5}$



La mise au point de la séparation

Une formule approchée de R_s peut être développée pour 2 pics de largeur similaire et de rétention proche:

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k}{(k + 1)} \sqrt{N}$$

Pour améliorer une séparation, on peut jouer

1- sur la rétention (terme k)

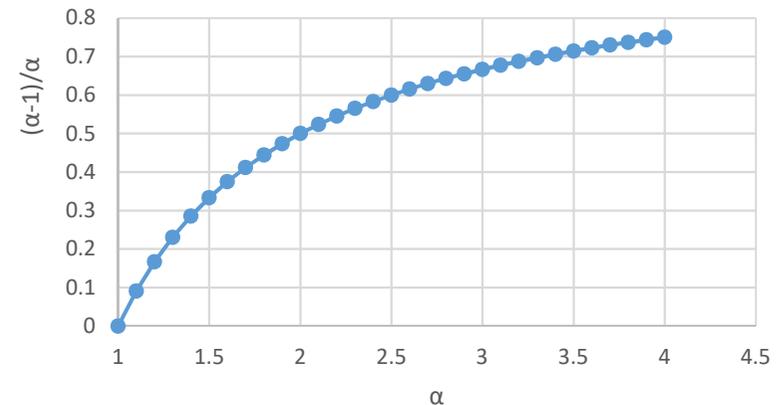
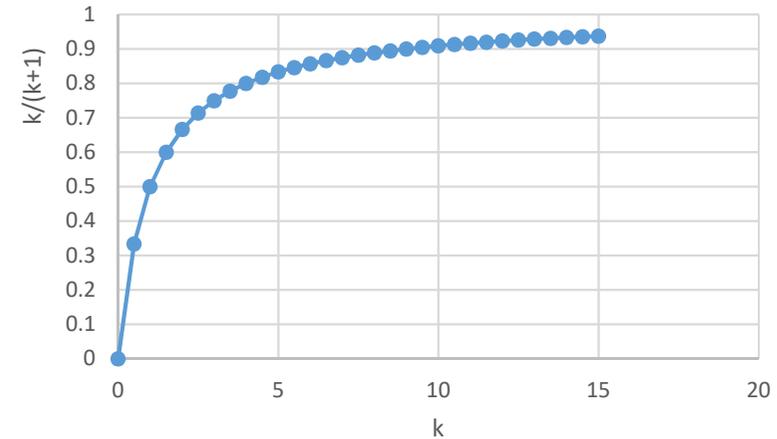
C'est ce que l'on fait en premier en jouant sur la polarité de la phase mobile. On s'arrête à $k=10$ pour le dernier pic car ce n'est plus intéressant après.

2- sur le sélectivité (terme α)

Si deux pics sont co-élus (zéro séparation) il faut changer la nature des interactions avec la phase mobile (nature des solvants, pH si possible) et/ou la phase stationnaire (changement de colonne)

3- sur l'efficacité

Mais c'est contraignant car en augmentant L on augmente t_0 , la durée du chromatogramme et la pression pour gagner racine(N).



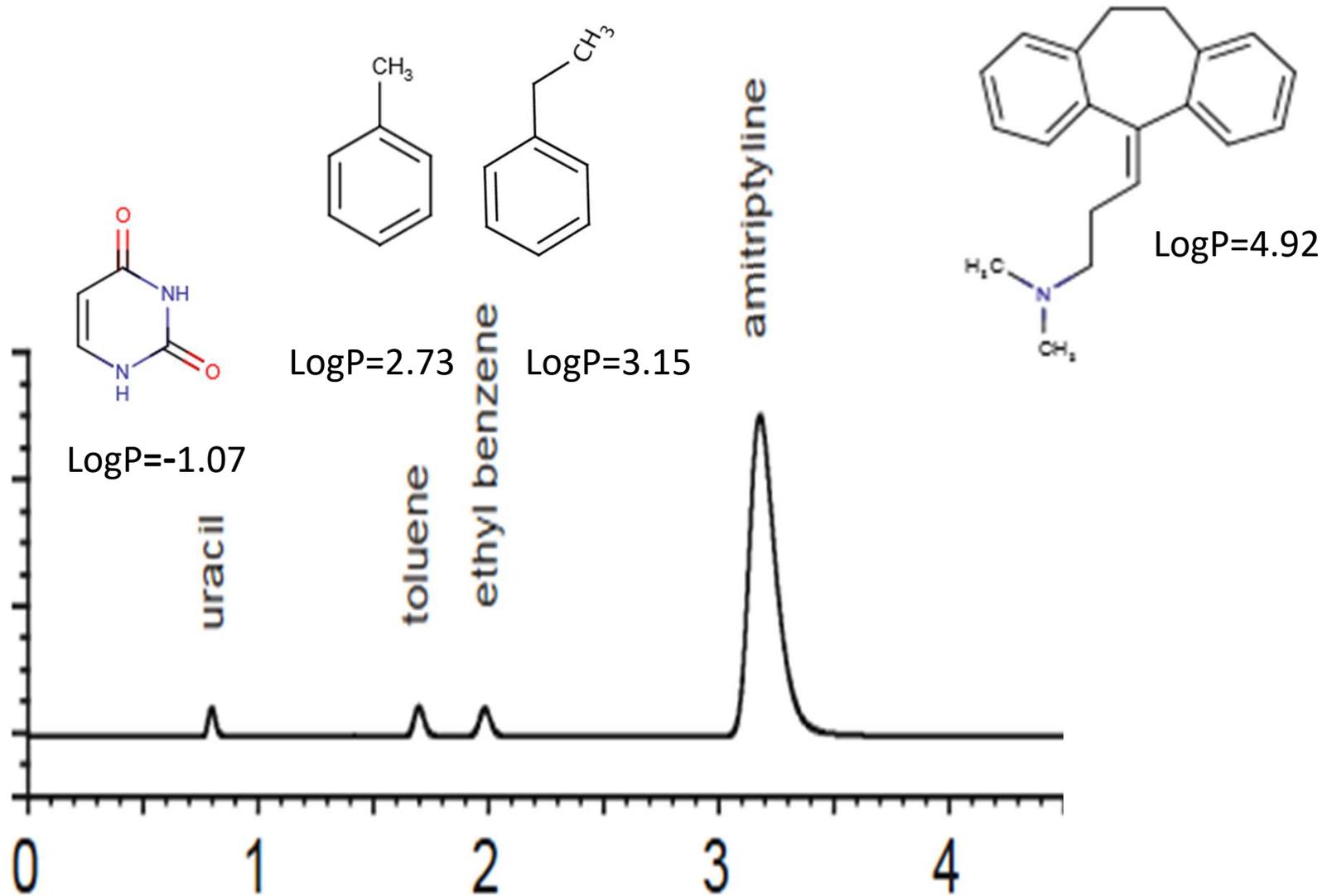
1.2.5 CHLP à polarité de phase inversée

Ou RP-HPLC pour reversed phase high performance liquid chromatography

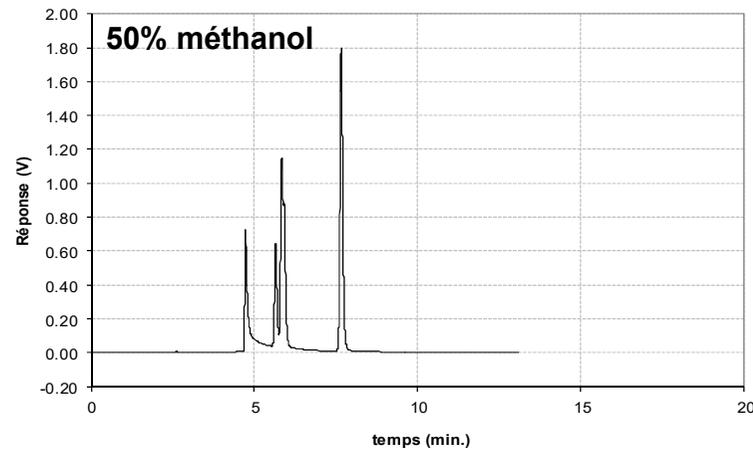
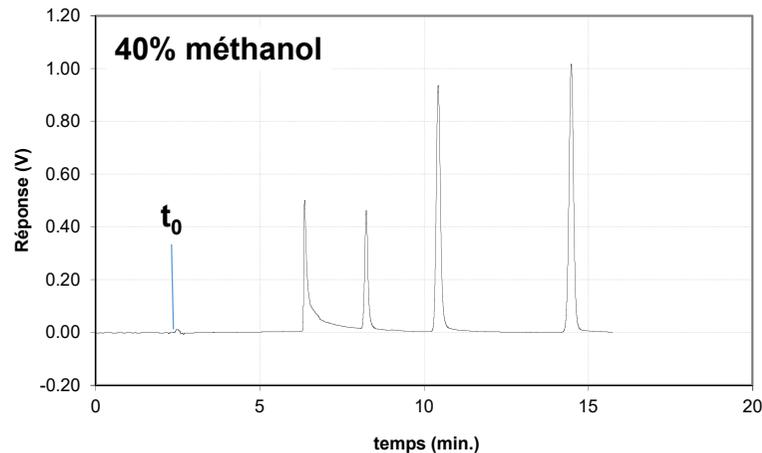
CLHP à polarité de phase inversée

- Représente 70% des applications de la CLHP
- Applicable à tout analyte qui présente une part de caractère hydrophobe (petites et macro molécules).
- Vaste choix de système de détection:
 - Basique (95% des applications): spectrométrie UV/Vis, Fluorescence, conductivité, réfractométrie
 - Technologique: Spectrométrie de masse
- Vaste domaine d'applications: biologie, études cliniques, contrôle pharmaceutique...

RP-HPLC ordre d'élution des analytes

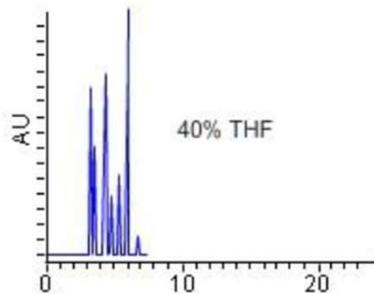
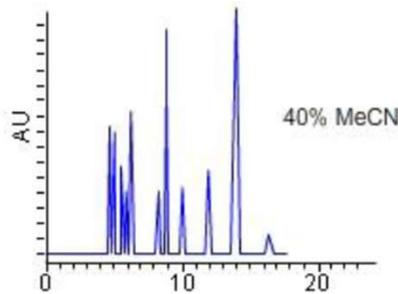
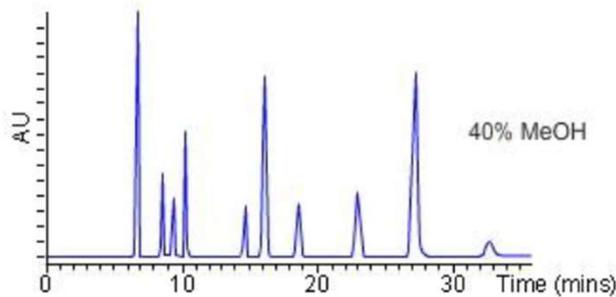


Effet de la composition de la phase mobile (1) force éluante



- 1^{ère} étape de mise au point: la polarité ou « force éluante » de la phase mobile
- Augmenter la part de solvant organique diminue la polarité de la phase mobile et diminue la rétention
- En règle générale:
 - Augmenter de 10% la part de solvant organique (au détriment de l'eau) diminue la rétention d'un facteur 2.
- On joue sur le terme k de l'équation de la résolution et on cherche à obtenir
 - le premier pic à $k=1$ (juste retenu)
 - le dernier à $k=10$ (pas trop retenu)

Effet de la composition de la phase mobile (1) force éluante



En RP-HPLC, l'eau est le solvant faible (pas d'éluion) la force éluante des trois solvants classiques est THF > MeCN > MeOH

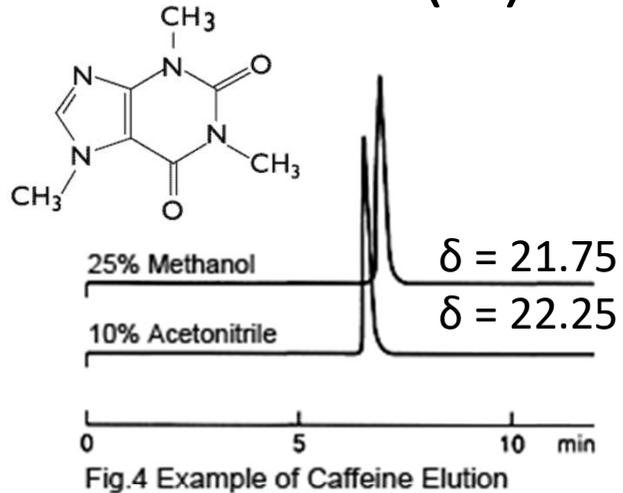
Calcul de la polarité de la phase mobile au moyen du paramètre δ d' Hildebrand*

	Eau	MeOH	MeCN	THF
δ	23.4	14.5	11.9	9.1

$$\delta_{A,B} = \frac{V_A}{V_A + V_B} \delta_A + \frac{V_B}{V_A + V_B} \delta_B$$

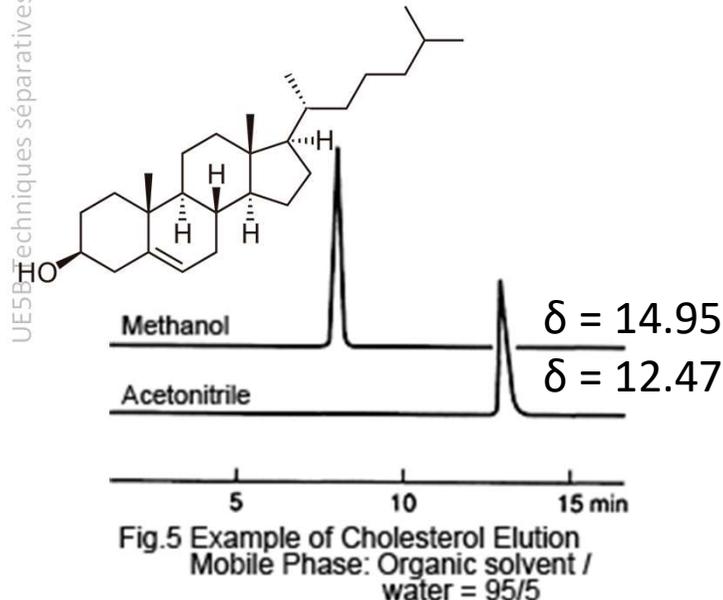
	40% MeOH	40% MeCN	40% THF
$\delta_{A,B}$	20.2	19.6	18.4

Effet de la composition de la phase mobile (2) Sélectivité des solvants



- La polarité (δ ou P') est une notion globale

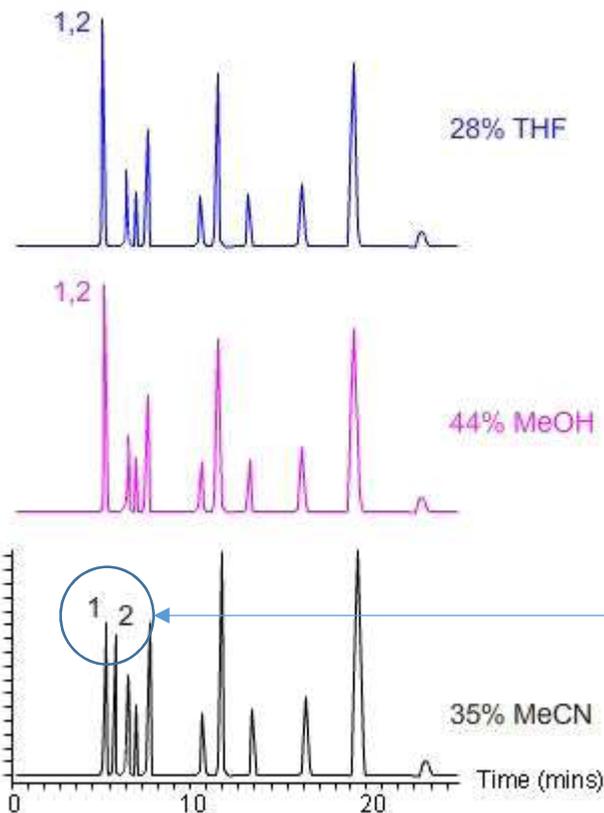
← il ne faut pas raisonner sur de faibles différences qui n'ont pas de sens en pratique



← Il faut aussi prendre en compte la possibilités d'interactions soluté-solvant privilégiées

(la règle THF > MeCN > MeOH n'est pas absolue)

Effet de la composition de la phase mobile (2) Sélectivité des solvants



Phases mobiles iso-éluotropes, aboutissent à la même durée d'analyse

$$\delta_{org,eau} = \frac{V_{org}}{V_{org} + V_{eau}} \delta_{org} + \frac{V_{eau}}{V_{org} + V_{eau}} \delta_{eau}$$

En posant $\varphi_{org} = \frac{V_{org}}{V_{org} + V_{eau}}$ et $\varphi_{org} = 1 - \varphi_{eau}$

On peut calculer la proportion d'un autre solvant à utiliser pour retrouver la même force éluante (ou polarité) de la phase mobile.

$$\varphi_{org} = \frac{\delta_{org,eau} - \delta_{eau}}{\delta_{org} - \delta_{eau}}$$

La paire de pics 1,2 est uniquement séparée quand on utilise MeCN

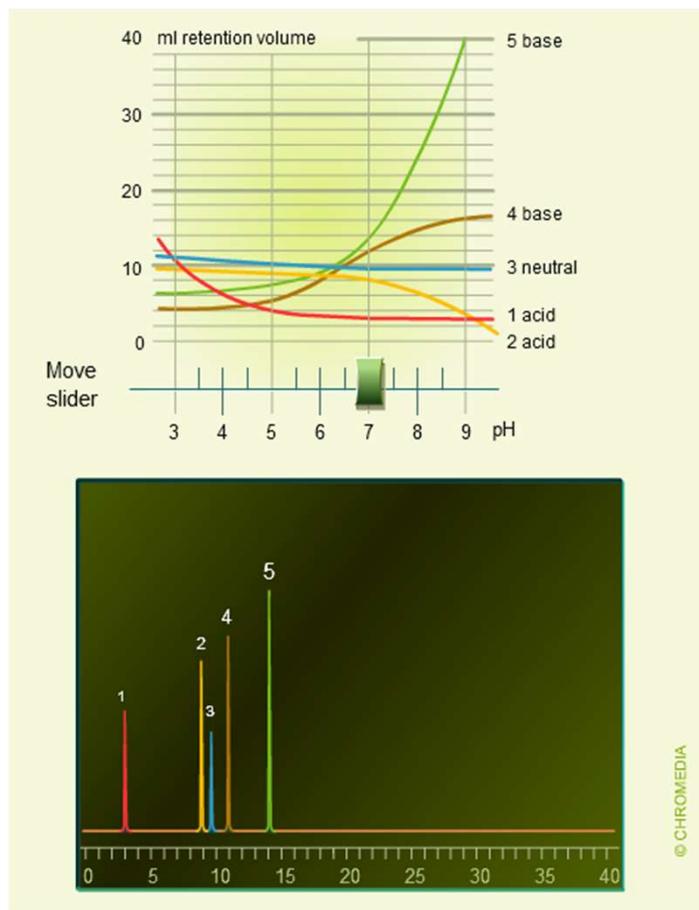
Exemple $\delta_{28\%THF} = 19.4$

$$\varphi_{MeOH} = \frac{19.4 - \delta_{eau}}{\delta_{MeOH} - \delta_{eau}} = 0.44$$

$$\varphi_{MeCN} = \frac{19.4 - \delta_{eau}}{\delta_{MeCN} - \delta_{eau}} = 0.35$$

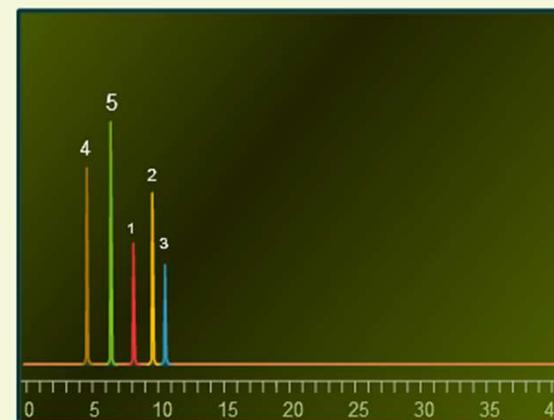
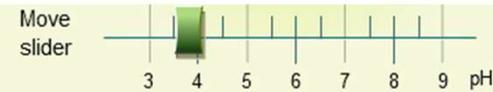
Intérêt: explorer les différences de sélectivité des solvants sans recommencer la mise au point de la force éluante

Effet de la composition de la phase mobile (3) utilisation de tampons



$AH \rightleftharpoons A^- + H^+$ à $pH > pK_a$ les acides organiques sont ionisés et hydrophiles (pics 1 et 2) donc peu ou non retenus

$BH^+ \rightleftharpoons B + H^+$ les bases organiques sont ionisées à pH acide (pic 4 et 5)



pH = 3.7
augmentation de la rétention des acides, diminution de celle des bases

Modifier le pH de la phase aqueuse permet de modifier finement la sélectivité

Effet de la composition de la phase mobile (3) utilisation de tampons

Buffer	pKa (25°C)	Useful pH Range
TFA	0.5	<1.5
Sulfonate	1.8	<1-2.8
Phosphate	2.1	1.1-3.1
Chloroacetate	2.9	1.9-3.9
Formate	3.8	2.8-4.8
Acetate	4.8	3.8-5.8
Sulfonate	6.9	5.9-7.9
Phosphate	7.2	6.2-8.2
Ammonia	9.2	8.2-10.2
Phosphate	12.3	11.3-13.3

- L'acide trifluoroacétique (TFA) est utilisé dans l'analyse des peptides et protéines car compatible avec la détection UV aux faibles longueurs d'ondes
- Le tampon phosphate est très utilisé car transparent dans l'UV
- Acétate et formiate sont utilisés en spectrométrie de masse (sont volatils).
- Le domaine de stabilité de la silice greffée est compris entre 2.5 et 8.0
- Le tampon utilisé doit l'être dans un domaine de $\text{pH} = \text{pKa} \pm 1$
- Le tampon doit être compatible avec la détection

1.2.6 Chromatographie en couche mince sur gel de silice

Principe

- Plaque: support en verre ou aluminium recouvert de silice vierge (en général) placée dans une cuve fermée au contact de la phase mobile

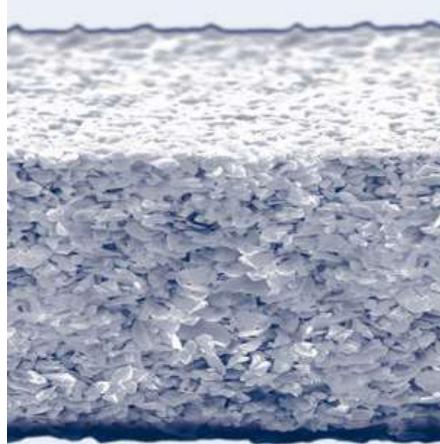
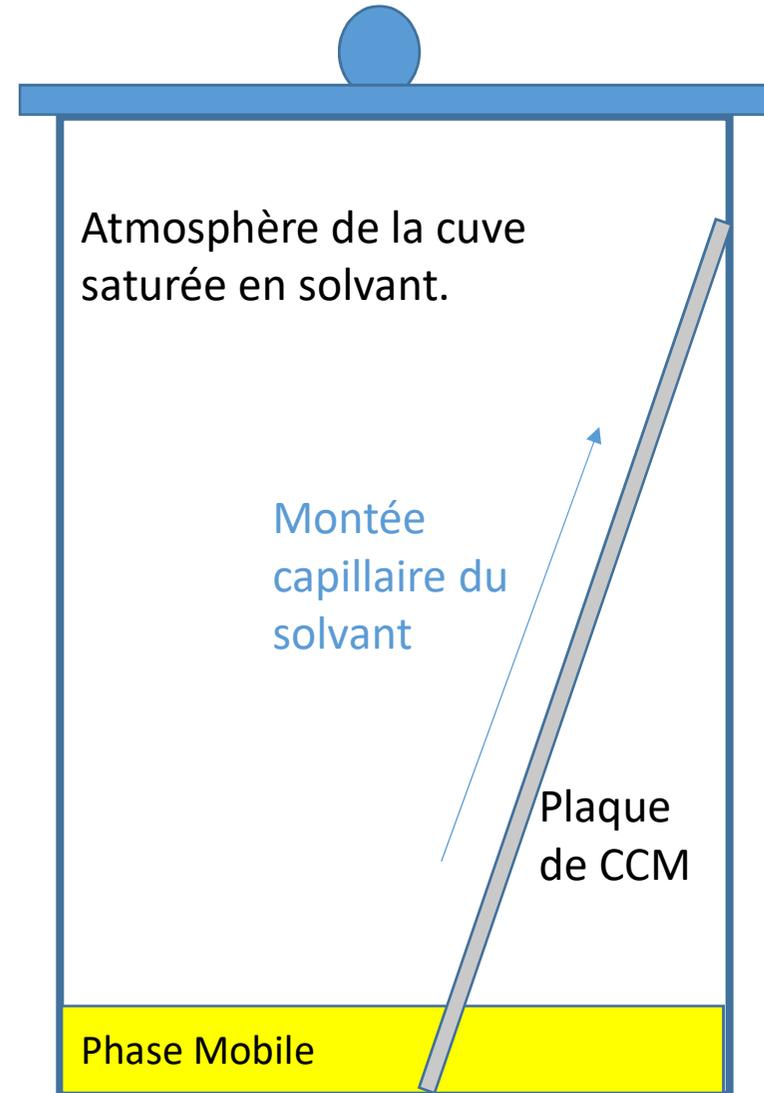


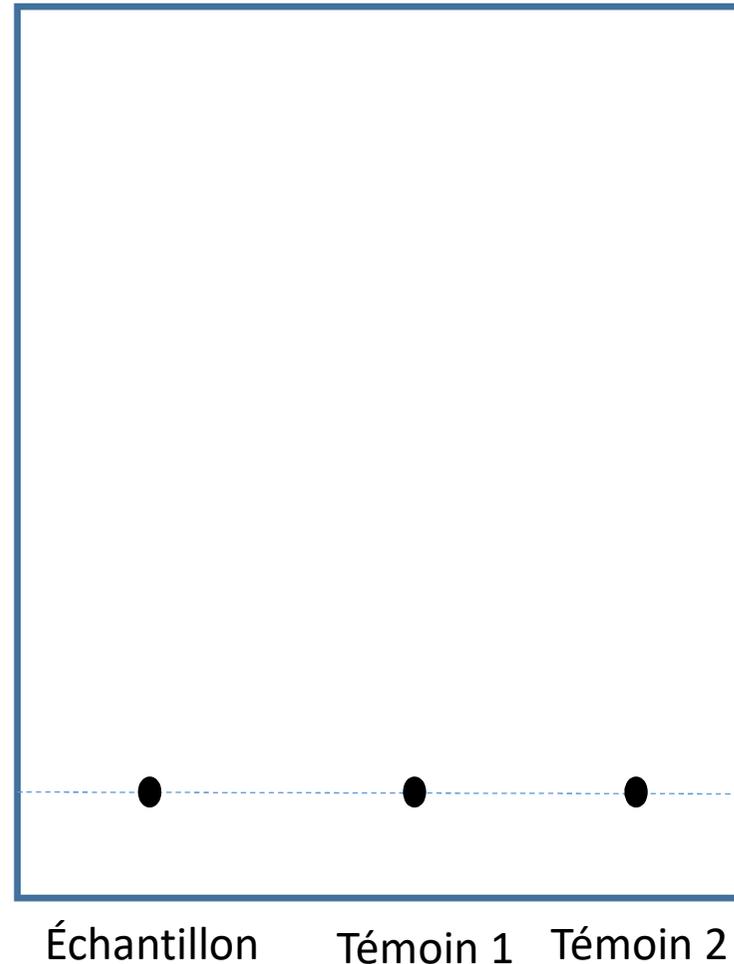
Illustration : <https://www.carlroth.com>

- Phase mobile: mélange de solvants organiques
- Chromatographie d'adsorption (en général)



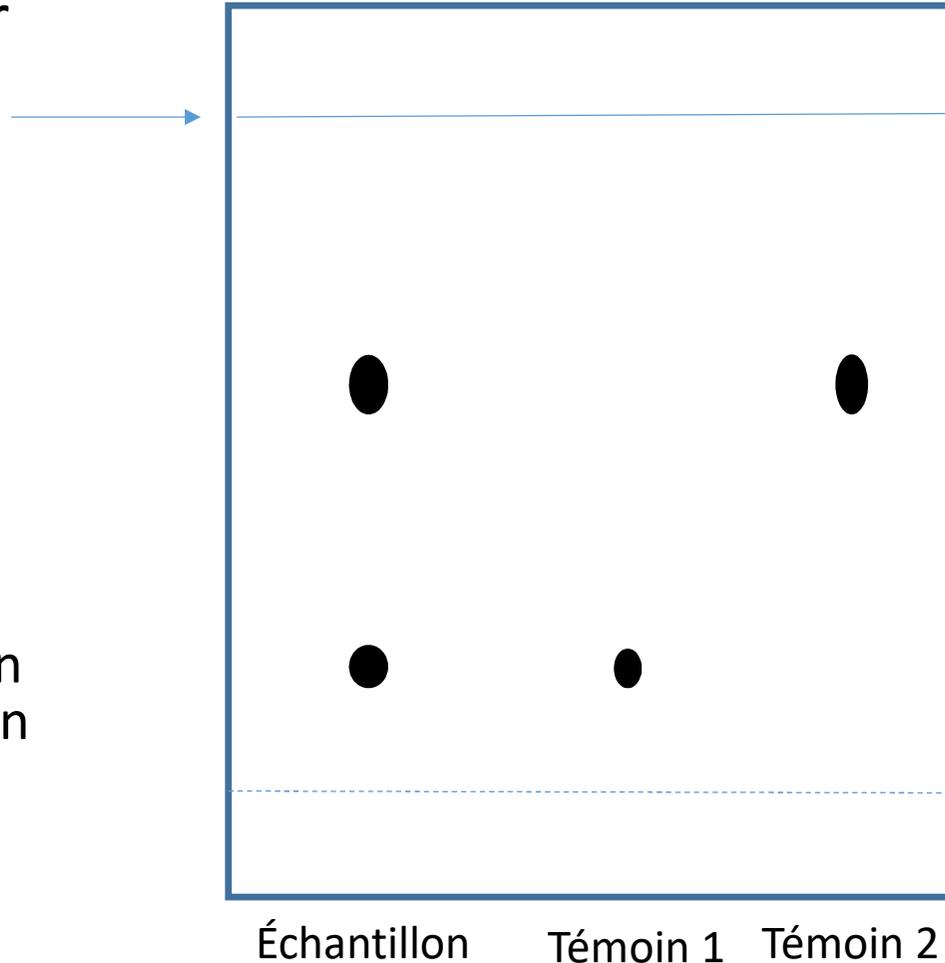
CCM dépôt

- Dépôt quelques μl de solution du la ligne de dépôt tracée sur la plaque
- Dépôt le plus ponctuel possible
- Le solvant ne doit pas submerger les dépôts



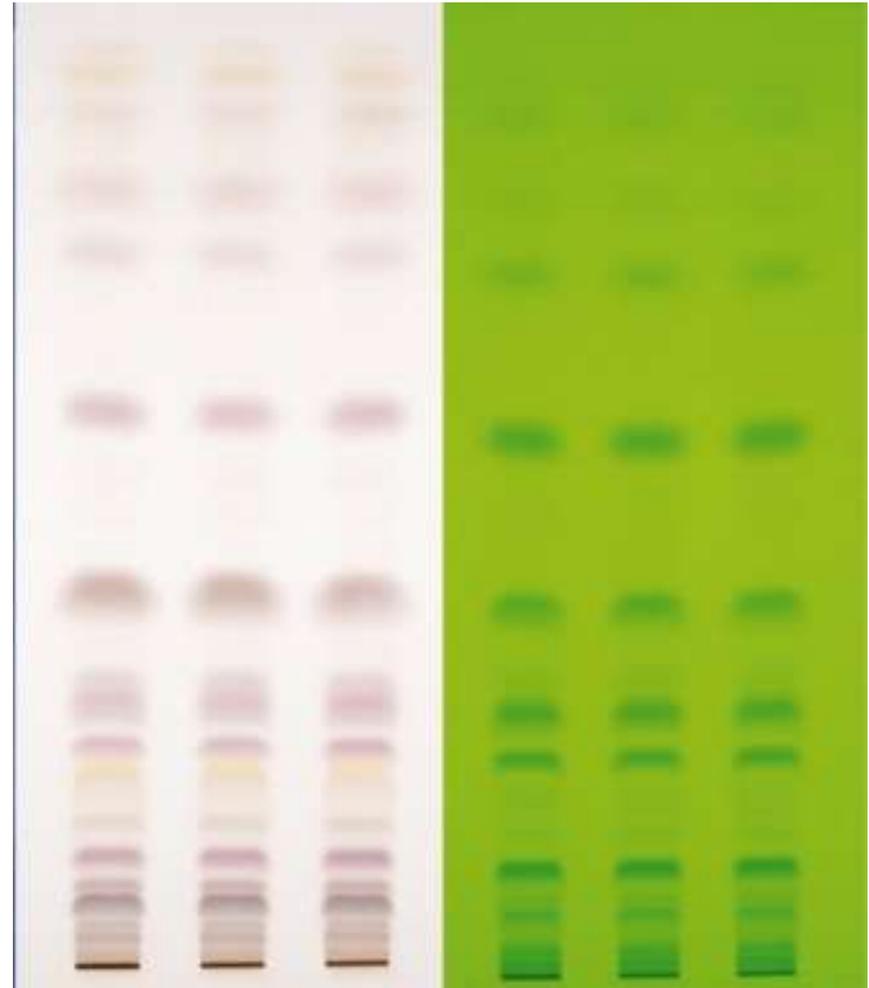
CCM migration et révélation

- Sortir la plaque et noter la position du front de solvant
- Les spots ne sont pas forcément visibles
 - Ils le sont par fluorescence indirecte sous lampe UV
 - Ou après la pulvérisation d'un réactif de révélation (plus de 300 réactifs décrits)



CCM migration et révélation

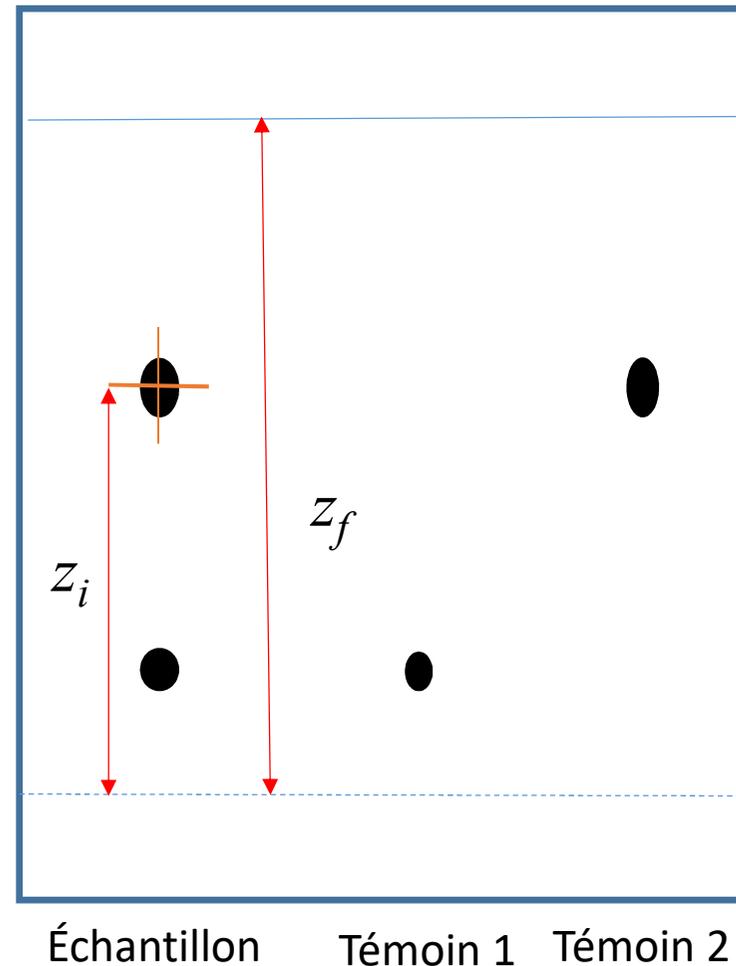
- Sortir la plaque et noter la position du front de solvant
- Les spots ne sont pas forcément visibles
 - Ils le sont par fluorescence indirecte sous lampe UV (la plaque contient un composé fluorescent)
 - Ou après la pulvérisation d'un réactif de révélation spécifique ou non (plus de 300 réactifs décrits)



CCM mesure du rapport frontal

$$Rf_i = \frac{z_i}{z_f}$$

Rf du composé « i », rapport entre la distance z_i mesurée entre le centre du spot de « i » et la ligne de dépôt et z_f distance entre la ligne de dépôt et le front de solvant.



Applications

Contrôle du médicament

- Pharmacopée Européenne
 - Méthode d'identification par comparaison des R_f (substance testée vs témoin) et révélation spécifique

Méthode séparative simple

- Suivi de synthèse
- Screening phytochimique

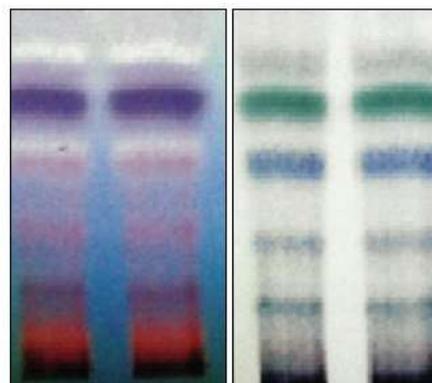


FIG. 2: TLC PROFILE OF THE PETROLEUM ETHER FRACTION OF LEAF AFTER DERIVATIZATION

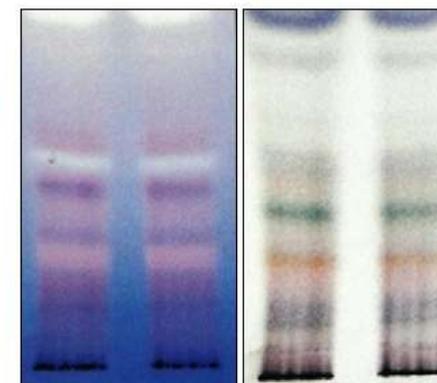


FIG. 3: TLC PROFILE OF THE CHLOROFORM FRACTION OF LEAF AFTER DERIVATIZATION

PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND THIN LAYER CHROMATOGRAPHY OF THE EXTRACTS OF *EXCOECARIA AGALLOCHA* L.

M. Deepa and C. K. Padmaja

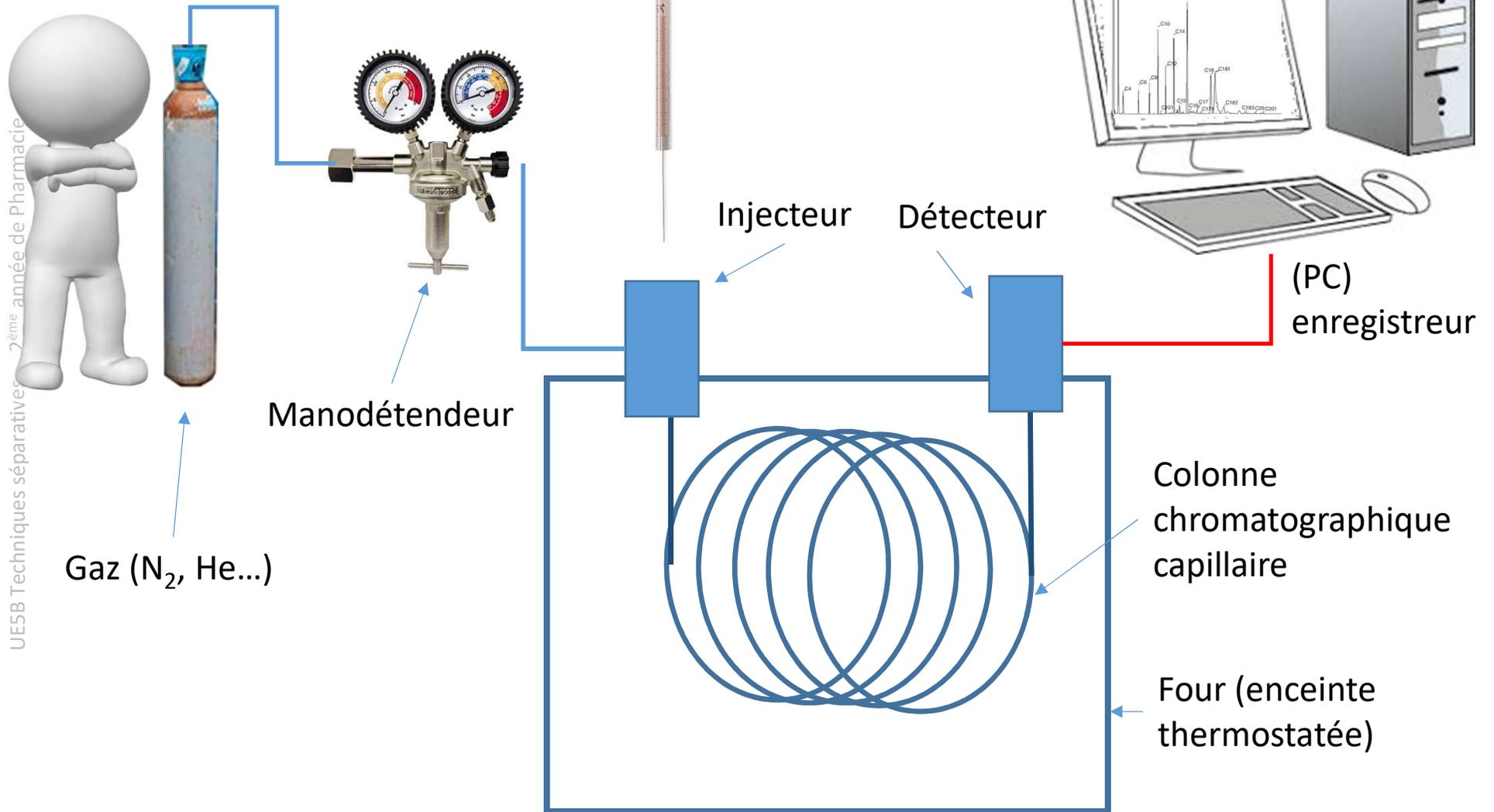
International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research

1.3 Chromatographie en phase gazeuse capillaire

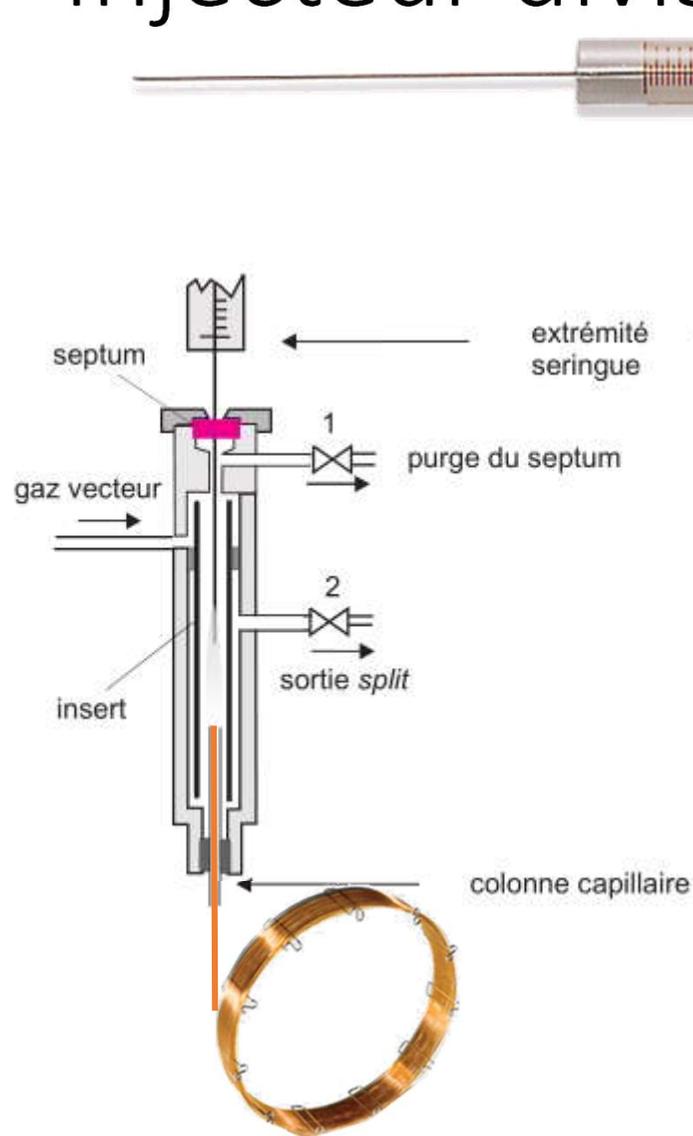
Champ d'application

- S'adresse aux composés volatils (jusqu'à 200-300°C)
- Technique très efficace ($N > 100\ 000$)
- La « phase mobile » est un gaz qui n'interagit pas avec les analytes on parle de gaz vecteur

Instrumentation

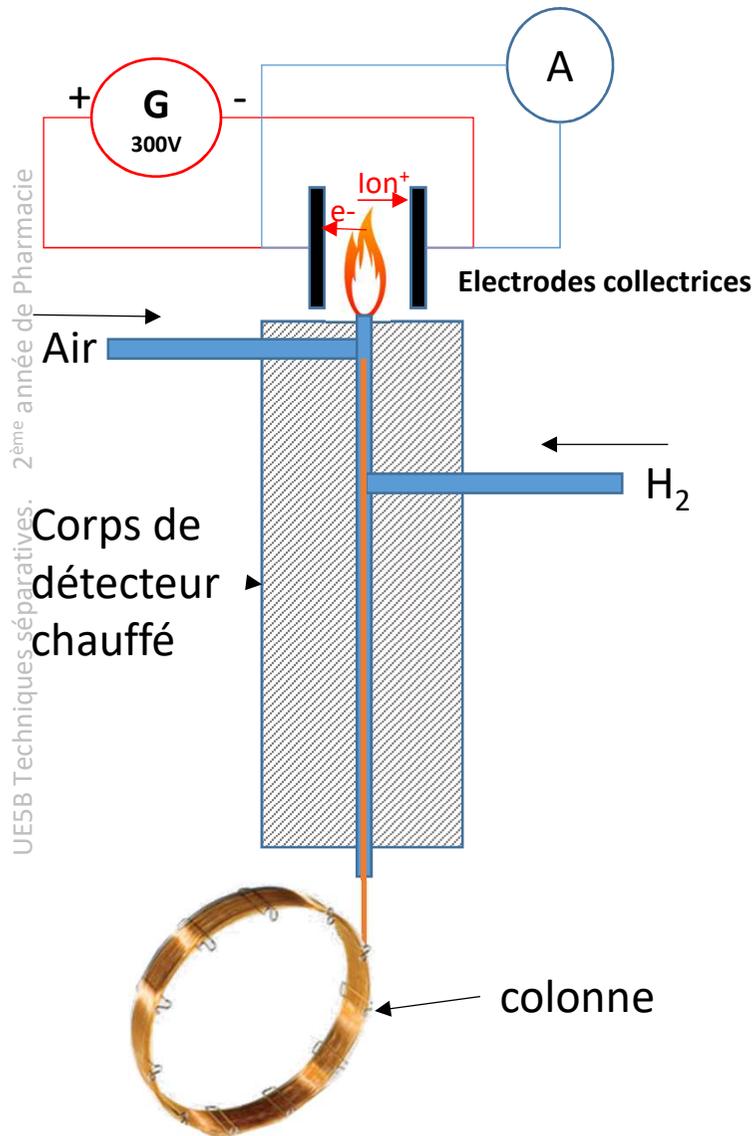


Injecteur diviseur



- La solution à analyser est injectée à l'aide d'une seringue en perçant un septum en caoutchouc (système manuel ou automatique)
- Le volume injecté est de l'ordre du μl
- Le corps de l'injecteur est chauffé à 250°C (environ)
- La volatilisation de l'échantillon (solvant+analyte) est considérée immédiate
- Après division 1 à 2 % (soit quelques nl) sont transférés dans la colonne

Détecteur à ionisation de flamme



Principe

- Une flamme d'hydrogène (réductrice) brûle entre deux électrodes
- Les composés séparés par la colonne sont injectés dans la flamme
- La présence de carbone dans les composés génère la formation d'ions carbone de charge positive qui modifient le courant entre les deux électrodes.
- Le courant de quelques pA est amplifié pour donner le signal du détecteur
- Le corps de l'injecteur est chauffé à 250°C (environ) pour éviter la condensation des composés en sortie de colonne

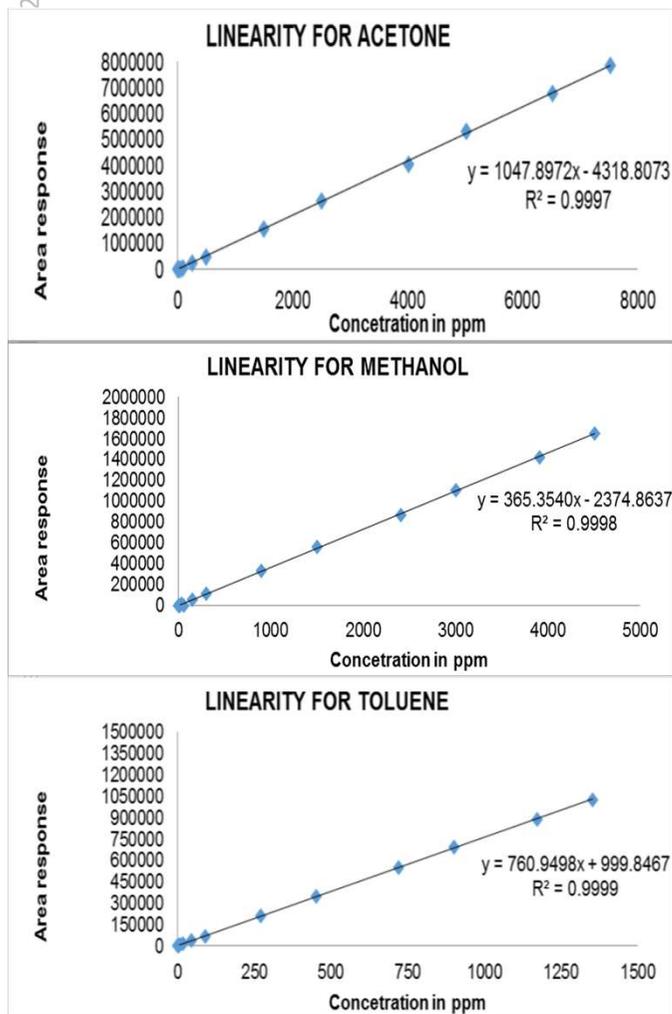
Diapositive 88

PC1

22/09/2023

Pierre Chaminade, 9/22/2023

Détecteur à ionisation de flamme



Performances

- Quasi universel: répond en fonction du nombre de carbone dans la molécule
- Domaine de linéarité étendu: 10^7

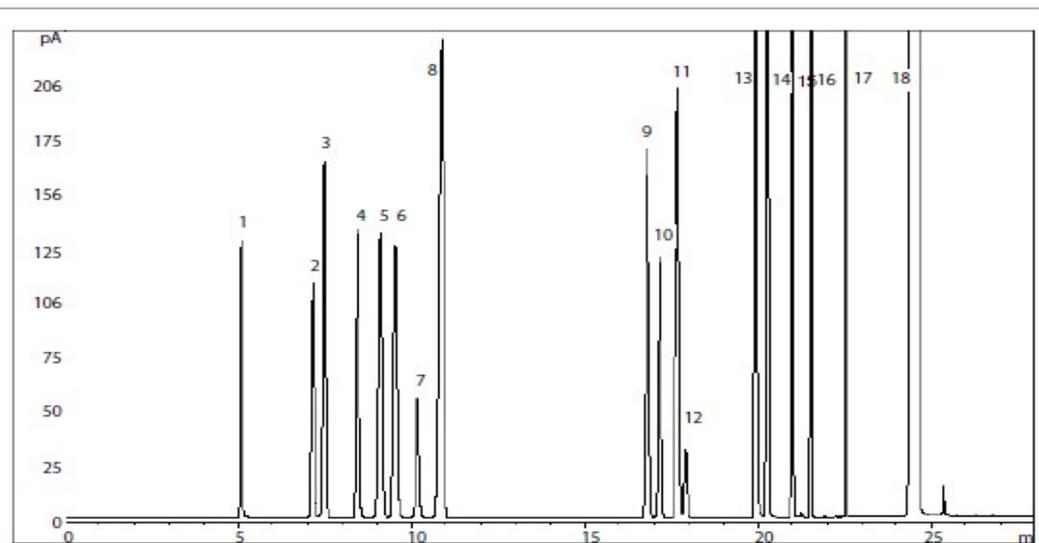
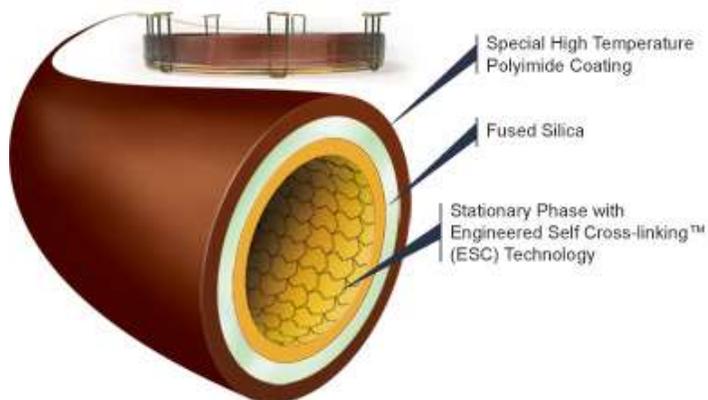
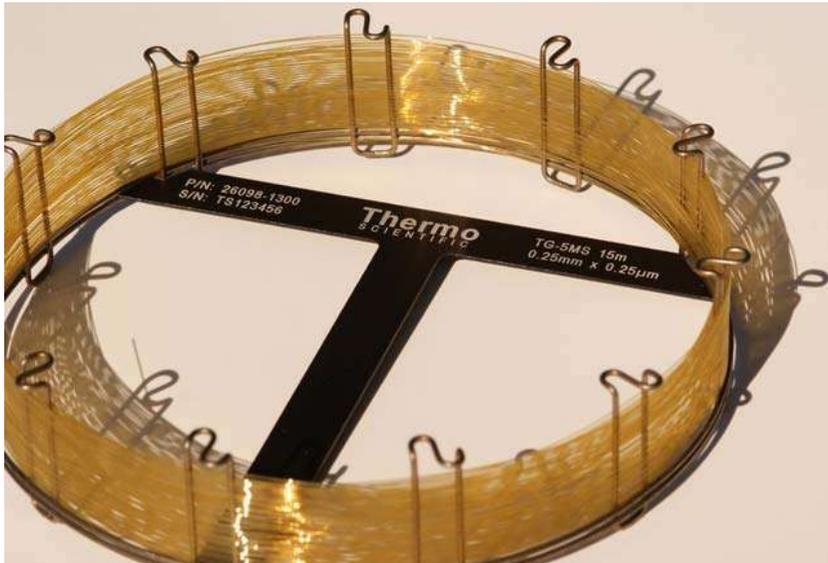


Figure 1: Representative GC chromatogram of residual solvents. 1: methanol; 2: ethanol; 3: ether; 4: acetone; 5: isopropanol; 6: acetonitrile; 7: methylene chloride; 8: t-butanol; 9: methyl ethyl ketone; 10: ethylacetate; 11: tetrahydrofuran (THF); 12: chloroform; 13: trimethylamine; 14: heptane; 15: butanol; 16: 1,4-dioxane; 17: toluene; 18: dimethyl sulfoxide (DMSO).

Colonne chromatographique



Tube capillaire de plusieurs dizaines de mètres de long (10, 20, 30) en silice fondue recouverte d'un polymère qui permet de la manipuler.

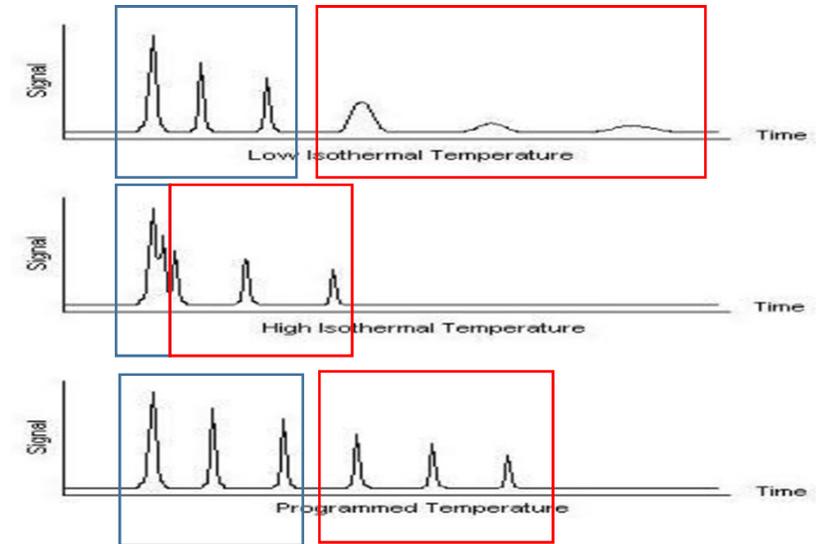
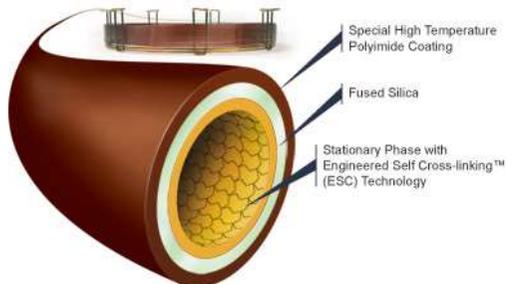
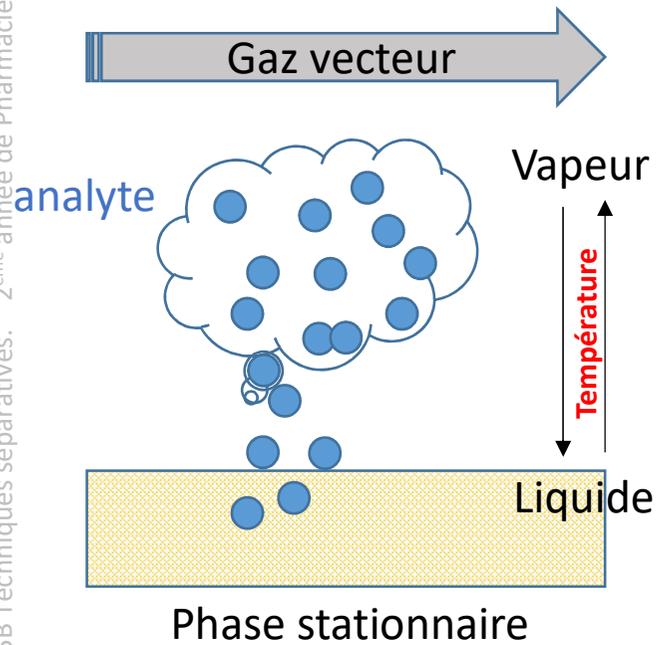
Le diamètre interne est de 0.1 à 0.5 mm.

La phase stationnaire est greffée à la surface du tube (sur les parois)

L'épaisseur du film de phase stationnaire est de 0.1 à 5 μ m

Il existe plusieurs natures de phase stationnaire.

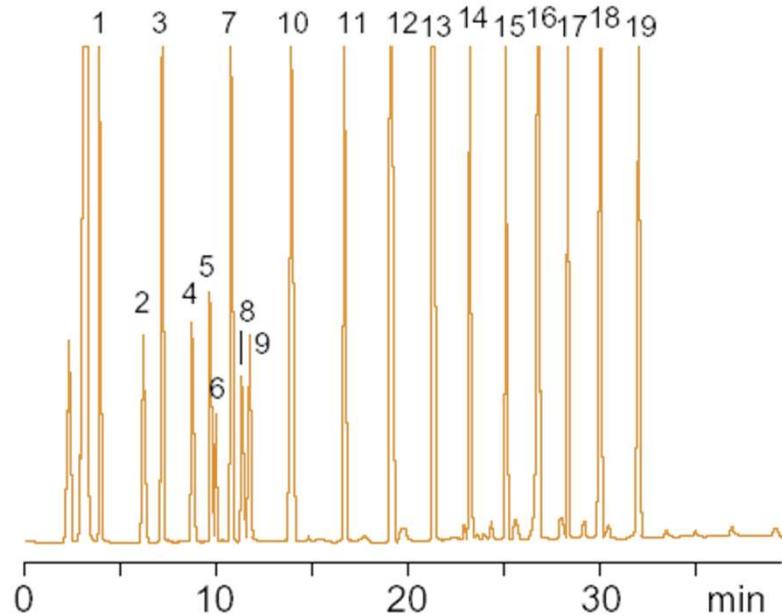
Equilibre chromatographique en CG



Augmenter la température accélère l'élution
On peut utiliser l'appareil en gradient de température
c.a.d débuter qqe degrés en dessous du point
d'ébullition du solvant (50~70°C) et augmenter
graduellement vers 200/250°C au fil du temps
Avantages:

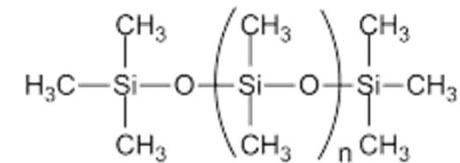
<https://image.slidesharecdn.com/gcptfinal-140416124112-phpapp02/95/gas-chromatography-by-devi-manozna-64-638.jpg?cb=1421580110>

Phase stationnaires (1)



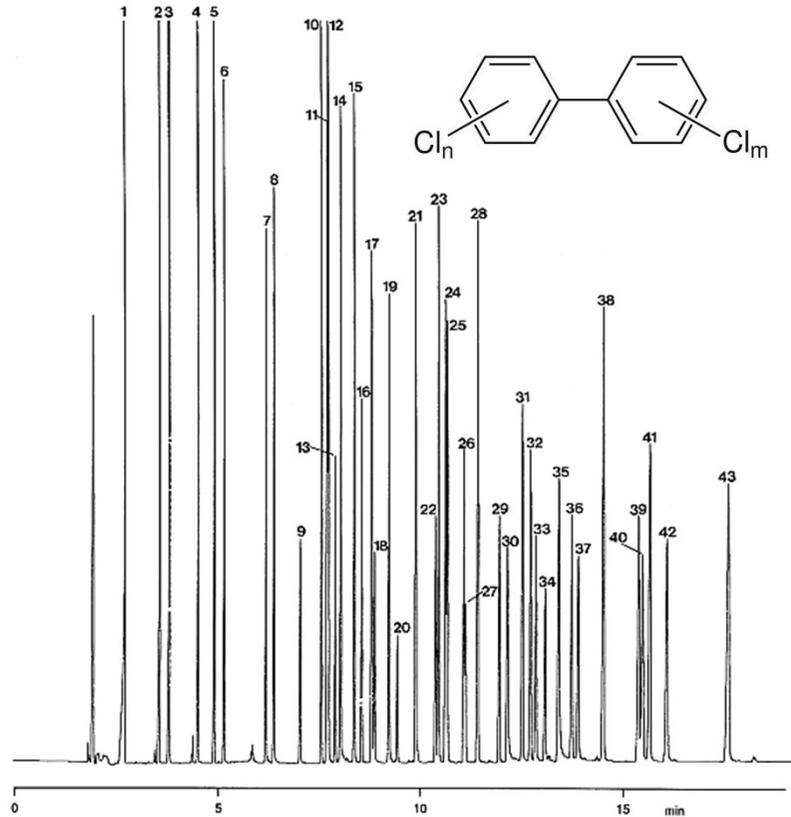
Température: 70 °C -> 320 °C (10 min),
10 °C/min -> 330 °C (5 min)

- Phase apolaire 100% polydiméthylsiloxane



- L'ordre d'éluion est fonction du point d'ébullition dans une série homologue
- Pics 1,3,7,10,... Alcanes en C8, C10, C12, C14,...
- 2. Dibutylamine Bp = 160°C
- 4. Phenylethanol Bp = 218°C
- 5. 2,6-Dichloroaniline BP= 228°C
- 6. 2,4-Dichlorophenol
- 8. Decylamine
- 9. Decanol

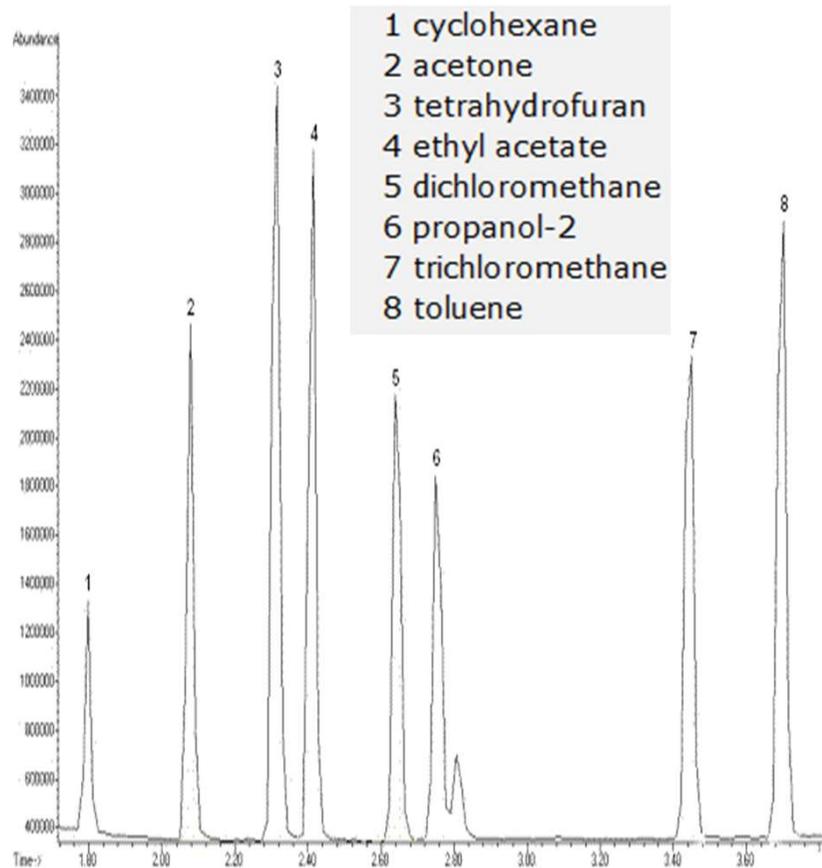
Phase stationnaire (2)



- 5% Phényl 95% PDMS
- Phase classique de l'analyse du médicament

Séparation de 43 PCB (pesticides organochlorés) sur colonne 50 m en 20 minutes

Phase stationnaire (3)



WAX, 30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m



- Carbowax (polyethyleneglycol)
- Adaptée aux recherches de trace de solvants dans les matières premières pharmaceutiques

2-Electrophorèse

Pierre Chaminade

Lip(Sys)² Chimie Analytique Pharmaceutique
Université Paris-Saclay

Florence Agnely

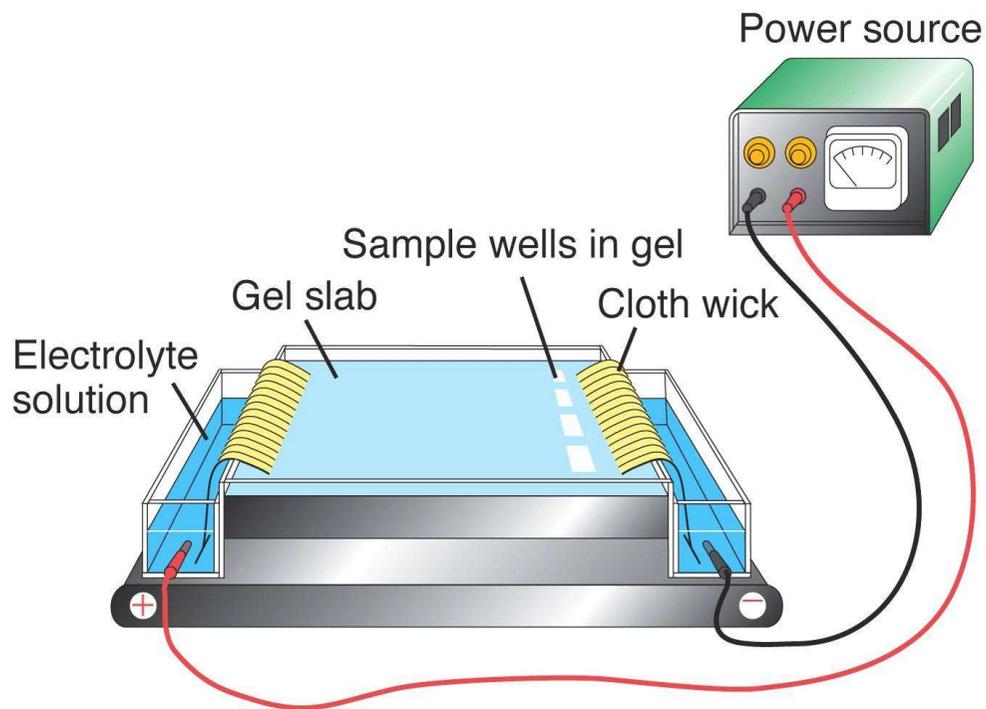
Institut Galien Paris-Saclay Physique Pharmaceutique
Université Paris-Saclay

Principe général

- Migration des espèces chargées
 - sous l'influence d'un champ électrique
 - Mises en solution dans un électrolyte/tampon
 - qui impose le pH
 - qui détermine
 - Le pourcentage d'ionisation des espèces ionisables
 - le caractère anionique ou cationique des ampholytes tels les peptides, les protéines ou les acides nucléiques
- Plusieurs méthodes
 - **Electrophorèse de zone**
 - Tampon à pH constant qui détermine le % d'ionisation des solutés
 - Focalisation isoélectrique
 - Utilise un gradient de pH
 - Isotachophorèse
 - Utilise un gradient de champ électrique
- **Deux déclinaison instrumentales : en gel et capillaire**

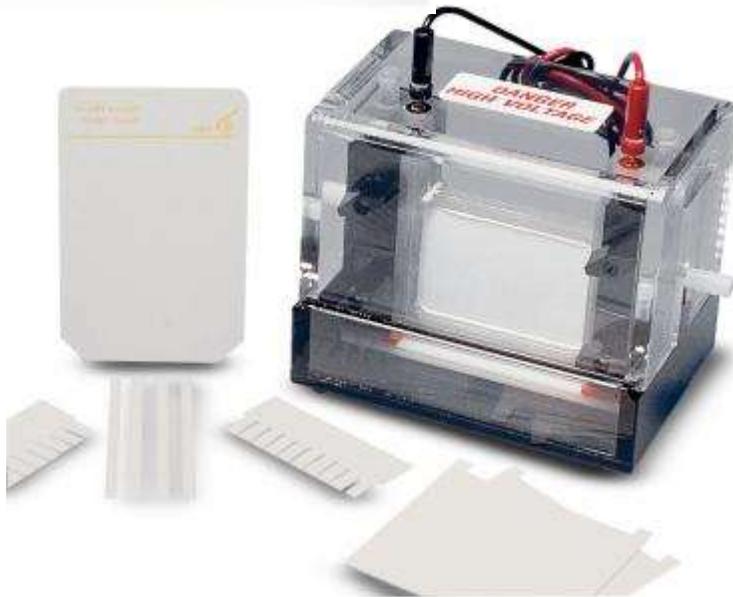
2.1 Instrumentation

Electrophorèse en gel (classique)

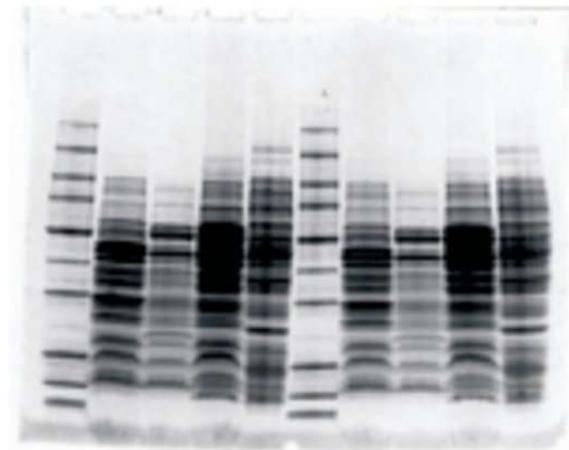


Le tampon est immobilisé sur un support
(le support est imprégné par le tampon)
L'échantillon est déposé sur le support
La migration provoque la séparation des
analytes
Une « révélation » est utilisée ensuite
pour visualiser les spots

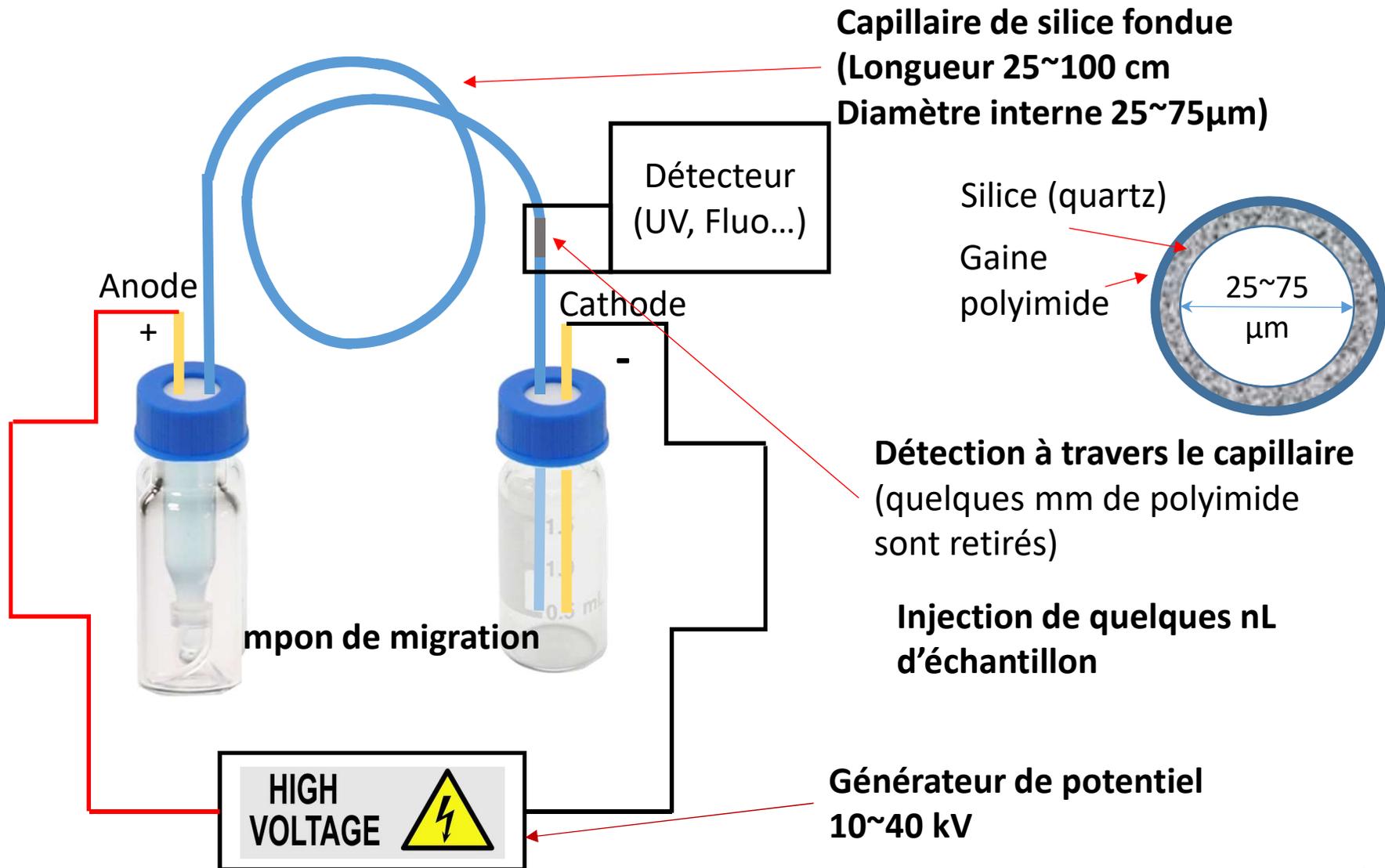
Electrophorèse en gel (classique)



Le tampon est immobilisé sur un support
(le support est imprégné par le tampon)
L'échantillon est déposé sur le support
La migration provoque la séparation des
analytes
Une « révélation » est utilisée ensuite
pour visualiser les spots



Electrophorèse en capillaire



2.2 Electrophorèse Capillaire de zone (ECZ)

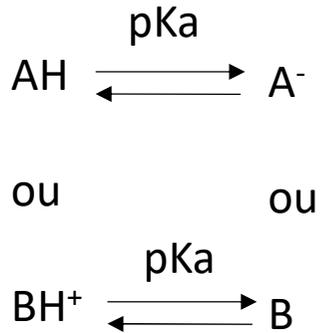
- 1- Influence du tampon sur l'ionisation
- 2- Double couche diffuse et potentiel Zéta
- 3- Mécanismes de transport
- 4- Electrophérogramme et grandeurs fondamentales
- 5- influence des conditions opératoires
- 6- exemples d'application

2.2.1 Influence du tampon sur l'ionisation

2022/2023

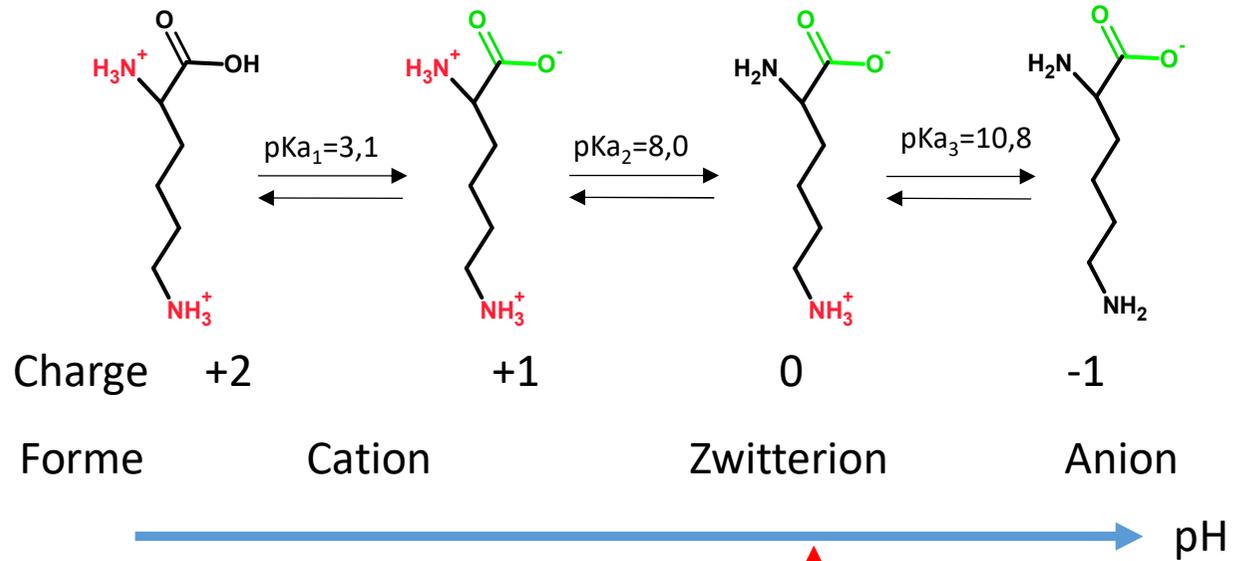
UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie

- Acides ou bases faibles



→ pH

- Ampholytes (ex Lysine)



$$pH = \frac{1}{2}(pK_{a_2} + pK_{a_3}) = pI = pHi$$

Point isoélectrique (pI) ou pH isoélectrique (pHi)

Influence du tampon sur l'ionisation cas des protéines

Forme cationique

- fonction N-terminale
- Fonction guanido de l'arginine
- Forme imidazole de l'histidine
- Fonction NH_2 supplémentaire (lysine)

Forme anionique

- Fonction C-terminale
- Fonction COOH supplémentaire (acides glutamiques et aspartiques)
- Fonction Thiol SH (cystéine)
- Fonction alcool OH (sérine, thréonine et tyrosine)

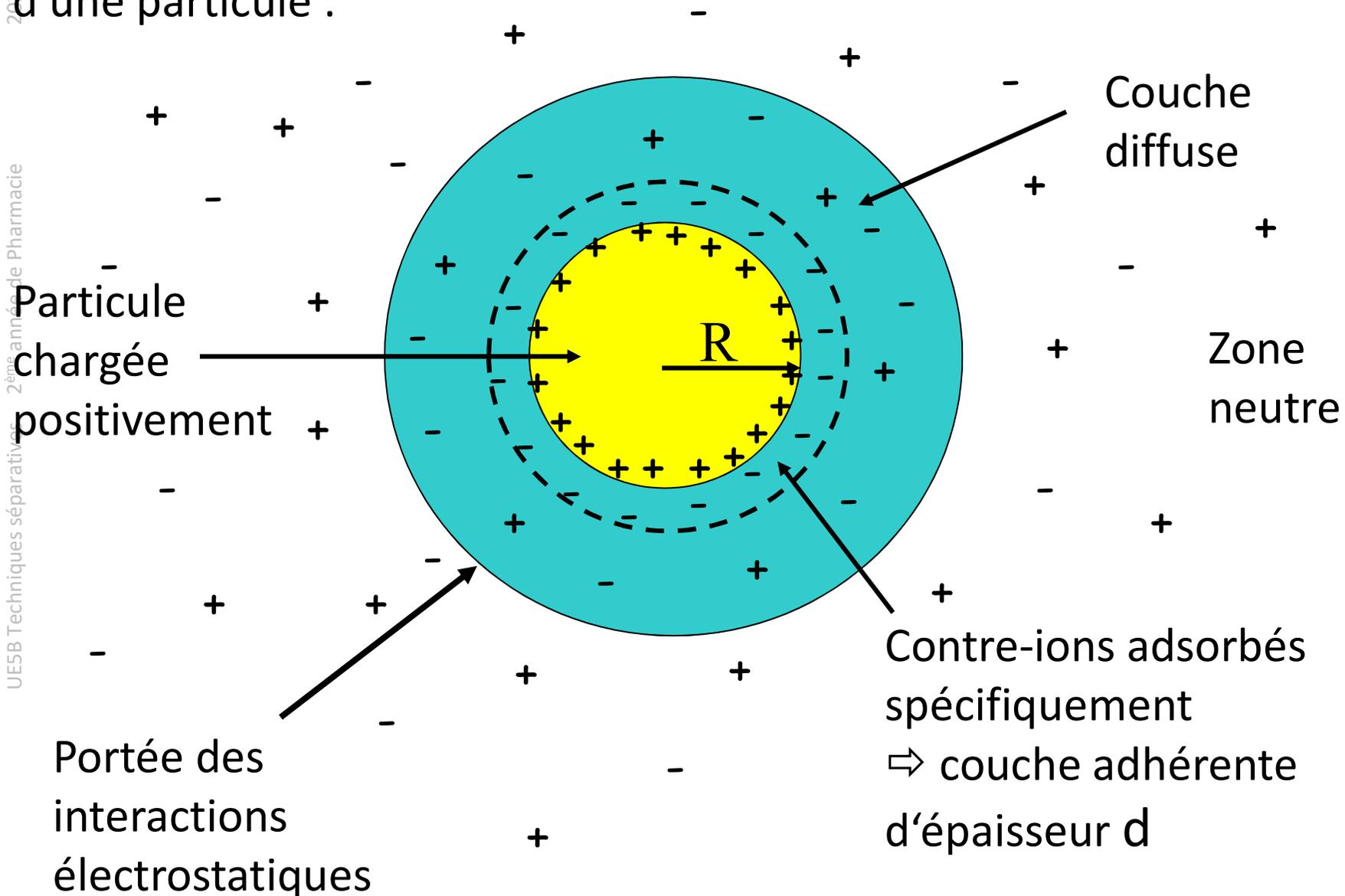


Charge nette 0

Point isoélectrique (pI) ou pH isoélectrique (pHi)

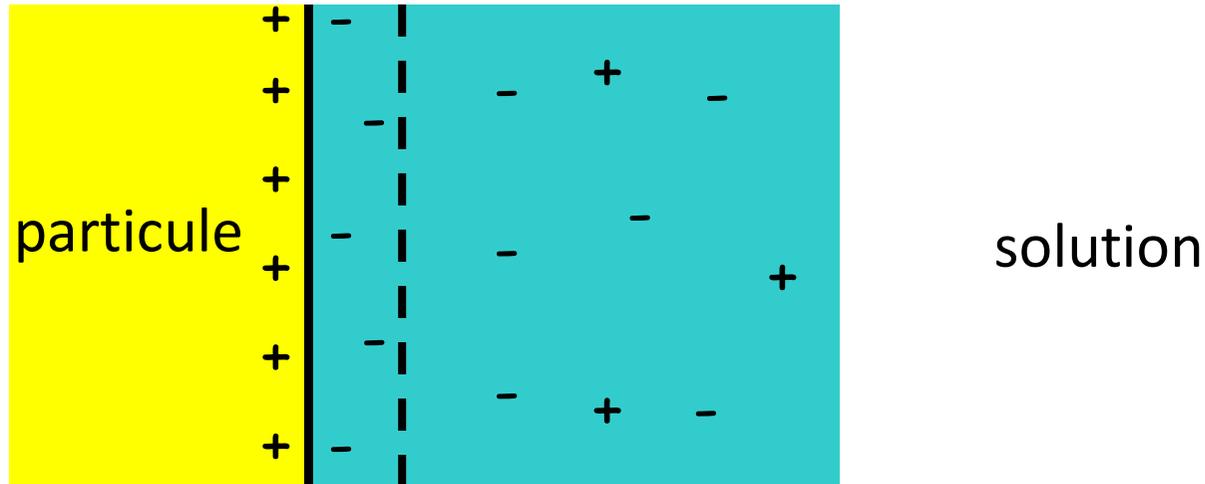
2.2.2 Double couche diffuse et potentiel Zéta

Il existe une couche de contre-ions autour d'une macromolécule ou d'une particule :



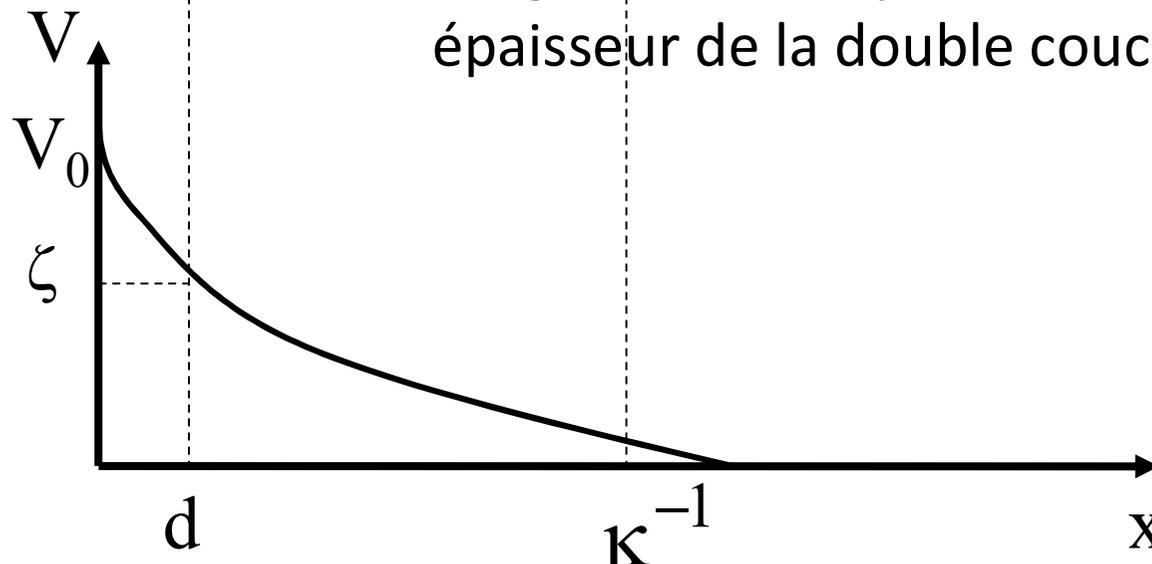
Double couche diffuse et potentiel Zéta

d : épaisseur de la couche adhérente



κ^{-1} : longueur de Debye
épaisseur de la double couche

Potentiel
Zéta



Double couche diffuse et potentiel Zéta

2022/2023
UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie

κ^{-1} : longueur de Debye : longueur caractéristique de la portée des interactions électrostatiques

Le rayon hydrodynamique de la macromolécule est

$$R_H = R + d$$

ζ : Potentiel Zéta ou potentiel électrocinétique = potentiel de surface de la macromolécule équivalente de rayon $R + d$

On ne peut pas mesurer la charge de surface de la particule en raison de la couche adhérente.

⇒ On mesure la charge de surface écrantée par une partie de la double couche.

Le potentiel Zéta ζ

est exprimé en fonction la taille des macromolécules solvatées et de la charge équivalente au niveau de la couche adhérente

Le champ électrique ne s'exerce pas seulement sur la macromolécule mais aussi sur son environnement ionique

$$\zeta = \frac{q}{4\pi\epsilon R_H}$$

ϵ : Constante diélectrique du solvant

q : Charge équivalente au niveau de la couche adhérente

R_H : Rayon hydrodynamique de la macromolécule

2.2.3 Mécanismes de transport

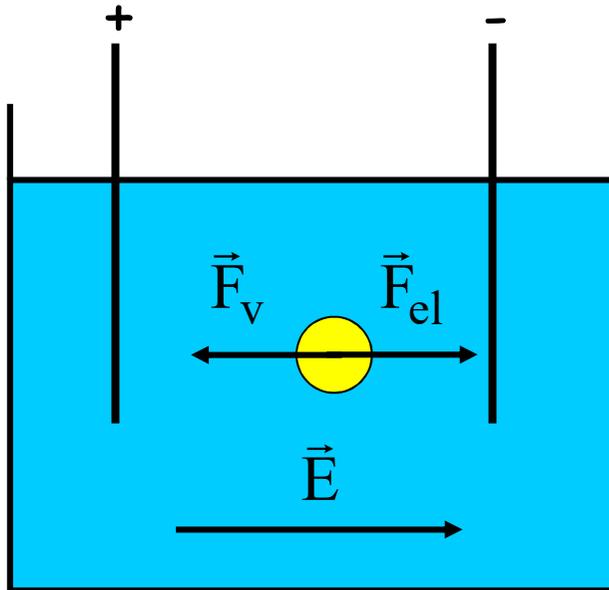
- Migration sous l'influence du champ électrique
à l'origine du déplacement et de la séparation des composés (influence sur le temps de migration)
 - MIGRATION ELECTROPHORETIQUE
Phénomène sélectif à l'origine de la séparation
 - ELECTRO-OSMOSE
Migration non sélective
- Mouvements secondaires
à l'origine de la dispersion de migration des molécules d'un même composé
(élargissement des pics électrophorétiques)

Phénomènes dispersifs qui limitent les séparations :
CONVECTION (Effet Joule)
DIFFUSION MOLECULAIRE

Migration électrophorétique

2022/2023

UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie



Migration sous l'influence du champ électrique E

Molécule de charge équivalente q et de rayon hydrodynamique R_H

Liquide de viscosité η et de constante diélectrique ϵ

Force électrique

$$\rightarrow \vec{F}_{el} = q\vec{E}$$

Force de frottement

$$\rightarrow \vec{F}_v = -6\pi\eta R_H \vec{v}$$

En régime permanent la vitesse est constante :

$$V = V_{\text{lim}} = V_{\text{ep}} \longrightarrow qE = 6\pi\eta R_H V_{\text{ep}}$$

On définit la mobilité électrophorétique d'une molécule :

$$\mu_{\text{ep}} = \frac{V_{\text{ep}}}{E} = \frac{q}{6\pi\eta R_H}$$

q : charge de la molécule

R_H : rayon hydrodynamique de la molécule

η : viscosité du tampon de migration

Mobilité électrophorétique pour une macromolécule :

Potentiel Zéta : $\zeta = \frac{q}{4\pi\epsilon R_H}$

ζ : potentiel zéta de la macromolécule

R_H : rayon hydrodynamique de la macromolécule

$$\mu_{\text{ep}} = \frac{4\pi\epsilon R_H \zeta}{6\pi\eta R_H} = \frac{2\epsilon}{3\eta} \zeta$$

ϵ : constante diélectrique du milieu

η : viscosité du tampon de migration

La vitesse électrophorétique d'une molécule est donc fonction de la mobilité de la molécule chargée μ_{ep} et de l'intensité du champ électrique E :

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \mu_{ep} \frac{\Delta V}{L}$$

Elle dépend :

- de la nature chimique des molécules

Taille (masse molaire, rayon de la molécule solvatée)

Charge (fonction du pH du tampon de migration)

- Du champ électrique

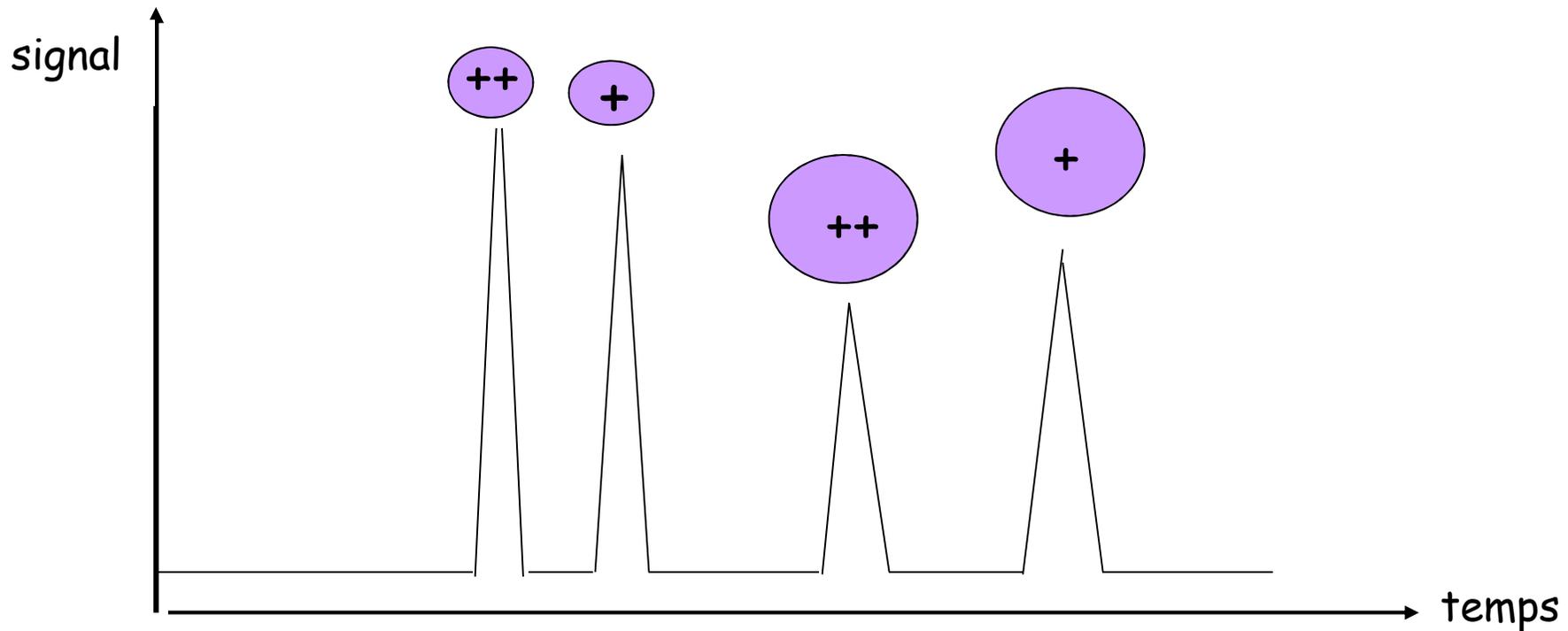
$$E = \frac{\Delta V}{L}$$

L : longueur totale du capillaire

ΔV : différence de potentiel entre les deux électrodes

La séparation entre plusieurs molécules d'un mélange est fondée sur des différences de mobilité électrophorétique.

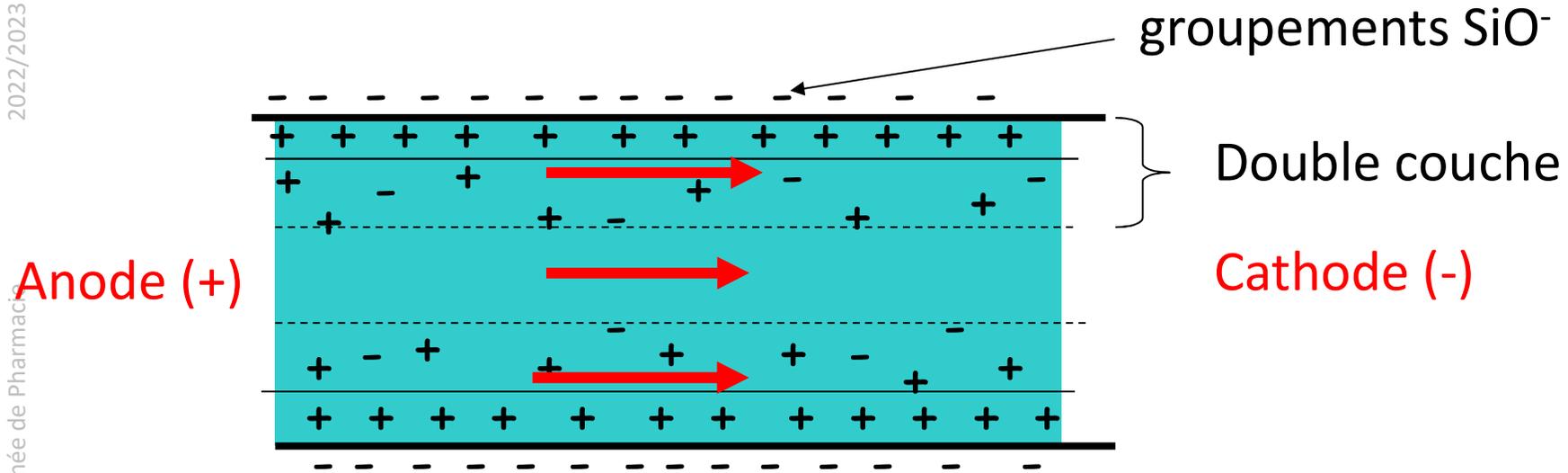
L'ordre de migration est fonction du rapport charge / masse.



Migration électro-osmotique

2022/2023

UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie



Le phénomène d'électro-osmose s'applique à l'ensemble de la solution tampon de migration :

- ☞ Mise en mouvement de la couche chargée qui entraîne le reste du liquide en bloc : écoulement électro-osmotique
- ☞ Le mouvement électro-osmotique s'applique de manière similaire à toutes les molécules chargées ou électriquement neutres.

Le tampon de migration se déplace sous l'influence de E avec une vitesse constante proportionnelle au champ électrique :

$$v_{eo} = \mu_{eo} E \quad \text{et} \quad \mu_{eo} = -\frac{\varepsilon \zeta_{eo}}{\eta}$$

ζ_{eo} : Potentiel zéta de la paroi du capillaire

η : Viscosité du tampon de migration

ε : Constante diélectrique du tampon

L'importance de μ_{eo} dépend du pH du tampon de migration car le potentiel ζ_{eo} de la paroi dépend du nombre de silanols ionisés

- pH < 4, l'ionisation est faible et le flux électro-osmotique est insignifiant
- pH > 9, les silanols sont totalement ionisés et le flux électro-osmotique est maximal

2.2.4 Electrophérogramme et grandeurs fondamentales

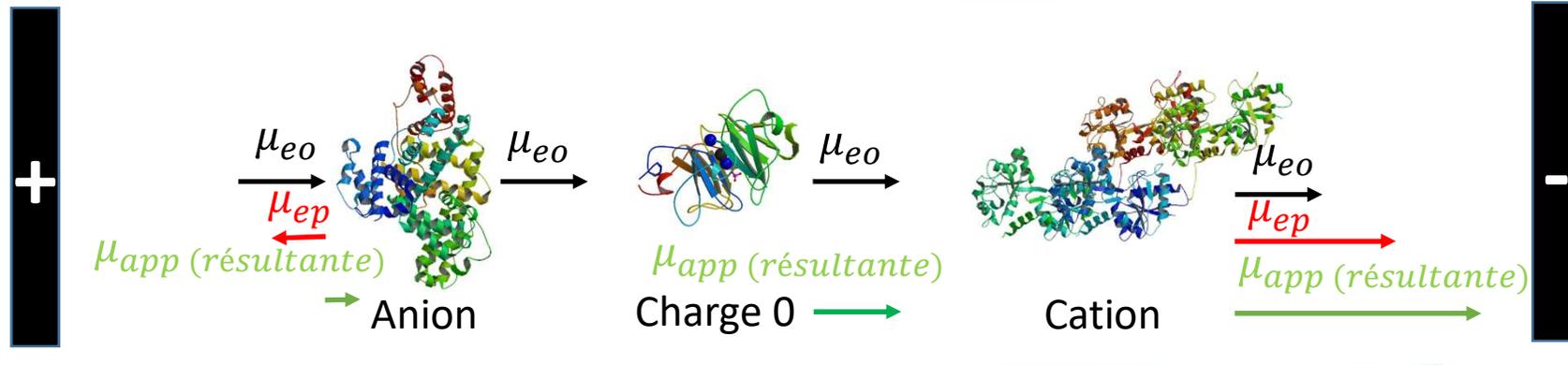
Vitesse apparente de migration

2022/2023

UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie

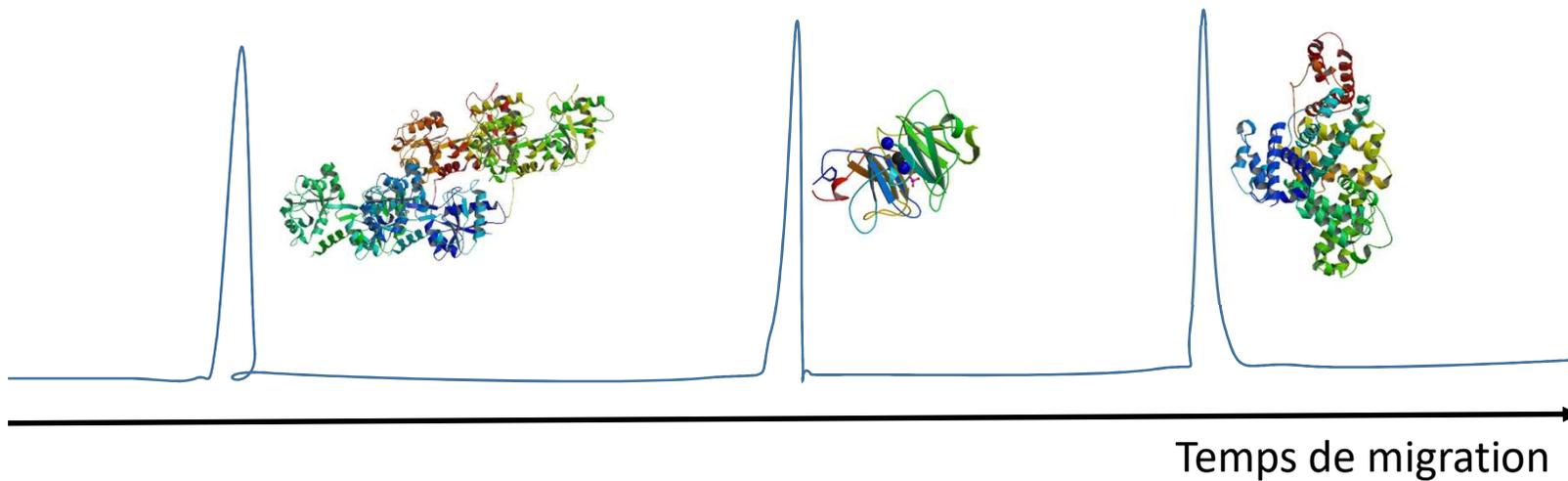
Anode

Cathode



$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep}$$

v_{app} Vitesse apparente de migration

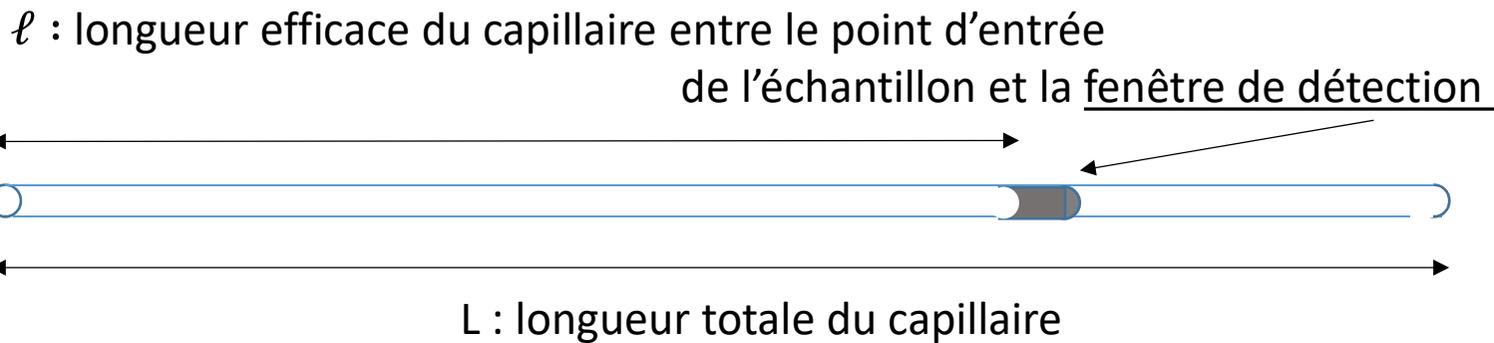


Temps de migration

$$t_m = \frac{\ell}{v_{app}} = \frac{\ell}{\mu_{app}} \frac{L}{\Delta V}$$

ΔV : Différence de potentiel appliquée aux bornes du capillaire.

Le temps de migration diminue avec l'augmentation de la ddp.



Efficacité en EC

Nombre de plateaux théoriques

$$N = 5,54 \left(\frac{t_m}{W_{0.5}} \right)^2$$

Même approximation que pour la chromatographie en ce qui concerne le caractère gaussien des pics, mêmes modalités de mesure

Relation avec les paramètres opératoires

$$N = \frac{\mu_{ep} \Delta V}{2D_m}$$

L'efficacité augmente avec la tension appliquée aux bornes du capillaire. Mais, l'augmentation de V génère une augmentation de la température par effet Joule.

Les macromolécules (protéines, ADN) ont de faibles coefficients de diffusion (D_m). L'EC permet d'obtenir de très grandes efficacités pour ces composés

Résolution en EC

$$Rs_{1,2} = 2 \frac{t_{m2} - t_{m1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

Mêmes expressions qu'en chromatographie à ceci près que le temps de migration remplace le temps de rétention

$$Rs_{1,2} = 1,177 \frac{t_{m2} - t_{m1}}{\omega_{0.5(1)} + \omega_{0.5(2)}}$$

$$Rs = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ep}}{\bar{\mu}_{ep}} \sqrt{N}$$

La résolution entre deux analytes dépend de leur différence de mobilité électrophorétique rapportée à la moyenne de leurs mobilités électrophorétiques.

μ_{ep} est influencé par la nature et le pH du tampon de migration

$$Rs = 0.117 \frac{\mu_{ep}}{\bar{\mu}_{ep}} \frac{\sqrt{\Delta V}}{\sqrt{D_m}}$$

Expression obtenue en remplaçant N par sa relation avec V et D_m .

On voit que doubler la ddp améliore seulement la résolution d'un facteur 1,4.

2.2.5 Influence des conditions opératoires

pH 11

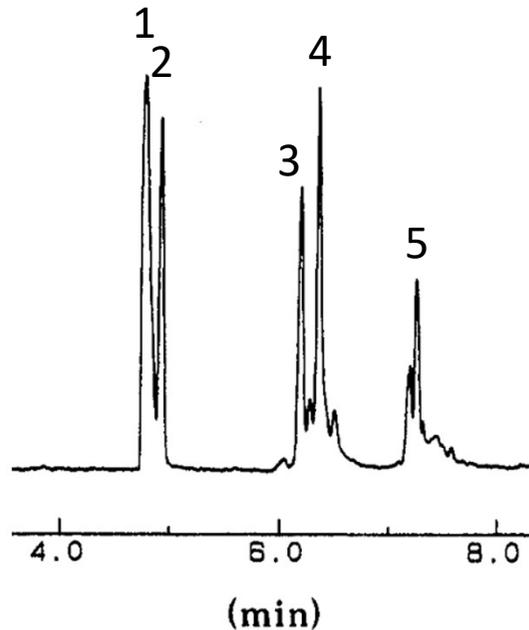
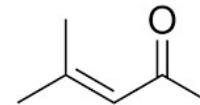


Figure 1. Electropherogram of model proteins at pH 11.0: elution order Lys., mesityl oxide, RNA, Cyt. c, myoglobin (wsm); buffer, CAPS/KCl 20/10 mM; capillary, length to detector 63 cm; voltage, 16 kV and 5 s for injection, 30 kV and 30 μ A for electrophoresis. Detector response is arbitrary; see Experimental Section.

Présente une (petite) charge +, sort avant le flux EO

1- Lysozyme, $pI \approx 11$, MW 14 kDa

2- Oxyde de mésityle,



composé non chargé, marqueur de flux eo

3- Ribonucléase A, $pI = 9,3$, MW 13,5 kDa

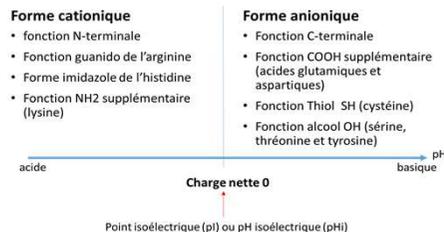
4- Cytochrome C, $pI = 9,4$, MW 13,0 kDa

Deux protéines très proches en terme de pI et MW sont pourtant séparées

5- myoglobine, $pI = 7,5$, MW 17,5 kDa

Le plus faible pI

Influence du tampon sur l'ionisation cas des protéines



Influence des conditions opératoires

pH 11

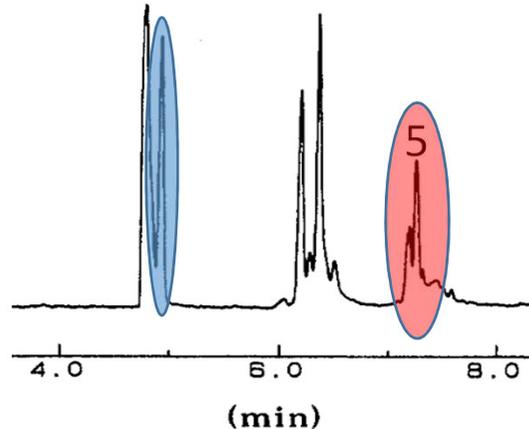


Figure 1. Electropherogram of model proteins at pH 11.0: elution order Lys., mesityl oxide, RNA, Cyt. *c*, myoglobin (wsm); buffer, CAPS/KCl 20/10 mM; capillary, length to detector 63 cm; voltage, 16 kV and 5 s for injection, 30 kV and 30 μ A for electrophoresis. Detector response is arbitrary: see Experimental Section.

Oxyde de mésityle

myoglobine, pI = 7,5, MW 17,5 kDa

Conalbumine pI = 6,6 MW 77 kDa

B Lactoglobuline A pI = 5,1 MW 35 kDa

Ovalbumine pI = 4,7 MW 45 kDa

pH 9,22

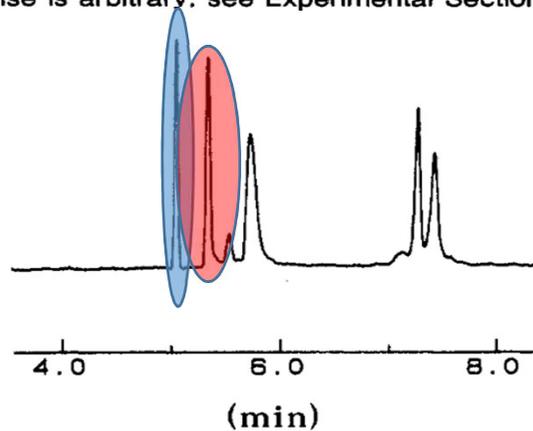


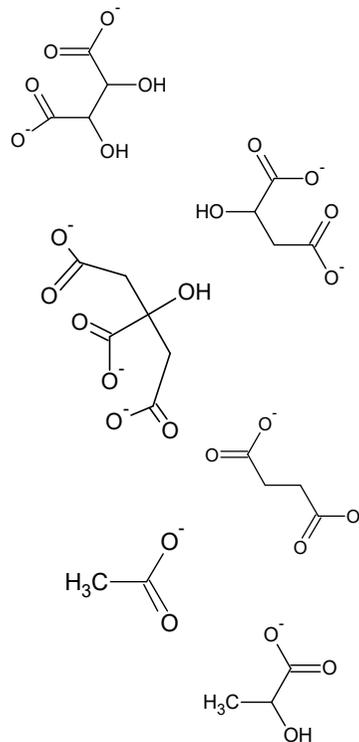
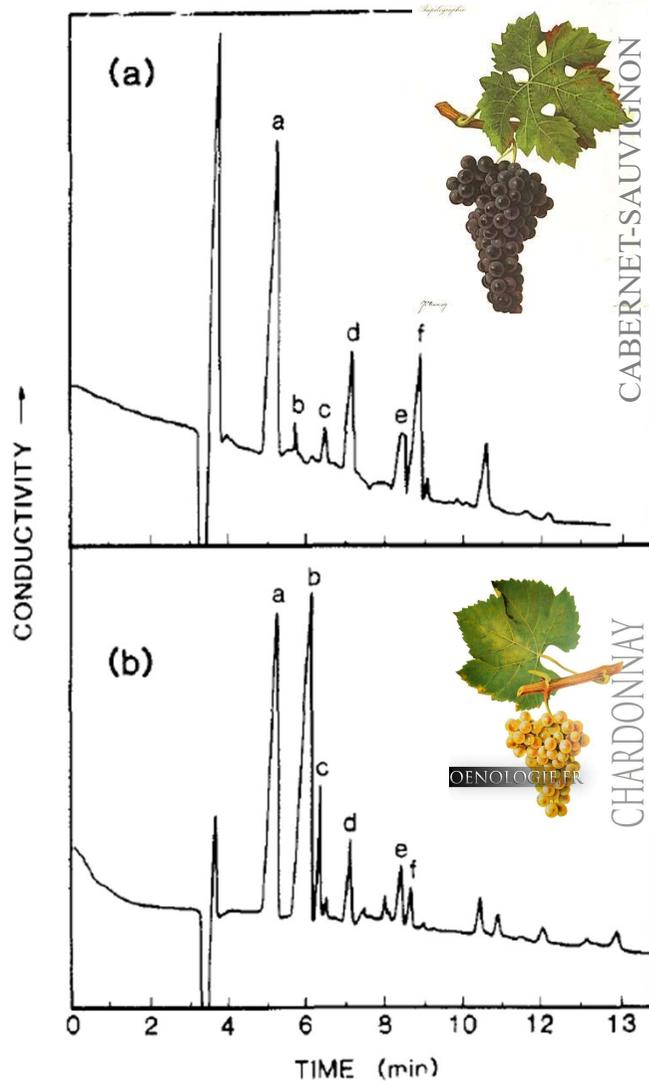
Figure 2. Electropherogram of model proteins at pH 9.22: elution order mesityl oxide, myoglobin (wsm), conalbumin, BLA, ovalbumin; buffer, CHES/KCl 20/10 mM; electrophoresis at 30 kV and 20 μ A. Other conditions are the same as in Figure 1.

Anions organiques dans les vins

2022/2023

UE5B Techniques séparatives. 2^{ème} année de Pharmacie

Dans les vins rouges la fermentation malolactique diminue l'acidité en transformant les malates (b) en lactates (f)



(a) tartrate $pK_{a1} = 2,89$ $pK_{a2} = 4,40$

(b) malate $pK_{a1} = 3,40$ $pK_{a2} = 5,20$

(c) citrate
 $pK_{a1} = 3,13$; $pK_{a2} = 4,76$; $pK_{a3} = 6,4$

(d) Succinate $pK_{a1} = 4,2$; $pK_{a2} = 5,6$

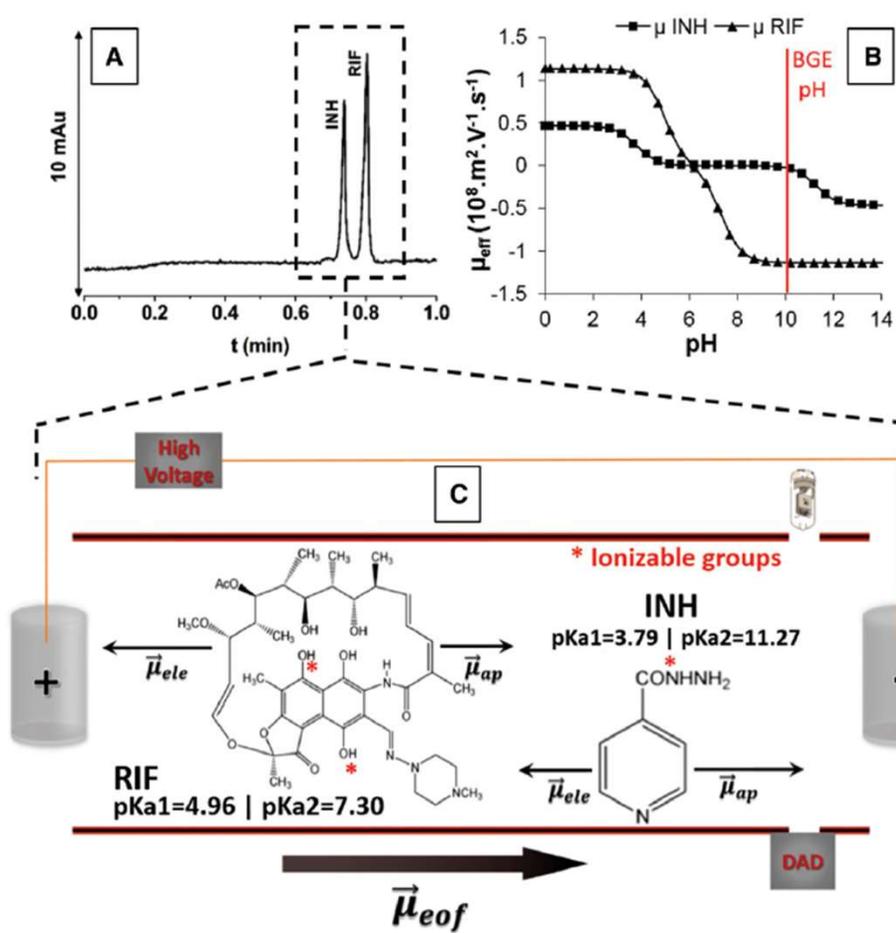
(e) Acétate $pK_a = 4,8$

(f) lactate $pK_a = 3,86$

Figure 7. Electropherograms of wine: (a) Cabernet Sauvignon; (b) Chardonnay. Each sample is diluted 1:39 with 7 mM MES/His (pH 6) electrolyte containing 0.5 mM TTAB and 30% methanol to aid separation. The peaks are as follows: a, tartarate; b, malate; c, citrate; d, succinate; e, acetate; f, lactate. Capillary dimensions and run voltage are the same as shown in Figure 5. Reprinted with permission from Gordon, M. J.; Huang, X., Pentoney, S. L., Jr.; Zare, R. N. *Science* **1988**, *242*, 224–228. Copyright 1988 by the AAAS.

Séparation rifampicine isoniazide

12/2023



Association fixe de 2 antituberculeux dans un seul comprimé pour faciliter l'observance.

Deux molécules très dissemblables en termes de taille et polarité.

Sont séparées en moins d'une minute

FIGURE 1 (A) Electropherogram of INH and RIF standard mixture. Electrophoretic conditions: BGE composed by 20 mmol/L of carbonate/bicarbonate buffer; cartridge temperature at 25°C; positive voltage at 25 kV; hydrodynamical injection of 50 mbar for 3.0 s; capillary total length of 33.5 cm (25 cm effective length), 75 μ m id and 375 μ m od. (B) Effective mobility curves for INH and RIF (C) CZE mechanism separation for INH and RIF along with their molecular structures and pKa values