





## Le principe chromatographique A.2

## Grandeurs fondamentales A.3 - A.4

## Interactions solutés/adsorbants A.5

## Filtration A.6

## SPE A.7 - A.9

|   |     |
|---|-----|
| Principe de la SPE                          | A.7 |
| Différences entre SPE, HPLC et Flash PrepLC | A.8 |
| Influence de la taille des particules       | A.9 |

## Chromatographie gazeuse (GC) A.10 - A.15

|  |      |
|--|------|
| Les différents types de colonnes GC  | A.10 |
| Guide d'installation d'une colonne capillaire  | A.11 |
| Débit, capacité, facteur d'expansion, temps de rétention nulle, pression, rapport de phase | A.12 |
| Efficacité/diamètre, efficacité/vitesse gaz vecteur, ordre de sortie des analytes          | A.13 |
| Phases liquides  | A.14 |
| Head space, head space sorptive extraction   | A.15 |

## Chromatographie liquide (HPLC) A.16 - A.26

|   |             |
|---|-------------|
| Schéma d'ensemble d'une chaîne HPLC, volumes extra colonne        | A.16        |
| Transfert de gradient, décalage des gradients, volume de délai    | A.17        |
| Caractéristiques des silices, influence du débit sur l'efficacité | A.18        |
| Représentation gaussienne des pics, effet de la quantité injectée | A.19        |
| Comparatif de productivité, guide de sélection                    | A.20        |
| Volume et charge injectables, viscosité, concentration, tampons   | A.21        |
| Paramètres en fonction des dimensions des colonnes                | A.22        |
| Procédures de rinçage, miscibilité des solvants                   | A.23        |
| Colonnes Pharmacopée  | A.24        |
| Optimisation d'une séparation                                     | A.25 - A.26 |

## Polarités, forces éluantes A.27 - A.28

|                          |      |
|--------------------------|------|
| Classification de Trappe | A.27 |
| Classification de Snyder | A.28 |

## Chromatographie couche mince (CCM) A.29 - A.31

|  |      |
|--|------|
| Principe   | A.29 |
| Migration des analytes, interprétation des résultats   | A.30 |
| Comparaison CCM et chromatographie liquide sur colonne | A.31 |

## Chromatographie préparative et Flash A.32 - A.35

|   |             |
|---|-------------|
| Transfert CCM vers la purification, calcul des conditions d'élution, influence du débit | A.32 - A.33 |
| Capacité de charge des colonnes   | A.34 - A.35 |

## Biochromatographie A.36 - A.40

|   |      |
|---|------|
| Dimensions des molécules biologiques, limites d'exclusion | A.36 |
| Purines, pyrimidines, ADN, ARN                            | A.37 |
| Acides aminés, peptides, protéines                        | A.38 |
| Anticorps   | A.39 |
| Techniques d'analyses des protéines et des anticorps      | A.40 |

## Filetages et diamètres A.41

## Conversions A.42

|   |      |
|---|------|
| Longueurs, capacités, pressions, volumes, poids, températures | A.42 |
|---|------|

## Glossaire A.43 - A.47



### Chromatographie : Principe de base

Séparer les constituants d'un mélange de différentes molécules pour les qualifier et/ou les quantifier et/ou les purifier.

Dans le mélange ou échantillon, chaque groupe de molécules présente un comportement particulier pendant le passage dans la colonne HPLC ou GC. Ce comportement est directement lié à leur interaction propre avec le milieu analytique :

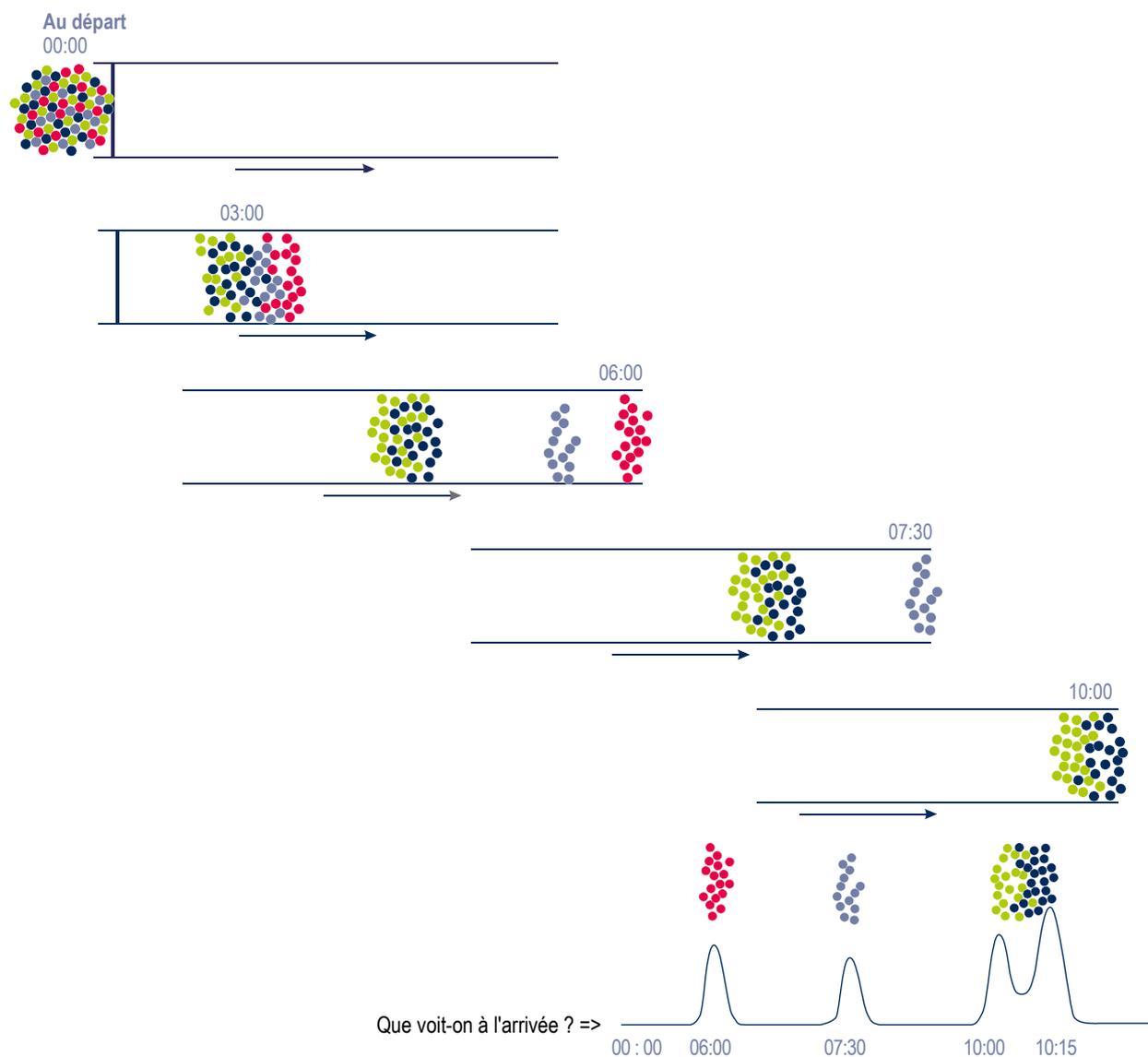
#### En HPLC :

- Le type d'adsorbant solide dont est remplie la colonne (polaire, apolaire, ionique, taille des pores)
- Les solvants employés (solubilité, polarité, viscosité, débit...)
- La température
- Etc...

#### En GC :

- Le type d'adsorbant de la colonne (polaire, apolaire)
- La température de la colonne, de l'injecteur
- Débit, nature du gaz vecteur
- Etc...

Exemple : 4 groupes de produits en quantités différentes : ● = 17 ; ● = 22 ; ● = 19 ; ● = 13





### Temps de rétention :

Temps pendant lequel chaque produit est effectivement retenu par l'interaction des greffons

$t_0$  = temps de rétention nulle (le produit n'a pas d'affinité avec le greffon).

$t_0$  correspond au temps que met le solvant à parcourir toute la colonne à un débit donné.

$t_1$  = temps de rétention du produit 1 à analyser

$t_2$  = temps de rétention du produit 2 à analyser

### Temps de rétention réduit

$$t'_1 = t_1 - t_0 \quad t'_2 = t_2 - t_0$$

### Facteur de rétention

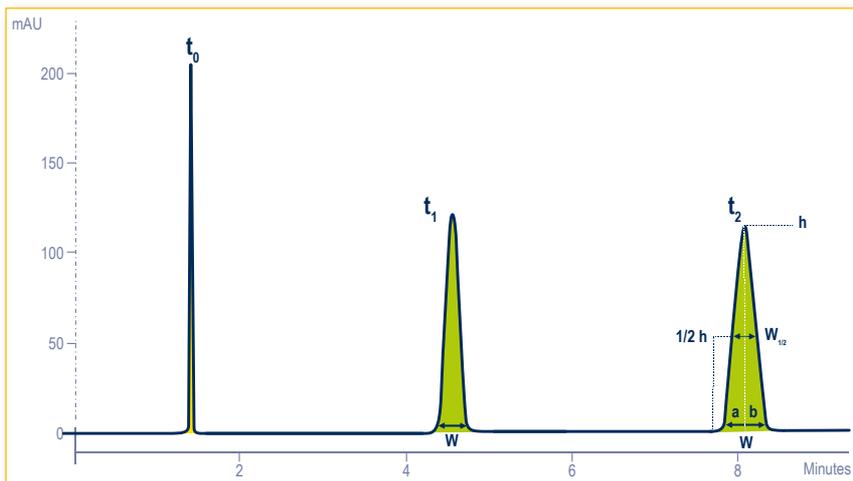
$$K_1 = \frac{t_1 - t_0}{t_0} \quad K_2 = \frac{t_2 - t_0}{t_0}$$

Temps de rétention d'un produit, rapporté au temps de rétention nulle.

### Facteur de sélectivité

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{t'_2 - t'_1}{t'_1}$$

Caractérise la rétention d'un produit par rapport à un autre sur une colonne donnée.



### Efficacité

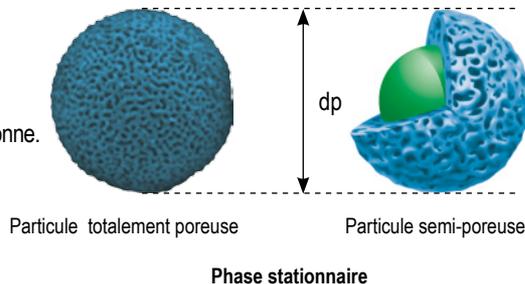
$$N = 16 \left( \frac{t_1}{W} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5,54 \left( \frac{t_1}{W_{1/2}} \right)^2$$

L : longueur de la colonne  
H : hauteur équivalente d'un plateau théorique  
 $H = L/N$   
h : hauteur réduite d'un plateau

W est égal à la largeur définie par l'intersection des tangentes au point d'inflexion de la courbe et de la ligne de base.

$W_{1/2}$  est égal à la largeur de la courbe à la demi hauteur du pic.

En chromatographie liquide  
 $d_p$  : diamètre des particules  
 $h = H/d_p$  (cette valeur caractérise la qualité de remplissage de la colonne. Elle doit s'approcher de 2)



### Asymétrie

Asymétrie :  $As = \frac{b}{a}$  à 10 % de la hauteur du pic

Tailing Factor :  $Tf = \frac{a+b}{2a}$  à 5 % de la hauteur du pic

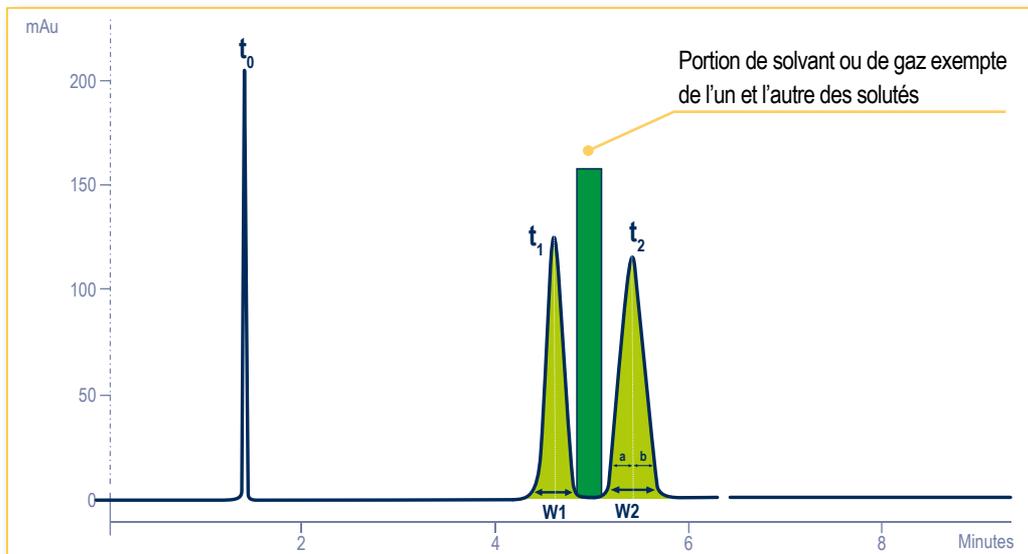


### Résolution

$$R_s = 2 \left( \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2} \right)$$

Cette valeur doit être supérieure à 1,5 pour une séparation significative des deux pics. On considère que la séparation est totale pour une valeur de  $R_s >= 3$ .

Cette grandeur caractérise l'écartement réel des deux pics depuis le retour à la ligne de base du premier jusqu'au départ de la ligne de base du second.

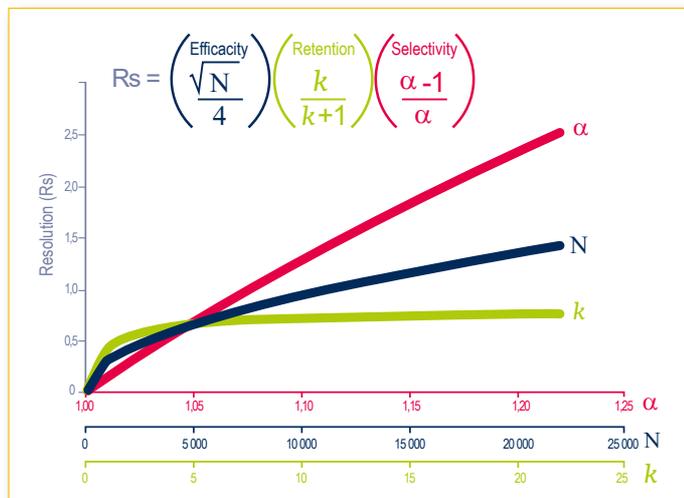


### Extrapolation de la résolution

Lorsque deux pics sont proches, on peut estimer que  $w_1 \approx w_2$

Dans ce cas de figure la résolution peut aussi s'écrire selon la formule  $R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{K_2}{1 + K_2}$

Influence de k, N et alpha sur la résolution





### Interactions solutés/adsorbants :

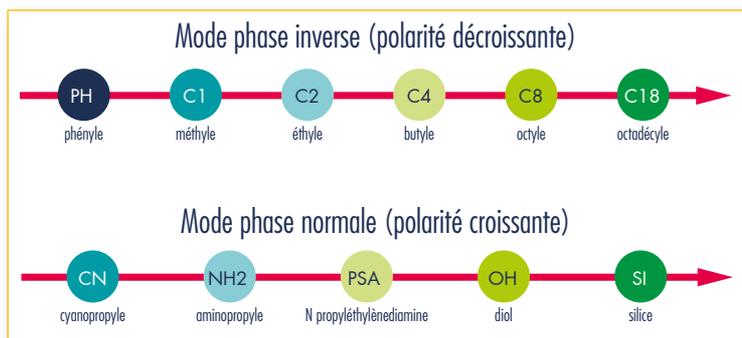
**Chromatographie d'adsorption** : la séparation est créée par les différences d'adsorption des molécules (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques) sur la phase stationnaire et la désorption par la phase mobile.

**Chromatographie de partage** : la séparation est créée par les différences d'interaction des molécules avec les greffons de la phase stationnaire et la désorption par la phase mobile.

**Chromatographie d'échange d'ions** : la séparation est créée par le caractère échangeable des ions du greffon avec ceux des solutés dans la phase mobile.

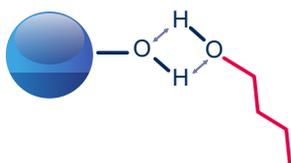
**Chromatographie d'exclusion** : la séparation est créée par les différences de taille des molécules à séparer. Les molécules plus grosses que les pores de l'adsorbant sont exclues et éluées très rapidement. Les molécules entrant dans les pores sont ensuite éluées graduellement des plus volumineuses aux plus petites.

### Polarités des greffages



#### Interactions polaires sur silice et greffon nitrile

Energie de liaison 20 à 50 kJ/mole



Energie de liaison 8 à 15 kJ/mole



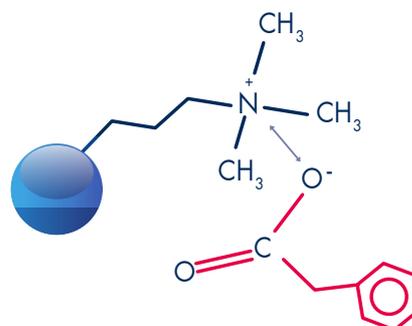
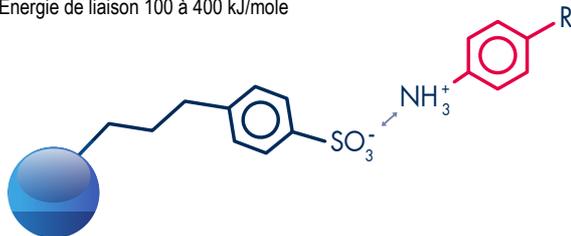
#### Interactions apolaires sur greffons alkyles

Energie de liaison 2 à 10 kJ/mole



#### Interactions ioniques sur SCX et SAX

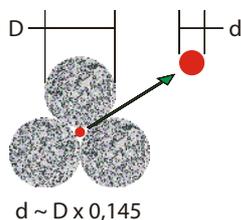
Energie de liaison 100 à 400 kJ/mole





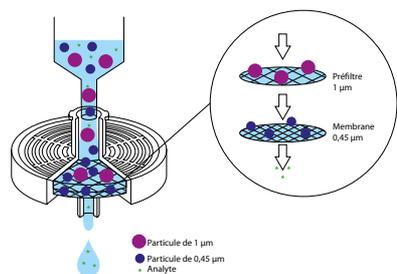
### Filtration de l'échantillon en HPLC

Filtrer correctement l'échantillon à analyser permet de limiter le colmatage de la colonne HPLC. La porosité du filtre doit être inférieure au diamètre interstitiel (d) qui est proportionnel au diamètre des particules.



| Granulométrie de la phase (D) | Porosité du filtre recommandée |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 5 µm                          | 0,45 µm                        |
| 3 µm                          | 0,45 µm                        |
| 2 µm                          | 0,2 µm                         |

### Utilité d'un pré-filtre



### Compatibilité des polymères

Tableau indicatif de compatibilité des polymères

|                         | ACETAL<br>Delrin | CTFE | ETFE<br>Tefzel | Polyamide<br>Nylon | PCTFE<br>Kel-F | PEEK | PTFE |
|-------------------------|------------------|------|----------------|--------------------|----------------|------|------|
| Temp Max raccords       | 60               |      | 80             | 90                 | 80             | 125  |      |
| Temp Max tube           |                  |      | 80             | 0                  | 0              | 100  |      |
| Autoclavable            | non              |      | oui            | non                | non            | oui  | oui  |
| Acetaldehyde            | A                | A    | A              | C                  | A              | A    | A    |
| Acetic Anhydride        | D                | A    | A              | C                  | A              | A    | A    |
| Acetone                 | D                | A    | B              | B                  | A              | A    | A    |
| Acid, Hydrofluoric      | D                | A    | A              | D                  | A              | A    | A    |
| Acid, Trifluoroacetic   | C                | C    | C              | D                  | A              | A    | A    |
| Acid, Acetic Dilute 50% | C                | B    | B              | D                  | A              | A    | A    |
| Acid, Hydrochloric 37%  | D                | A    | A              | D                  | A              | A    | A    |
| Acid, Nitric            | D                | A    | A              | D                  | A              | A    | A    |
| Acid, Sulfuric          | D                | A    | A              | D                  | A              | A    | A    |
| Acetonitrile            | D                | A    | A              | A                  |                | A    | A    |
| Alcohol, Ethyl          | D                | A    | A              | D                  | A              | A    | A    |
| Alcohol, Isobutyl       | A                | A    | A              | D                  | A              | A    | A    |
| Alcohol, Methyl         | B                | A    | A              | D                  |                | A    | A    |
| Alcohol, n-Butyl        | A                | A    | A              | D                  | A              | A    | A    |
| Alcohol, Propyl         | A                | A    | A              | D                  | A              | A    | A    |
| Ammonium Hydroxide      | A                | A    | A              | C                  | A              | A    | A    |
| Aniline                 | B                | A    | A              | B                  | A              | A    | A    |
| Aqua Regia              | D                | B    | C              | D                  | A              | A    | A    |
| Benzaldehyde            | A                | B    | B              | B                  | A              |      | A    |
| Benzene                 | A                | B    | B              | A                  | B              | A    | D    |
| Carbon Tetrachloride    | B                | A    | A              | A                  | A              | A    | A    |
| Chlorobenzene           | D                | B    | B              | B                  | A              | A    | A    |
| Chloroform              | B                | B    | B              | D                  | B              | A    | A    |
| Cyclohexane             | A                | B    | B              | A                  | A              | A    | A    |
| Esters                  | D                | A    | A              | A                  | B              | A    | A    |
| Ether                   | A                | B    | B              | A                  | B              | A    | A    |
| Ether, Diethyl          | D                | B    | B              | C                  | C              | A    | A    |
| Ether, Isopropyl        | A                | A    | A              | B                  | A              | A    | A    |
| Ethyl, Methyl           | B                | A    | A              | B                  | A              | A    | A    |
| Hexane                  | B                | A    | A              | A                  | A              | A    | A    |
| Hydrazine               | B                | A    | A              |                    | B              | A    | A    |
| Hydrogen Peroxide       | B                | A    | A              | B                  | A              | A    | A    |
| Methylene Chloride      | B                | A    | A              | A                  | A              | D    | A    |
| Petroleum Ether         | A                | A    | A              | A                  |                | A    | A    |
| Phenol                  | C                | A    | A              | D                  | A              | A    | A    |
| Sodium Hydroxide        | D                | A    | A              | B                  | A              | A    | A    |
| Tetrahydrofuran         | A                | A    | A              | A                  | A              | D    | A    |
| Toluene                 | B                | A    | A              | C                  | A              | A    | A    |
| Trichloroethylene       | B                | B    | B              | B                  | A              | A    | A    |
| Trimethylpentane,2,2,4  | C                | B    | B              | A                  |                | A    | A    |
| Water                   | A                | A    | A              | A                  | A              | A    | A    |
| Xylene                  | A                | A    | A              | A                  | A              | A    | A    |

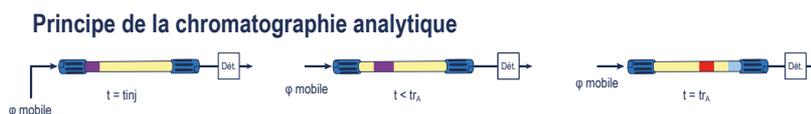
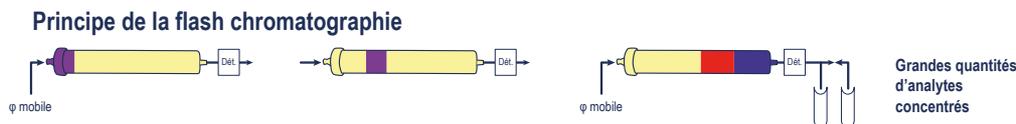
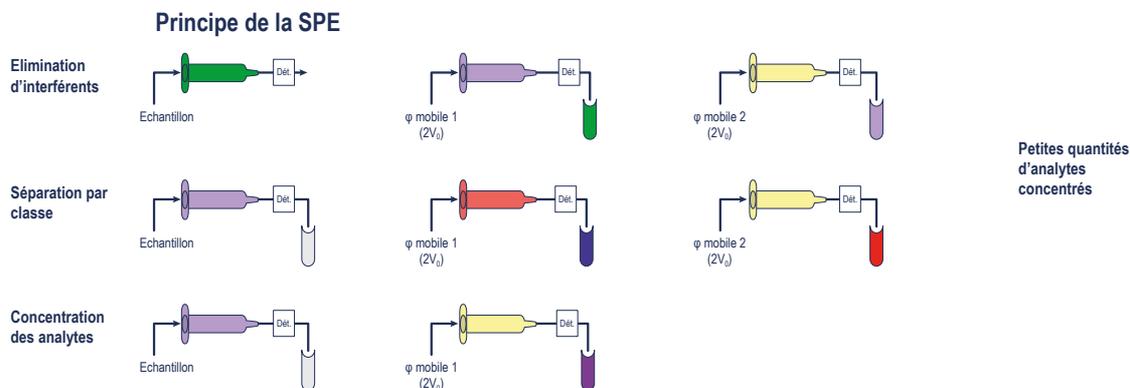
A : Excellent - B : Bon - C : Moyen - D : Pas recommandé



## Principe de la SPE (extraction sur phase solide)

- La SPE est une HPLC en mode step gradient.
- Elle permet de séparer les analytes par classe de structure et de les concentrer avant une analyse GC ou HPLC.
- L'objectif de la SPE est de séparer les solutés d'intérêt de la matrice et des solutés interférents.

En règle général, la SPE s'applique à des échantillons dont les analytes sont de polarités différentes (purification ou séparation par classe). Lorsque le but consiste uniquement à concentrer un échantillon de grand volume, la SPE est utilisable avec des analytes de structures voisines. Elle offre alors une alternative très efficace à l'analyse de très grands volumes d'échantillon dilué, par chromatographie classique en mode de pré-concentration en tête de colonne.



La SPE suit un processus séparatif discontinu. Les analytes sont d'abord bloqués sur la phase stationnaire puis sont désorbés dans un volume minimal de phase mobile.

La SPE correspond à une chromatographie liquide d'efficacité très faible (typiquement  $N < 50$  plateaux)

Pour séparer les composés, il faut des sélectivités très grandes :  $\alpha > 4$

## Volume de fin de fixation

A partir d'un certain volume d'échantillon percolé sur la cartouche SPE, les solutés vont commencer à être élués. On le définit comme le volume de fin de fixation (anglais breakthrough). On considère ce volume atteint lorsque la concentration du ou des composés élués représente 1% de la concentration passée sur l'adsorbant.

## Facteur de concentration, facteur d'enrichissement

L'intérêt de la SPE réside dans l'augmentation de la concentration des analytes par la réduction du volume de l'échantillon. Le facteur de concentration peut facilement atteindre 1000/1.

$$\text{Facteur d'enrichissement} = \frac{\text{Volume percolé}}{\text{Volume d'élué}} \times \text{Rendement d'extraction}$$

## Intérêt petites granulométries

Le volume d'élué dépend directement du volume mort de la cartouche SPE. Plus la taille des particules du support est petite, plus faibles sont les volumes interstitiels et plus le volume d'élué en sera réduit.



## Différences entre SPE, HPLC et Flash PrepLC

### SPE

- Processus séparatif discontinu
- Analytes de polarités et structures différentes
- Echantillons de mélanges complexes dans lesquels se trouvent un grand nombre de solutés parasites perturbant la séparation

### LC

- Processus séparatif continu
- Analytes de polarités et structures voisines
- Solutions injectées relativement propres

### LC prep et Flash

- Processus séparatif continu
- Analytes de polarités et structures voisines
- Mélanges à purifier plus ou moins propres

|  | Chromatographie<br>(HPLC, prep LC, Flash)                                   | Extraction<br>(SPE, SLE)         |
|--|---|----------------------------------|
| Processus séparatif                              | Continu   | Discontinu                       |
| Solutés dans la colonne                          | Toujours en mouvement   | Bloqués puis décrochés           |
| Composition phase mobile                         | Soit constante (analyse isocratique)<br>Soit changée continûment (gradient) | Changée pas à pas                |
| Type de séparation                               | Chromatographie d'éluion  | Chromatographie frontale         |
| Volume de la colonne occupé:<br>par les analytes | 1 à 2 % (HPLC)  | 100 %                            |
| par la seule phase mobile                        | 99-98 % (HPLC)  | 0 %                              |
| Constituants de l'échantillon                    | Solutés de polarités voisines   | Solutés de polarités différentes |
| Utilisation                                      | Réutilisable  | "One Shot"                       |
| Coût de fonctionnement                           | Moyen à élevé   | Faible                           |
| Coût de l'appareillage                           | Elevé   | Faible                           |

### SPE

Elle sert à pré-séparer des solutés de structures différentes et à les recueillir dans un minimum de solvant. D'où les longueurs très courtes des cartouches de SPE. Pour que la SPE sépare les solutés d'intérêt, on doit travailler avec des facteurs de sélectivité supérieurs à 4. Le mode step gradient facilite la séparation. La SPE est une chromatographie fonctionnant à très grande sélectivité.

### HPLC

Compte tenu de l'efficacité des supports de petit diamètre de particules et des longueurs de colonnes usuelles, on percolera la colonne en continu par la phase mobile et on séparera facilement des solutés avec un facteur de sélectivité de 1,05.

**En conclusion, les lois permettant de choisir la phase mobile sont les mêmes en LC et en SPE mais elles seront utilisées selon des critères différents.**

## Caractéristiques des phases stationnaires utilisées en HPLC, Flash et SPE

|                                 | HPLC                       | Flash                      | SPE                          |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Diamètre des particules         | 1,7 à 10 µm                | 15 - 50 µm                 | 30 à 140 µm                  |
| Compacité du remplissage        | Forte                      | Forte                      | Forte                        |
| Effets extra colonne            | Faibles (si optimisés)     |                            | Forts                        |
| Longueur de colonne             | 3 à 30 cm                  | 5 à 50 cm                  | ~ 1 à 2 cm                   |
| Efficacité (Nombre de plateaux) | 5000 à 6000                | 1000 - 5000                | ~ 10 à 50                    |
| Sélectivité nécessaire          | Faible                     | Moyenne                    | Forte                        |
| Polarité des analytes           | Peu différente             | Peu différente             | Très différente              |
| Diamètre des pores              | 60 - 150 Å                 | 60 - 150 Å                 | 60 - 150 Å                   |
| Surface spécifique              | 50 - 450 m <sup>2</sup> /g | 50 - 450 m <sup>2</sup> /g | 500 - 1500 m <sup>2</sup> /g |

Réalisée en collaboration avec l'Université Paris-Sud, Pr A. Tchaplà & Dr S. Héron, LETIAM, IUT d'Orsay, Orsay, France.



## Influence de la taille des particules

En SPE, le diamètre des particules varie de 30 à 140  $\mu\text{m}$ , les longueurs de lit de 1 à 2 cm.

En HPLC, le diamètre des particules est compris entre 1,7 et 5  $\mu\text{m}$ , les longueurs classiques de colonne entre 5 et 25 cm.

En prep LC et Flash, le diamètre des particules varient de 10 à 50  $\mu\text{m}$ , les longueurs des colonnes de 5 à 50 cm.

Pour une même phase stationnaire, si seul le diamètre de particules diffère (mêmes solutés, même phase mobile, même température) :

- la rétention et la sélectivité ne seront pas affectées
- la résolution sera changée (les longueurs des colonnes affectent également le nombre de plateaux).

| "Efficacité théorique plateaux/m" | " $\varnothing$ des particules $\mu\text{m}$ " | Applications                         |
|-----------------------------------|--|--------------------------------------|
| 5 000                             | 50   | Flash purification<br>SPE            |
| 20 000                            | 15   | Flash purification<br>SPE<br>prep LC |
| 33 000                            | 10   | prep LC                              |
| 80 000                            | 5  | Analytique                           |
| 130 000                           | 3  | Analytique                           |
| 180 000                           | 2,2  | Analytique<br>UHPLC                  |
| 220 000                           | 1,7  | UHPLC                                |

Classiquement une colonne d'HPLC analytique de longueur 25 cm, remplie de particules de 5  $\mu\text{m}$  développe une efficacité de l'ordre de 20 000 plateaux en routine. Une cartouche de SPE de longueur 1,25 cm remplie de particules de 50  $\mu\text{m}$  développe une efficacité de l'ordre de 50 plateaux.

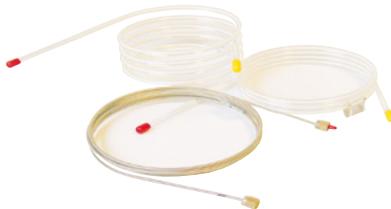
Réalisée en collaboration avec l'Université Paris-Sud, Pr A. Tchaplal & Dr S. Héron, LETIAM, IUT d'Orsay, Orsay, France.



### Les colonnes GC se présentent sous différents aspects



Les colonnes capillaires en silice fondue.

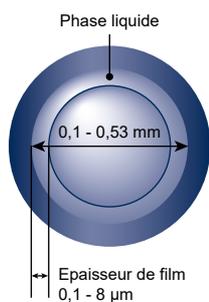


Les colonnes en verre.



Les colonnes en métal.

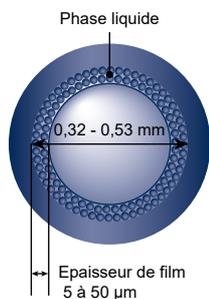
### Elles se déclinent en plusieurs catégories :



#### Les colonnes WCOT : "Wall Coated Open Tubular"

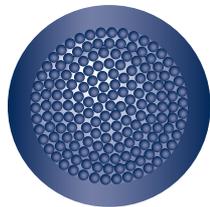
Tube ouvert à paroi recouverte d'un film liquide greffé ou non

Remarque : le tube capillaire peut être en métal (augmente la tenue en température)



#### Les colonnes PLOT : "Porous Layer Open Tubular"

Tube ouvert à couche poreuse où la phase stationnaire est un solide poreux non imprégné, qui peut être greffé.



#### Les colonnes SCOT : "Support coated Open Tubular"

Tube ouvert à support imprégné où la phase stationnaire est un solide imprégné.



## Guide d'installation d'une colonne capillaire



4. Régler la pression du gaz vecteur et contrôler le débit en plongeant l'extrémité de la colonne dans un flacon de pentane. Des bulles doivent se former.

1. Avant d'installer la colonne capillaire, remplacer les anciens septa et liners d'injection. Utiliser des gants ou des pinces pour les manipuler.

8. AVANT de chauffer le liner et la colonne, purger l'air et l'humidité du système pendant 30 minutes en les balayant avec le gaz vecteur. L'oxygène attaque la phase stationnaire lorsque la température dépasse 200°C.

6. Vérifier les fuites avec un détecteur électronique.

5. Installer la colonne dans le détecteur en respectant la distance indiquée dans le manuel d'utilisation de l'appareil. Laisser la ligne de base se stabiliser.

3. Introduire la colonne dans l'injecteur en respectant la distance indiquée dans le manuel d'utilisation de l'appareil. Serrer à la main puis serrer d'un tour supplémentaire.

2. Enfiler l'écrou et la ferrule puis couper 5 cm de colonne. Les ferrules graphites sont préconisées pour la plupart des applications, les ferrules polyimide-graphite pour les applications GC/MS.

7. Régler la température de la colonne à 50°C (100°C pour les épaisseurs de film > 3 μ) et injecter un produit non retenu pour déterminer la vitesse linéaire du gaz vecteur.

9. Conditionner la colonne en chauffant (10 à 20°C/min) jusqu'à la température maximale de programmation et maintenir cette température pendant 3 heures.

Si des températures maximales ne sont pas requises, une température de conditionnement de 20°C supérieure à la température d'analyse est conseillée tant qu'elle ne dépasse pas la température maximale de programmation.

### Dimensions des ferrules

| Ø int. colonne mm  | 0,18 | 0,25 | 0,32 | 0,53 |
|--------------------|------|------|------|------|
| Ø int. ferrules mm | 0,4  | 0,4  | 0,5  | 0,8  |

### Quelques précautions d'emploi :

- En règle générale, l'eau et surtout l'oxygène sont à proscrire. Installer des pièges à oxygène et des purificateurs de gaz en ligne dans votre circuit de gaz vecteur. Purger le système avant de connecter et chauffer la colonne.
- S'assurer que le gaz vecteur circule en permanence dans la colonne.
- Nettoyer fréquemment l'injecteur (composés pyrolysés, non volatils, fragments de septum...).
- Ne pas chauffer ou refroidir rapidement la colonne (tensions mécaniques pour la silice fondue).
- Couper régulièrement quelques centimètres à chaque extrémité de la colonne (parties altérées par la température de l'injecteur et du détecteur).
- Si l'injection fréquente d'échantillons "sales" est nécessaire, installer une précolonne de garde (tube de silice de quelques dizaines de centimètres).
- En cas de non-utilisation, stocker la colonne sous gaz inerte (septum pour une courte durée, sceller à la flamme pour un stockage prolongé).



### Débits en fonction des diamètres

| Ø int. colonne (mm)                    | 0,18 | 0,25 | 0,32 | 0,53 |
|--|------|------|------|------|
| Débit standard H <sub>2</sub> (mL/min) | 1,3  | 1,6  | 2,6  | 7,5  |
| Débit standard He (mL/min)             | 1    | 1    | 1,7  | 6    |
| Débit standard N <sub>2</sub> (mL/min) | 0,3  | 0,4  | 0,5  | 0,9  |

### Capacité de charge colonne GC en ng

La capacité de charge augmente en fonction des épaisseurs de film et des diamètres.

| Ø int. mm | Epaisseur de film µm |         |         |          |           |           |
|-----------|----------------------|---------|---------|----------|-----------|-----------|
|           | 0,1                  | 0,25    | 0,5     | 1        | 3         | 5         |
| 0,2       | 20-35                | 35-75   | 75-150  | 150-250  |           |           |
| 0,25      | 25-50                | 50-100  | 100-200 | 200-300  | 400-600   | 1000-1500 |
| 0,32      | 35-75                | 75-125  | 125-250 | 250-500  | 500-800   | 1200-2000 |
| 0,53      | 50-100               | 100-250 | 250-500 | 500-1000 | 1000-2000 | 2000-3000 |

La capacité de charge augmente en fonction des épaisseurs de film et des diamètres.

### Facteur d'expansion volumique

Température injection : 250 °C

Pression en tête de colonne 13 psi

| Solvant         | Rapport volume gazeux/liquide |
|-----------------|-------------------------------|
| Iso-octane      | 138                           |
| Hexane          | 174                           |
| Pentane         | 198                           |
| Acétate d'Ethyl | 233                           |
| Chloroforme     | 284                           |
| Dichlorométhane | 356                           |
| Méthanol        | 563                           |
| Eau             | 1261                          |

Il faut impérativement adapter le volume du liner au volume gazeux de l'échantillon sous peine de perdre en sensibilité et reproductibilité.

### Pression en tête de colonne

Valeurs en psi, à la vitesse linéaire optimale, gaz vecteur

Hélium à 100°C

| Ø int. mm | Longueur en m |     |    |    |    |    |    |     |  |
|-----------|---------------|-----|----|----|----|----|----|-----|--|
|           | 10            | 12  | 15 | 25 | 30 | 50 | 60 | 120 |  |
| 0,1       |               | 44  | 57 |    |    |    |    |     |  |
| 0,15      | 15            | 18  |    | 41 | 50 | 87 |    |     |  |
| 0,2       |               | 8   |    | 17 | 22 | 37 | 46 |     |  |
| 0,25      |               |     | 8  |    | 16 |    | 35 | 74  |  |
| 0,32      |               | 4   | 5  | 8  | 10 | 17 | 20 |     |  |
| 0,53      |               | 1,4 | 2  | 3  | 4  | 6  | 7  |     |  |

### Rapport de phase colonne GC

Rapport = diamètre interne / 4 x épaisseur de film

| Ø int. mm | Epaisseur de film µm |      |      |     |     |    |    |
|-----------|----------------------|------|------|-----|-----|----|----|
|           | 0,1                  | 0,15 | 0,25 | 0,5 | 1   | 3  | 5  |
| 0,15      | 375                  | 250  | 150  | 75  | 37  |    |    |
| 0,2       | 500                  | 333  | 200  | 100 | 50  | 17 |    |
| 0,25      | 625                  | 417  | 250  | 125 | 63  | 21 |    |
| 0,32      | 800                  | 533  | 320  | 160 | 80  | 27 | 16 |
| 0,53      | 1325                 | 883  | 530  | 265 | 132 | 44 | 26 |

Un rapport de phase similaire permet de transférer l'analyse sur une autre colonne sans modifier la méthode.

### Composés non retenus

| Détecteur | Composé                         |
|-----------|---------------------------------|
| MS, TCD   | argon, méthane, butane, air     |
| FID       | méthane, butane                 |
| ECD       | dichlorométhane (vapeurs)       |
| NPD       | acétonitrile (t° colonne 100°C) |
| PID       | éthylène, acétylène             |

### Temps de rétention nulle à la vitesse optimale

| Longueur colonne | Hélium à 25 cm/sec | Hydrogène à 40 cm/sec |
|------------------|--------------------|-----------------------|
| 12 m             | 50                 | 30                    |
| 15 m             | 60                 | 37                    |
| 25 m             | 100                | 60                    |
| 30 m             | 120                | 73                    |
| 50 m             | 200                | 120                   |
| 60 m             | 240                | 146                   |



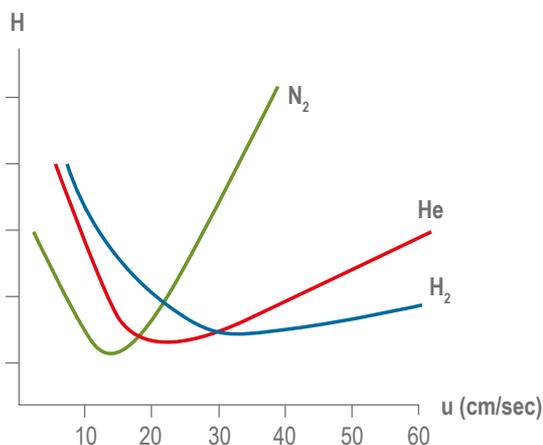
## Efficacité en fonction du diamètre

Efficacité maximale pour un facteur de rétention  $k = 5$

| Ø int. mm | Nombre de plateaux/mètre |
|-----------|--------------------------|
| 0,1       | 12 500                   |
| 0,18      | 6 600                    |
| 0,2       | 5 900                    |
| 0,32      | 4 700                    |
| 0,45      | 2 600                    |
| 0,53      | 2 200                    |

## Efficacité en fonction de la vitesse et de la nature du gaz vecteur

Courbes Van Deemter GC



H (la hauteur d'un plateau théorique) varie énormément en fonction de la vitesse linéaire du gaz vecteur et de sa nature. A haute vitesse, l'hydrogène permet d'atteindre de très hautes efficacités par rapport à l'azote.

## Ordre de sortie des analytes en fonction des colonnes GC

| Composition                                       | Interchim            | Agilent | SGE   | Benzene | Butanol | 2-Pentanone | Nitropropane | Pyridine | Moyenne |     |
|---|----------------------|---------|-------|---------|---------|-------------|--------------|----------|---------|-----|
| Dimethylpolysiloxane                              | UptiBond1            | DB-1    | BP1   | 647     | 646     | 666         | 707          | 722      | 678     |     |
| Diphenyle(5%)-<br>dimethylpolysiloxane(95%)       | UptiBond5<br>premium |         | BP5   | 667     | 665     | 692         | 743          | 746      | 703     |     |
|   |                      |         | BPX5  | 664     | 667     | 697         | 752          | 750      | 706     |     |
|   |                      |         | HT8   | 680     | 673     | 728         | 796          | 780      | 731     |     |
|   |                      |         | HP35  | BPX35   | 728     | 726         | 763          | 862      | 848     | 785 |
|   |                      |         | BP10  | 709     | 774     | 772         | 862          | 832      | 790     |     |
| Cyanopropylphényle(50%)-<br>diméthylsiloxane(50%) | UptiBond225          | DB-225  | BP225 | 824     | 931     | 918         | 1070         | 1014     | 951     |     |
|   |                      |         | BP20  | 947     | 1153    | 998         | 1217         | 1185     | 1100    |     |
|   |                      |         | BPX70 | 1067    | 1219    | 1170        | 1365         | 1300     | 1224    |     |

Données issues de documents SGE

Les indices de rétention de cinq composés montrent les différences et ressemblances de chaque phase stationnaire. Le tableau indique les réponses des composés de références (indices de rétention) par rapport à neuf phases SGE de la moins polaire BP1 à la plus polaire BPX70.

Ces valeurs sont calculées par rapport à une série homologuée d'alcane ayant un indice de rétention propre, égal à 100 fois leur nombre de carbones.



### Phases liquides (Classées par polarité croissante)

| Phase                                  | (Solvant)<br>min/max(°C) |
|--|--------------------------|
| Squalane                               | (T) 20/150               |
| Nujol                                  | (T) 20/100               |
| Apiezon H                              | (C) 20/300               |
| Apiezon L                              | (C) 50/300               |
| Apiezon M                              | (C) 50/300               |
| SF 96                                  | (C) 20/250               |
| Apiezon J                              | (C) 20/300               |
| Apiezon N                              | (C) 50/300               |
| SE30                                   | (C) 50/350               |
| OV-1 (G9)                              | (C) 100/350              |
| Silicone UCW 982                       | (C,T) 0/250              |
| DC 200 (12,500 cstks.)                 | (C) 20/250               |
| OV-101 (G1)                            | (C) 20/350               |
| DC-41                                  | (A) 20/300+              |
| Versilube F-50                         | (C) 20/300               |
| DC 11                                  | (C) 20/300               |
| SE 52 (G27)                            | (C) 50/300               |
| SE 54                                  | (C) 100/300              |
| OV-3                                   | (C) 20/350               |
| OV-105                                 | (C) 250                  |
| Halocarbon 10-25                       | (C) 20/100               |
| Halocarbon K-352                       | (F) 0/250                |
| Dexsil 300                             | (C) 50/400               |
| Fluorolube HG 1200                     | (A) 0/200                |
| Kel F Wax                              | (A) 20/220               |
| Halocarbon Wax                         | (A) 50/150               |
| Apiezon H                              | (C) 20/300               |
| Alltech PS 300                         | (C) 350                  |
| Dexsil 400                             | (C) 50/500               |
| OV-7 (G32)                             | (A) 20/3                 |
| DC 550                                 | (C) 20/225               |
| Di(2-ethylhexyl) sebacate (G11)        | (A)-20/125               |
| SP-1200                                | (C) 25/200               |
| Diisodecyl adipate                     | (M) -20/125              |
| Alltech PS 400                         | (C) 350                  |
| Dilauryl phthalate                     | (M) 20/150               |
| Bis(2-Ethylhexyl) tetrachlorophthalate | (A) 20/150               |
| Diisodecyl phthalate                   | (M)-20/150               |
| Silicone OV-11                         | (C,T) 0/350              |
| Dinonyl phthalate                      | (A) 20/150               |
| DC 710                                 | (A) 20/225               |
| Di(2-ethylhexyl) phthalate             | (M) 150                  |
| Diocetyl phthalate                     | (A)-20/160               |
| Alltech PS 410                         | (C) 50/350               |
| Hallcomid M-18                         | (A) 40/150               |
| Hallcomid M-18 OLM                     | (C) 8/150                |
| Diisooctyl phthalate                   | (M)                      |
| OV-17                                  | (A) 20/350               |
| Dexsil 410                             | (C) 50/50                |
| Span 80                                | (T) 20/150               |
| Castorwax                              | (C) 90/200               |
| OV-22                                  | (C) 20/300               |

| Phase                                  | (Solvant)<br>min/max(°C) |
|--|--------------------------|
| Polypropylene glycol                   | (M) 20/150               |
| Trimer Acid                            | (M) 20/200               |
| Amine 220                              | (C) 20/180               |
| Polypropyleneimine                     | (C) 0/200                |
| UCON LB-1715                           | (M) 20/200               |
| Acetyl tributyl citrate (citroflex A4) | (A) -25/180              |
| UCON 50-HB-280X                        | (M) 20/200               |
| Tricresyl phosphate                    | (M) 25/75                |
| Sucrose acetate isobutyrate (SAIB)     | (C) 20/175               |
| QF-1                                   | (A) 20/250               |
| OV-210 (G6)                            | (A) 20/275+              |
| Ethofat 60/25                          | (C) 50/125               |
| Igepal CO-630                          | (M) 100/200              |
| Tergitol NPX                           | (C) 20/200               |
| UCON 50-HB-2000                        | (A) 20/200               |
| Fluorad FC-431                         | (E) 40/200               |
| Emulphor ON 870                        | (C) 0/200                |
| Triton X-100                           | (M) 20/190               |
| OV 330                                 | (T) 250                  |
| UCON 50-HB-5100                        | (M) 20/200               |
| SP-1220                                | (C) 50/200               |
| Siponate DS-10                         | (C) 20/210               |
| Tween 80                               | (M) 20/160               |
| XE 60 (G26)                            | (A) 20/250               |
| OV-225                                 | (C) 20/250+              |
| Ethylenglycol tetrachlorophthalate     | (C) 120/200              |
| Neopentyl glycol adipate               |                          |
| (HI-EFF-3AP)                           | (C) 50/230               |
| UCON 75-H-90000                        | (M) 20/200               |
| Igepal CO 880 (G31)                    | (C) 100/200              |
| Triton X-305                           | (M) 20/250               |
| Cyclohexanedimethanol succinate        |                          |
| (CHDMS)                                | (C) 100/250              |
| Quadrol                                | (C) 20/150               |
| SP-2510                                | (C) 50/250               |
| PPE-20 (poly-m-phenoxylylene)          | (C) 125/375              |
| Neopentyl glycol succinate             |                          |
| (HI-EFF-3BP)                           | (C) 50/230               |
| PPE-21                                 | (C) 125/375              |
| Igepal CO 990                          | (C) 100/220              |
| Carbowax 4000 monostearate             | (C) 60/200               |
| Carbowax 20 M (G16)                    | (C) 60/225               |
| Carbowax 20 M (Terephthalic acid)      | (C) 60/250               |
| Epon 1001                              | (C) 50/200               |
| Carbowax 6000                          | (C) 60/210               |
| Carbowax 4000                          | (C) 60/200               |
| Polyethyleneimine                      | (A) 0/175                |
| Alltech CS 5                           | (A,C) 275                |
| Silar 5 CP                             | (C) 250                  |
| XF-1150                                | (A) 20/200               |
| FFAP                                   | (C) 50/250               |
| STAP                                   | (C) 100/225              |

| Phase                                  | (Solvant)<br>min/max(°C) |
|--|--------------------------|
| Carbowax 1000                          | (M) 40/150               |
| Carbowax 600                           | (C) 30/125               |
| Ethylene glycol adipate (HI-EFF-2AP)   | (C) 100/210              |
| Butane-1,4-diol succinate (HI-EFF-4BP) | (C) 50/230               |
| Phenyldiethanolamine succinat          |                          |
| (HI-EFF-10BP) G12                      | (C) 20/230               |
| Reoplex 400                            | (A) 20/220               |
| LAC-1-R-296                            | (A) 20/200               |
| Diethylene glycol adipate (HI-EFF-1AP) | (C) 20/210               |
| Carbowax 1540                          | (C) 50/175               |
| LAC-2-R-466                            | (A) 50/200               |
| Hyprose SP-80                          | (M) 20/225               |
| Silicone APOLAR-7CP (ex SILAR-7CP)     | (C) 50/275               |
| ECNSS-S                                | (C) 30/210               |
| Diglycerol                             | (M) 20/150               |
| Alltech CS8                            | (A,C) 275                |
| Ethylene glycol phthalate (HI-EFF-2GP) | (C) 100/210              |
| Silicone APOLAR-9CP (ex SILAR-9CP)     | (C) 50/275               |
| Diethylene glycol succinate            |                          |
| (HI-EFF-1BP)                           | (C) 20/200               |
| SP-216-PS                              | (C) 25/200               |
| Ethylene glycol succinate (HI-EFF-2BP) | (C) 100/                 |

#### Abréviations des solvants :

- A : Acétone
- C : Chloroforme
- F : Fréon
- M : Méthanol
- E : Acétate



Colonnes remplies à façon, voir page D.125



## Head space (espace de tête)

Les composés volatils d'un échantillon liquide ou solide diffusent dans le flacon en formant une phase gazeuse en tête du flacon. Le but est d'analyser, de façon qualitative ou quantitative, les composants présents dans ce gaz, souvent en couplant la SPME (microextraction) avec la GC.

Cette technique est aussi utilisée lorsque l'échantillon ne doit pas être injecté en totalité dans l'appareil qui pourrait être dégradé par des impuretés.

En pratique, elle est particulièrement adaptée à l'analyse de traces issues des matrices suivantes :

- COV dans les eaux usées ou les terres contaminées
- Solvants résiduels dans les emballages
- Solvants résiduels dans les produits pharmaceutiques
- Alcoolémie, toxicologie
- Aromatiques dans les aliments

### Principe de base

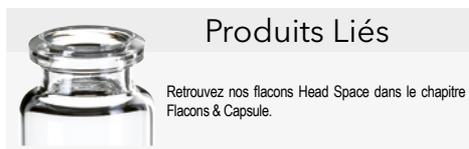
La préparation se réalise dans un flacon contenant l'échantillon, le solvant de dilution, un modificateur de matrice et l'espace de tête. Un échantillon de gaz de l'espace de tête est injecté en GC pour la séparation de tous les analytes volatils.

La tendance pour un composé à passer en phase gazeuse est déterminée par la constante de partage  $K = C_c/C_g$

$C_c$ , la concentration de l'analyte dans la phase condensée (la matrice de l'échantillon) ;

$C_g$ , la concentration dans la phase gazeuse (l'espace de tête).

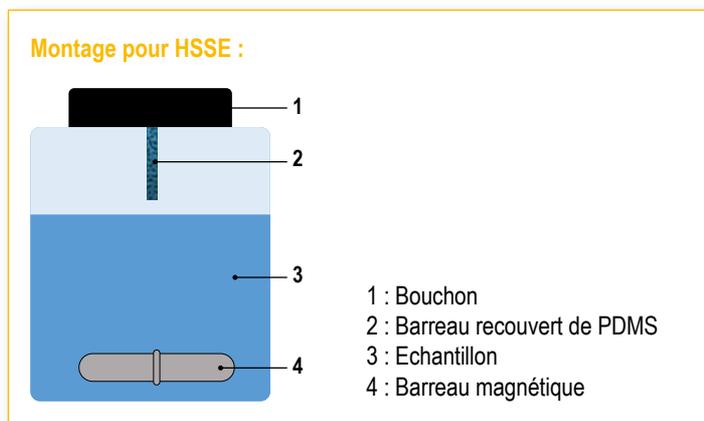
Plus K est petit, plus le composé est présent dans la phase gazeuse et meilleure est l'analyse.



## Head space sorptive extraction (HSSE)

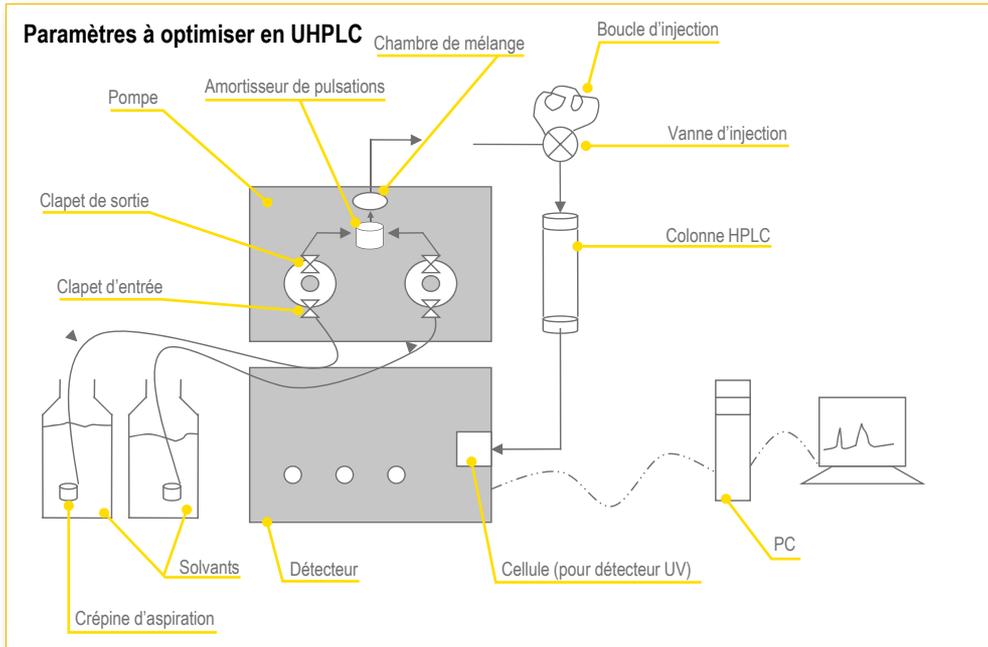
Il s'agit d'une technique destinée à fixer les composés volatils d'une matrice, sur un barreau de polydiméthylsiloxane (PDMS), pour ensuite les désorber afin de les analyser. Un barreau recouvert de PDMS est suspendu au bouchon d'un flacon dans la phase gazeuse. L'échantillon est introduit dans le flacon fermé et agité à l'aide d'un barreau magnétique pour favoriser le passage des composés volatils de la phase liquide à la phase gazeuse.

Les analytes sont ensuite envoyés dans un analyseur GC par une unité de désorption thermique.

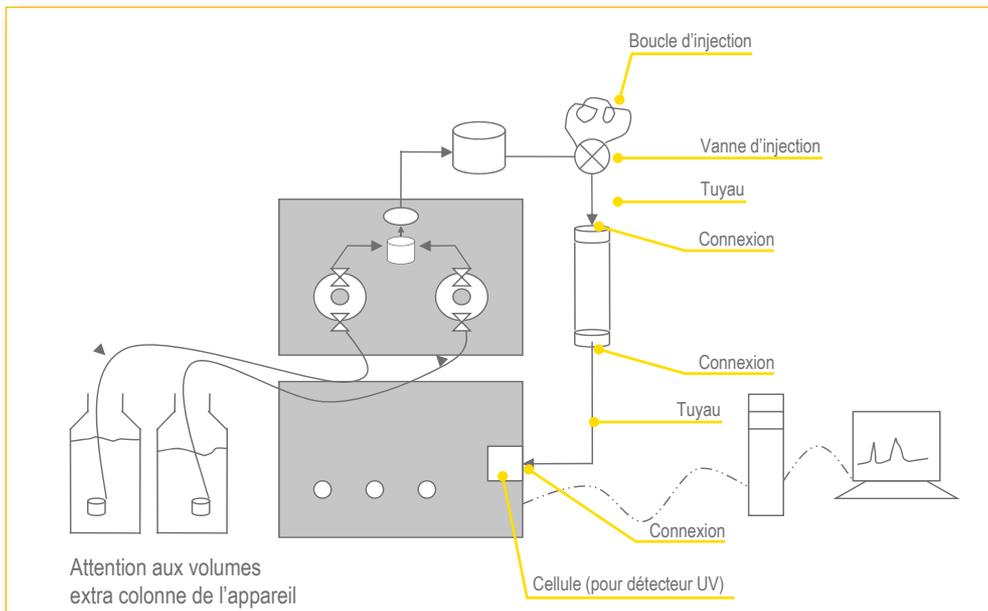




### Schéma d'ensemble chaîne HPLC



### Volumes extra colonne du système



Ces points critiques peuvent provoquer la dilution de l'échantillon injecté, qui se caractérisera par l'élargissement des pics.



## Transfert simple de gradient sur un même système HPLC

|                        | Colonne d'origine | Nouvelle colonne  |
|------------------------|-------------------|---|
| Dimensions             | 150 x 4,6 mm      | 50 x 2,1 mm   |
| Débit                  | D1 : 1 mL/min     | D2 : 0,2 mL/min   |
| $T_0$                  | 85 s              | 29 s  |
| $V_0$ ( $T_0$ x débit) | V1 : 1,42 mL      | V2 : 0,1 mL   |
| Temps gradient         | G1 : 10 min       | $G1 \times V2/V1 \times D1/D2 \rightarrow G2 : 3,5$ min |

Le système HPLC peut aussi générer des volumes extra colonne non négligeables (chambre de mélange, tubulures non adaptées) qui créent un décalage du gradient.

## Décalage des gradients, volume de délai (dwell volume)

Les appareils destinés à l'analyse UHPLC (pression supérieure à 400 bar) sont configurés pour minimiser les volumes morts du système et interférer au minimum dans le décalage des gradients.

Les appareils standards HPLC (pression inférieure à 400 bar) créent en général des décalages de gradient non négligeables lorsque l'on utilise des colonnes de faibles longueurs et diamètres.

La totalité des volumes depuis l'endroit où les solvants se mélangent (souvent la chambre de mélange), jusqu'à l'endroit où l'échantillon est déposé pour injection sur la colonne, constitue le **volume de délai**. Il est mesurable en programmant un gradient et en mesurant le temps réellement nécessaire à sa réalisation par rapport à la programmation.

Ce **volume de délai** représente le volume qui retardera tous les gradients programmés.

On admet en général que le volume minimal d'un gradient doit correspondre au volume mort de la colonne plus le **volume de délai** du système.

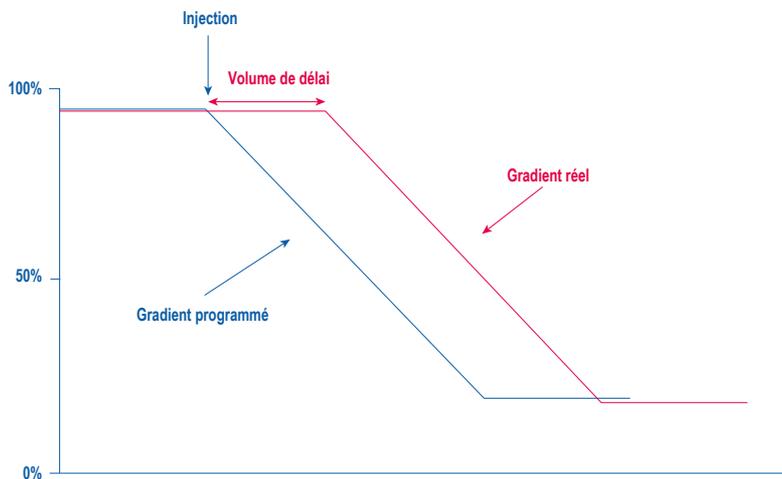
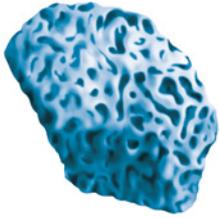


Illustration montrant le déphasage entre le moment où la colonne est traversée par le gradient et ce qui est programmé sur la machine.



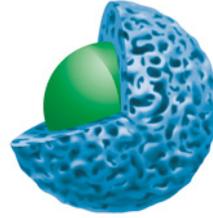
### Caractéristiques des silices



Silice irrégulière poreuse



Silice sphérique poreuse

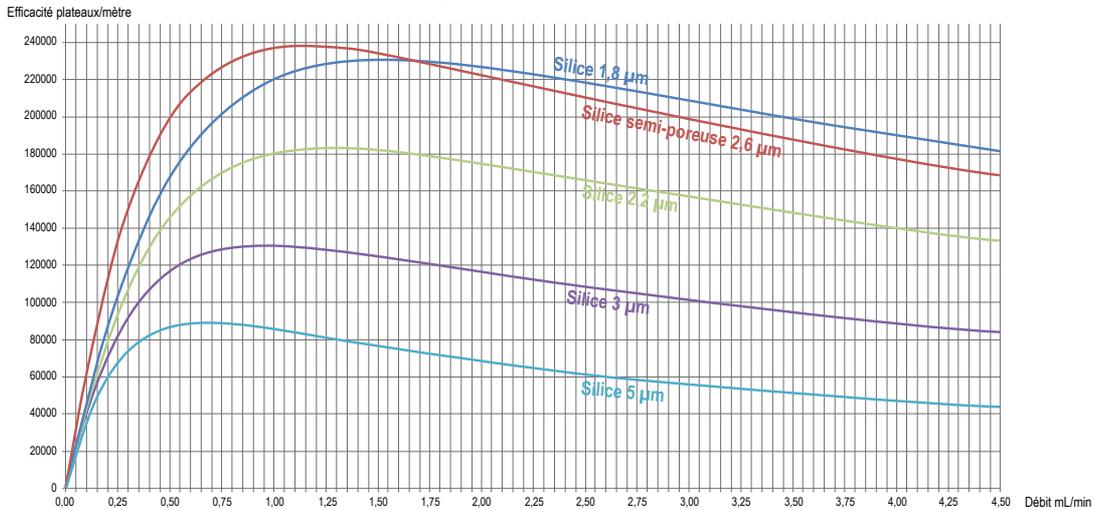


Silice sphérique superficiellement poreuse (Core Shell)

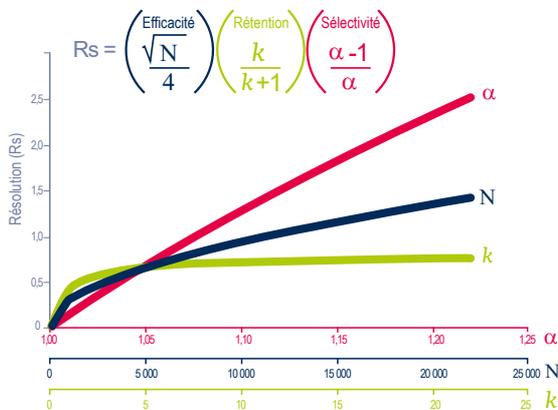
|   |                  |
|---|------------------|
| Type du greffage et taux de couverture ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) | <i>influence</i> |
| Type de silice (pure ou non, % métaux)                                | <i>influence</i> |
| Granulométrie ou diamètre des particules ( $\mu\text{m}$ )            | <i>influence</i> |
| Diamètre des pores (Ångström)   | <i>influence</i> |
| Volume poreux (mL/g)  | <i>influence</i> |
| Surface spécifique ( $\text{m}^2/\text{g}$ )                          | <i>influence</i> |

- Sélectivité**
- Asymétrie des pics**
- Efficacité**
- Exclusion des analytes**
- Volume de rétention nulle**
- Capacité de charge**

### Influence du débit sur l'efficacité pour une colonne de diamètre 4,6 mm

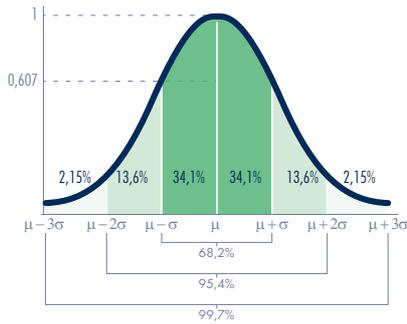


### Influence de la sélectivité, de l'efficacité et de la rétention sur la résolution

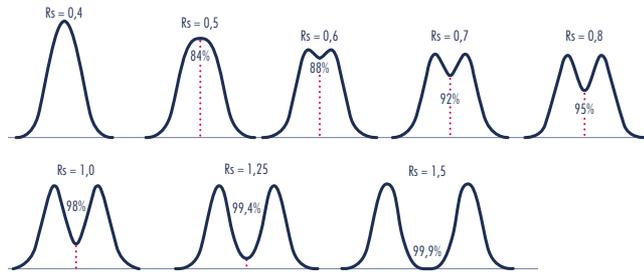




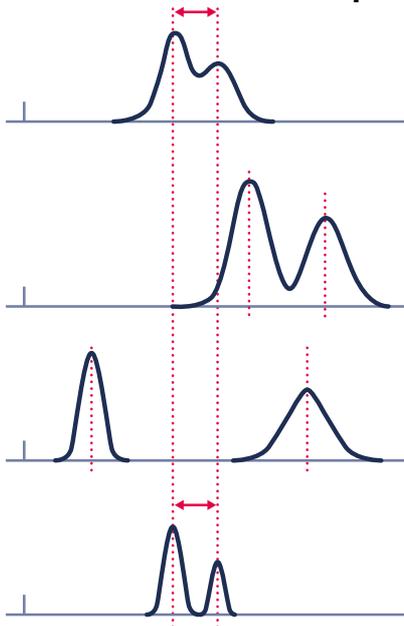
## Représentation gaussienne d'un pic



## Allure des chromatogrammes en fonction de la résolution $R_s$ et des hauteurs relatives des pics



## Comment améliorer une séparation ?



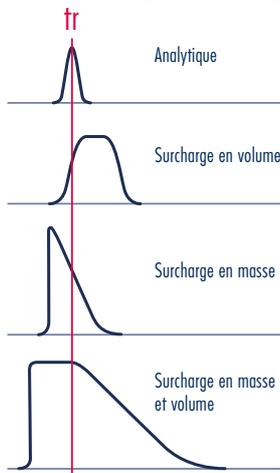
Diamètre des particules élevé et séparation incomplète

### Amélioration en :

- augmentant la rétention en diminuant la force éluante
- augmentant la quantité de phase stationnaire (taille de la colonne)
- changeant de phase stationnaire
- modifiant la sélectivité (gradient, proportion des solvants, choix d'autres solvants)
- augmentant l'efficacité (nombre de plateaux) (diamètre de particules plus petit)

↔ Séparation évaluée par la sélectivité  $\alpha$  (LC) ou le  $\Delta R_f$  (CCM)

## Effet de la quantité injectée







## Injection de l'échantillon : volume et charge

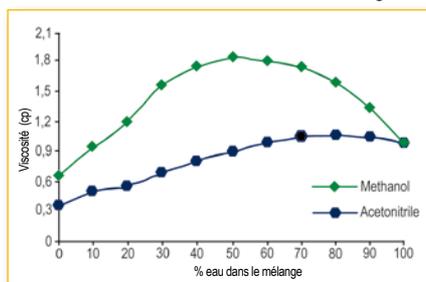
| Type de colonne  | Dimensions (mm) | Débit (mL)   | Volume injectable (µL)<br>0,2% à 1% de V <sub>0</sub> en analyse<br>1% à 10% de V <sub>0</sub> en préparative | Masse injectable (mg) | Diamètre interne de tubulure recommandé (mm) |
|------------------|-----------------|--------------|---|-----------------------|--|
| Capillaire       | 0,32            | 0,001 - 0,02 | 0,02 - 0,15   | 0,01                  | 0,1  |
| Microbore        | 250 x 1         | 0,02 - 0,1   | 0,2 - 1,5   | 0,1                   | 0,13   |
| Analytique       | 250 x 4,6       | 0,5 - 2,0    | 5 - 25  | 2                     | 0,15 - 0,25                                  |
| Semi-préparative | 250 x 10        | 3 - 20       | 100 - 1000  | 10 - 200              | 0,25 - 0,5                                   |
| Préparative      | 250 x 20        | 10 - 100     | 500 - 5000  | 50 - 1000             | 0,5 - 1                                      |

Volume mort V<sub>0</sub> = 55% à 60% du volume géométrique de la colonne.

La masse injectable de l'échantillon est approximativement proportionnelle au carré du diamètre de la colonne.

## Viscosité méthanol/eau et acétonitrile/eau

Variation de la viscosité entre les mélanges méthanol/eau et acétonitrile/eau.



## Concentration

| %         | puissance 10       | ppm    | ppb        | mg/mL ou µg/µL |
|-----------|--------------------|--------|------------|----------------|
| 1         | 10 <sup>-2</sup>   | 10 000 | 10 000 000 | 10             |
| 0,5       | 5x10 <sup>-3</sup> | 5 000  | 5 000 000  | 5              |
| 0,2       | 2x10 <sup>-3</sup> | 2 000  | 2 000 000  | 2              |
| 0,1       | 1x10 <sup>-3</sup> | 1 000  | 1 000 000  | 1              |
| 0,05      | 5x10 <sup>-4</sup> | 500    | 500 000    | 0,5            |
| 0,02      | 2x10 <sup>-4</sup> | 200    | 200 000    | 0,2            |
| 0,01      | 1x10 <sup>-4</sup> | 100    | 100 000    | 0,1            |
| 0,005     | 5x10 <sup>-5</sup> | 50     | 50 000     | 0,05           |
| 0,002     | 2x10 <sup>-5</sup> | 20     | 20 000     | 0,02           |
| 0,001     | 1x10 <sup>-5</sup> | 10     | 10 000     | 0,01           |
| 0,0005    | 5x10 <sup>-6</sup> | 5      | 5 000      | 0,005          |
| 0,0002    | 2x10 <sup>-6</sup> | 2      | 2 000      | 0,002          |
| 0,0001    | 1x10 <sup>-6</sup> | 1      | 1 000      | 0,001          |
| 0,00005   | 5x10 <sup>-7</sup> | 0,5    | 500        | 0,0005         |
| 0,00002   | 2x10 <sup>-7</sup> | 0,2    | 200        | 0,0002         |
| 0,00001   | 1x10 <sup>-7</sup> | 0,1    | 100        | 0,0001         |
| 0,000005  | 5x10 <sup>-8</sup> | 0,05   | 50         | 0,00005        |
| 0,000002  | 2x10 <sup>-8</sup> | 0,02   | 20         | 0,00002        |
| 0,000001  | 1x10 <sup>-8</sup> | 0,01   | 10         | 0,00001        |
| 0,0000005 | 5x10 <sup>-9</sup> | 0,005  | 5          | 0,000005       |
| 0,0000002 | 2x10 <sup>-9</sup> | 0,002  | 2          | 0,000002       |
| 0,0000001 | 1x10 <sup>-9</sup> | 0,001  | 1          | 0,000001       |

## Tampons usuels en HPLC

| Tampon                          | pKa        | Gamme du Tampon |
|---------------------------------|------------|-----------------|
| Phosphate                       | 2,1 (pK1)  | 1,1 - 3,1       |
| Phosphate                       | 7,2 (pK2)  | 6,2 - 8,2       |
| Phosphate                       | 12,3 (pK3) | 11,3 - 13,3     |
| Citrate                         | 3,1 (pK1)  | 2,1 - 4,1       |
| Citrate                         | 4,7 (pK2)  | 3,7 - 5,7       |
| Citrate                         | 6,4 (pK3)  | 5,4 - 7,4       |
| Formate                         | 3,8        | 2,8 - 4,8       |
| Acétate                         | 4,8        | 3,8 - 5,8       |
| Tri(hydroxyméthyl) aminométhane | 8,3        | 7,3 - 9,3       |
| Borate                          | 9,2        | 8,2 - 10,2      |
| Diéthylamine                    | 10,5       | 9,5 - 11,5      |

## Tampons compatibles MS

| Tampon                        | pKa      |
|-------------------------------|----------|
| TFA (acide trifluoroacétique) | 2        |
| Formiate                      | 3,8      |
| Acetate                       | 4,8      |
| Carbonate                     | 6,4-10,3 |
| Ammonium                      | 9,2      |

Un tampon demeure efficace sur une plage comprise entre +/-1,5 pKa



### Paramètres usuels HPLC en fonction des dimensions des colonnes

| Dimensions colonnes analytiques |                         |                        |                   | Variable selon porosité et granulométrie des silices |                            |   |                                       |   |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------|--|----------------------------|---|---------------------------------------|---|
| dimensions mm                   | section cm <sup>2</sup> | volume cm <sup>3</sup> | rappor / ø 4,6 mm | rappor / ø 21,2 mm                                   | débit conventionnel mL/min | t <sub>é</sub> ro pour silice poreuse 5 µm secondes | volume poreux moy 55% cm <sup>3</sup> | volume injectable maxi<br>1% Volume poreux en analyse<br>1% à 5% Volume poreux en préparative |
| 50 x 0,5                        | 0,00196                 | 0,0098                 | 0,012             |  | 0,01                       |   | 0,0054                                | 0,05 µL   |
| 150 x 0,5                       | 0,00196                 | 0,0294                 | 0,012             |  | 0,01                       |   | 0,0162                                | 0,15 µL   |
| 250 x 0,5                       | 0,00196                 | 0,0490                 | 0,012             |  | 0,01                       |   | 0,0270                                | 0,3 µL  |
| 30 x 1,0                        | 0,00785                 | 0,0235                 | 0,047             |  | 0,05                       |   | 0,0129                                | 0,1 µL  |
| 50 x 1,0                        | 0,00785                 | 0,0392                 | 0,047             |  | 0,05                       |   | 0,0216                                | 0,2 µL  |
| 75 x 1,0                        | 0,00785                 | 0,0588                 | 0,047             |  | 0,05                       |   | 0,0323                                | 0,3 µL  |
| 100 x 1,0                       | 0,00785                 | 0,0784                 | 0,047             |  | 0,05                       |   | 0,0431                                | 0,4 µL  |
| 150 x 1,0                       | 0,00785                 | 0,1176                 | 0,047             |  | 0,05                       |   | 0,0647                                | 0,6 µL  |
| 250 x 1,0                       | 0,00785                 | 0,1960                 | 0,047             |  | 0,05                       |   | 0,1078                                | 1 µL  |
| 30 x 2,1                        | 0,03460                 | 0,104                  | 0,208             |  | 0,2                        |   | 0,057                                 | 0,6 µL  |
| 50 x 2,1                        | 0,03460                 | 0,173                  | 0,208             |  | 0,2                        |   | 0,095                                 | 1 µL  |
| 75 x 2,1                        | 0,03460                 | 0,260                  | 0,208             |  | 0,2                        |   | 0,143                                 | 1,5 µL  |
| 100 x 2,1                       | 0,03460                 | 0,346                  | 0,208             |  | 0,2                        |   | 0,190                                 | 2 µL  |
| 150 x 2,1                       | 0,03460                 | 0,519                  | 0,208             |  | 0,2                        |   | 0,285                                 | 3 µL  |
| 250 x 2,1                       | 0,03460                 | 0,865                  | 0,208             |  | 0,2                        |   | 0,476                                 | 5 µL  |
| 30 x 3,0                        | 0,07065                 | 0,212                  | 0,425             |  | 0,5                        |   | 0,12                                  | 1 µL  |
| 50 x 3,0                        | 0,07065                 | 0,353                  | 0,425             |  | 0,5                        |   | 0,19                                  | 2 µL  |
| 75 x 3,0                        | 0,07065                 | 0,530                  | 0,425             |  | 0,5                        |   | 0,29                                  | 3 µL  |
| 100 x 3,0                       | 0,07065                 | 0,706                  | 0,425             |  | 0,5                        |   | 0,39                                  | 4 µL  |
| 150 x 3,0                       | 0,07065                 | 1,060                  | 0,425             |  | 0,5                        |   | 0,58                                  | 6 µL  |
| 250 x 3,0                       | 0,07065                 | 1,766                  | 0,425             |  | 0,5                        |   | 0,97                                  | 10 µL   |
| 30 x 4,6                        | 0,166                   | 0,498                  | 1                 | 0,047  | 1                          |   | 0,27                                  | 3 µL  |
| 50 x 4,6                        | 0,166                   | 0,831                  | 1                 | 0,047  | 1                          | 27  | 0,46                                  | 5 µL  |
| 75 x 4,6                        | 0,166                   | 1,246                  | 1                 | 0,047  | 1                          | 41  | 0,69                                  | 7 µL  |
| 100 x 4,6                       | 0,166                   | 1,661                  | 1                 | 0,047  | 1                          | 55  | 0,91                                  | 9 µL  |
| 150 x 4,6                       | 0,166                   | 2,492                  | 1                 | 0,047  | 1                          | 82  | 1,37                                  | 14 µL   |
| 250 x 4,6                       | 0,166                   | 4,153                  | 1                 | 0,047  | 1                          | 137   | 2,284                                 | 23 µL   |
| 50 x 7,8                        | 0,478                   | 2,39                   | 2,88              | 0,135  | 3                          |   | 1,31                                  | 13-65 µL  |
| 100 x 7,8                       | 0,478                   | 4,78                   | 2,88              | 0,135  | 3                          |   | 2,63                                  | 25-125 µL   |
| 150 x 7,8                       | 0,478                   | 7,16                   | 2,88              | 0,135  | 3                          |   | 3,94                                  | 40-200 µL   |
| 250 x 7,8                       | 0,478                   | 11,94                  | 2,88              | 0,135  | 3                          |   | 6,57                                  | 65-325 µL   |
| 30 x 10                         | 0,785                   | 2,4                    | 4,73              | 0,223  | 5                          |   | 1,29                                  | 13-65 µL  |
| 50 x 10                         | 0,785                   | 3,9                    | 4,73              | 0,223  | 5                          |   | 2,16                                  | 20-100 µL   |
| 100 x 10                        | 0,785                   | 7,8                    | 4,73              | 0,223  | 5                          |   | 4,32                                  | 40-200 µL   |
| 150 x 10                        | 0,785                   | 11,8                   | 4,73              | 0,223  | 5                          |   | 6,47                                  | 65-325 µL   |
| 250 x 10                        | 0,785                   | 19,6                   | 4,73              | 0,223  | 5                          |   | 10,79                                 | 100-500 µL  |
| 30 x 21,2                       | 3,528                   | 10,6                   | 21,24             | 1  | 20                         |   | 5,82                                  | 60-300 µL   |
| 50 x 21,2                       | 3,528                   | 17,6                   | 21,24             | 1  | 20                         |   | 9,70                                  | 100-500 µL  |
| 100 x 21,2                      | 3,528                   | 35,3                   | 21,24             | 1  | 20                         |   | 19,40                                 | 0,2-1 mL  |
| 150 x 21,2                      | 3,528                   | 52,9                   | 21,24             | 1  | 20                         |   | 29,11                                 | 0,3-1,5 mL  |
| 250 x 21,2                      | 3,528                   | 88,2                   | 21,24             | 1  | 20                         |   | 48,51                                 | 0,5-2,5 mL  |
| 50 x 28                         | 6,157                   | 31                     | 37,07             | 1,75   | 35                         |   | 16,93                                 | 170-850 µL  |
| 100 x 28                        | 6,157                   | 62                     | 37,07             | 1,75   | 35                         |   | 33,86                                 | 0,35-1,75 mL  |
| 150 x 28                        | 6,157                   | 93                     | 37,07             | 1,75   | 35                         |   | 51,35                                 | 0,5-2,5 mL  |
| 250 x 28                        | 6,157                   | 154                    | 37,07             | 1,75   | 35                         |   | 84,67                                 | 0,85-4,25 mL  |
| 50 x 30                         | 7,065                   | 35                     | 42,56             | 2  | 40                         |   | 19,36                                 | 0,2-1 mL  |
| 100 x 30                        | 7,065                   | 71                     | 42,56             | 2  | 40                         |   | 38,83                                 | 0,4-2 mL  |
| 150 x 30                        | 7,065                   | 106                    | 42,56             | 2  | 40                         |   | 58,19                                 | 0,6-3 mL  |
| 250 x 30                        | 7,065                   | 176                    | 42,56             | 2  | 40                         |   | 97,02                                 | 1-5 mL  |
| 250 x 40                        | 12,566                  | 314                    | 75,65             | 3,56   | 75                         |   | 172,79                                | 1,7-8,5 mL  |
| 50 x 50                         | 19,625                  | 98                     | 118,14            | 5,56   | 120                        |   | 53,97                                 | 0,55-2,75 mL  |
| 100 x 50                        | 19,625                  | 196                    | 118,14            | 5,56   | 120                        |   | 107,94                                | 1,1-5,5 mL  |
| 150 x 50                        | 19,625                  | 294                    | 118,14            | 5,56   | 120                        |   | 161,91                                | 1,6-8 mL  |
| 250 x 50                        | 19,625                  | 491                    | 118,14            | 5,56   | 120                        |   | 269,84                                | 2,7-13,5 mL   |
| 250 x 80                        | 50,265                  | 1256                   | 302,59            | 14,25  | 300                        |   | 690,80                                | 7-35 mL   |
| 250 x 100                       | 78,5                    | 1962                   | 472,77            | 22,3   | 450                        |   | 1079,10                               | 10-50 mL  |



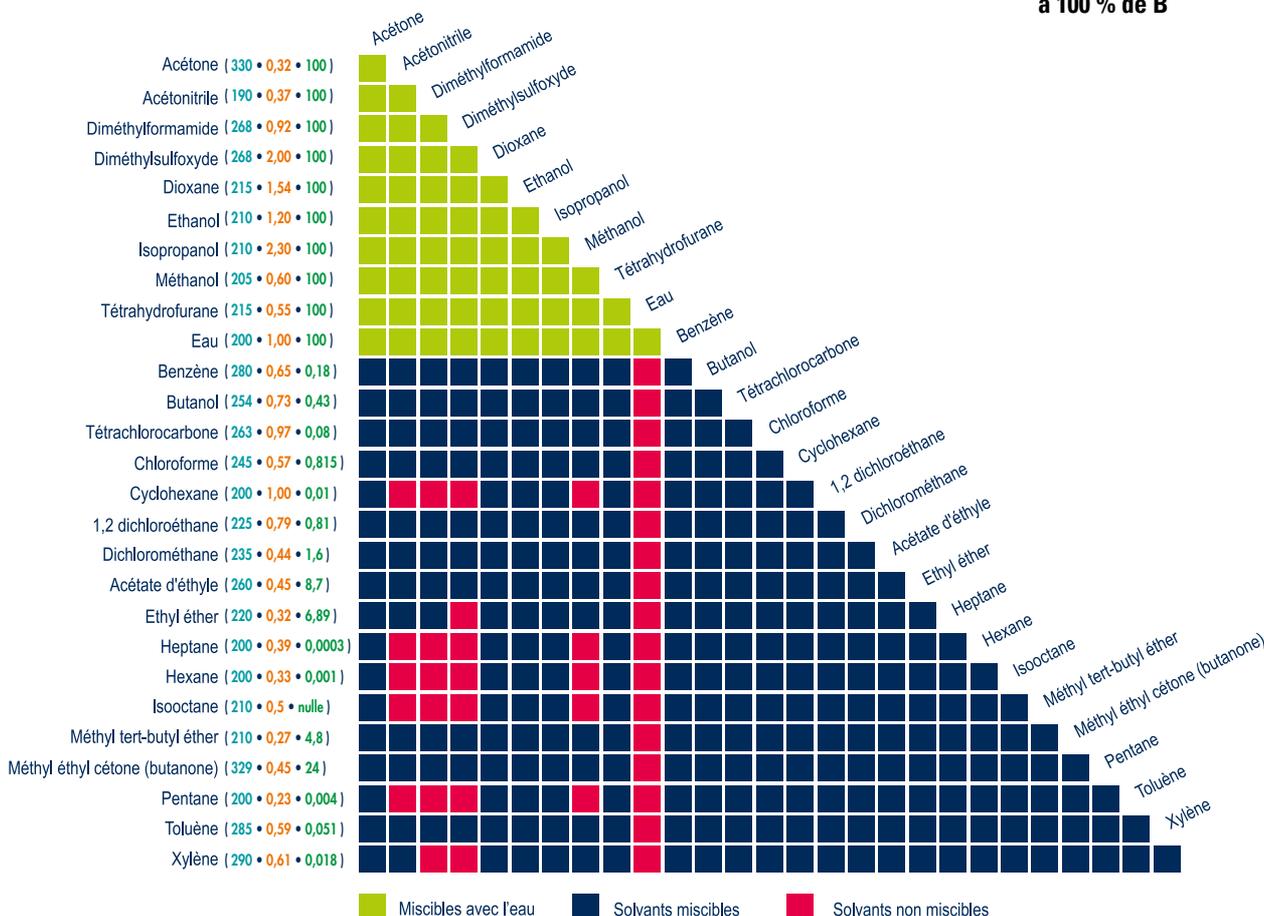
### Procédures de rinçage

Avant la régénération, vérifier la miscibilité de son éluant. Les volumes de rinçage sont donnés pour une colonne 250 x 4,6 mm.

|   |  |  |   |   |
|---|--|--|---|---|
| <p><b>Silice vierges :</b><br/> <b>Hexane : 30 mL</b><br/> <b>Dichlorométhane : 30 mL</b><br/> <b>Isopropanol : 30 mL</b><br/> <b>Dichlorométhane : 30 mL</b><br/> <b>Phase mobile</b><br/> <b>Élimination de l'eau : 20 mL de 2,2-diméthoxypropane (5 %) dans hexane</b></p> | <p><b>Echange d'ions (SAX, SCX, NH<sub>2</sub>,...):</b><br/> <b>Eau distillée : 30 mL</b><br/> <b>Méthanol : 30 mL</b><br/> <b>Acétonitrile : 30 mL</b><br/> <b>Dichlorométhane : 30 mL</b><br/> <b>Méthanol : 25 mL</b><br/> <b>Phase mobile</b></p> | <p><b>Phases inverses (C18, C8, C6, C1, CN, NH<sub>2</sub>):</b><br/> <b>Eau distillée + 15 %</b><br/> <b>Méthanol : 30 mL</b><br/> <b>Acétonitrile : 30 mL</b><br/> <b>Dichlorométhane : 30 mL</b><br/> <b>Hexane : 30 mL</b><br/> <b>Dichlorométhane : 30 mL</b><br/> <b>Acétonitrile : 30 mL</b><br/> <b>Phase mobile</b></p> | <p><b>Phases polaires (CN, NH<sub>2</sub>, Diol, Hilic):</b><br/> <b>Chloroforme : 30 mL</b><br/> <b>Isopropanol : 30 mL</b><br/> <b>Dichlorométhane : 30 mL</b><br/> <b>Phase mobile</b></p> | <p><b>Protéines (larges pores) (C18, C8, C4, phenyl):</b><br/> <b>Procédure n°1</b><br/> <b>Eau : 50 mL</b><br/> <b>TFA 0,1% : 30 mL</b><br/> <b>Isopropanol : 30 mL</b><br/> <b>Acétonitrile : 30 mL</b><br/> <b>Eau : 30 mL</b><br/> <b>Phase mobile</b><br/> <b>Procédure n°2</b><br/> <b>- Solvant A : 0,1 %TFA dans l'eau</b><br/> <b>- Solvant B : 0,1 %TFA dans l'Acétonitrile/ Isopropanol (50/50)</b><br/> <b>Puis gradient de 25 % à 100 % de B</b></p> |
|---|--|--|---|---|

### Tableau de miscibilité des solvants

UV Cut off (nm) • Viscosité (Cpoise) • Solubilité dans l'eau (%/eau)





### Colonnes pharmacopée

| Code USP | Description   | Silice   |   |  |
|----------|---|--|---|--|
| L1       | Octadecylsilane chemically bonded to porous or non-porous silica or ceramic micro-particles, 1.5 to 10 µm in diameter, or a monolithic rod  | Uptisphere® CS Evolution™ C18-RP<br>Uptisphere® CS Evolution™ C18-AQ<br>Uptisphere® HSC<br>Uptisphere® PAH<br>Uptisphere® Strategy™ RP<br>Uptisphere® 300A WOD | Uptisphere® CS Evolution™ C18-HB<br>Uptisphere® ODB<br>Uptisphere® NEC (none end Capped)<br>Uptisphere® Strategy™ C18-3<br>Uptisphere® X-Series OD2 | Uptisphere® CS Evolution™ C18<br>Uptisphere® HDO<br>Uptisphere® TF<br>Uptisphere® Strategy™ C18-HQ |
| L3       | Porous silica particles, 1.5 to 10 µm in diameter, or a monolithic silica rod.  | Uptisphere® CS Evolution™ HIT<br>Uptisphere® Strategy™ Silica  | Uptisphere® CS Evolution™ Silica<br>Uptisphere® Strategy™ Hilic-HIT   | Uptisphere® Silica   |
| L7       | Octylsilane chemically bonded to totally or superficially porous silica particles, 1.5 to 10 µm in diameter, or a monolithic silica rod.  | Uptisphere® C8   | Uptisphere® X-Series C8   |  |
| L8       | An essentially monomolecular layer of aminopropylsilane chemically bonded to totally porous silica gel support, 1.5 to 10 µm in diameter  | Uptisphere® NH2  |   |  |
| L9       | Irregular or spherical, totally porous silica gel having a chemically bonded, strongly acidication-exchange coating, 3 to 10 µm in diameter   | Uptisphere® SCX  |   |  |
| L10      | Nitrile groups chemically bonded to porous silica particles, 1.5 to 10 µm in diameter   | Uptisphere® CN   |   |  |
| L11      | Phenyl groups chemically bonded to porous silica particles, 1.5 to 10 µm in diameter  | Uptisphere® Strategy™ PHC4   |   |  |
| L12      | "A strong anion-exchange packing made by chemically bonding a quaternary amine to a solid silica spherical core, 30 to 50 µm in diameter"   | puriFlash® SAX   |   |  |
| L14      | Silica gel having a chemically bonded, strongly basic quaternary ammonium anion-exchange coating, 5 to 10 µm in diameter.   | Uptisphere® SAX  |   |  |
| L20      | "Dihydroxypropane groups chemically bonded to porous silica or hybrid particles, 1.5 to 10 µm in diameter"  | Uptisphere® OH (Diol)  |   |  |
| L26      | Butyl silane chemically bonded to totally porous silica particles, 1.5 to 10 µm in diameter   | Uptisphere® 300A WT4   | Uptisphere® 300A WC4  | Uptisphere® 300A WD4   |
| L27      | Porous silica particles, 30 to 50 µm in diameter  | puriFlash® Silica  |   |  |
| L44      | A multifunctional support, which consists of a high purity, 60 Å, spherical silica substrate that has been bonded with a cationic exchanger, sulfonic acid functionality in addition to a convention reversed phase C8 functionality  | puriFlash® MM1 (RP/SCX)  |   |  |
| L52      | A strong cation exchange resin made of porous silica with sulfopropyl groups, 5 to 10 µm in diameter  | Uptisphere® SCX  |   |  |
| L78      | A silane ligand that consists of both reversed-phase (an alkyl chain longer than C8) and anion-exchange (primary, secondary, tertiary, or quaternary amino groups) functional groups chemically bonded to porous or non-porous or ceramic micro-particles, 1.0 to 50 µm in diameter or a monolithic rod | Upti-Prep® MM3   | Upti-Prep® MM4  |  |



## Eléments préliminaires avant optimisation

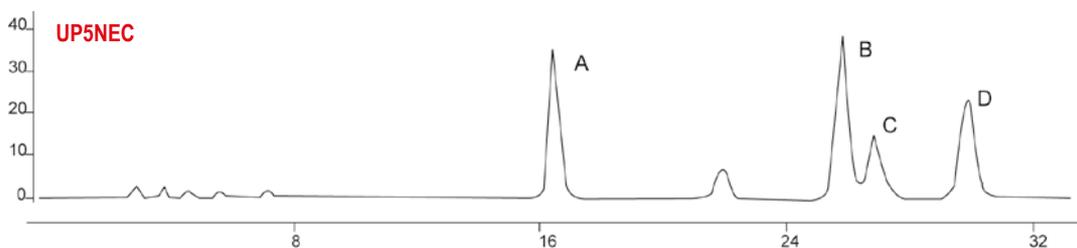
Compte tenu de la structure des 4 agents anti-UV à analyser (cf. Développement de méthode), il est possible d'améliorer la séparation, soit en jouant sur le pourcentage d'eau dans la phase mobile, soit en changeant la température d'analyse.

Cela pourra être utile sur une colonne donnée pour diminuer le temps d'analyse, ou bien, si la séparation des solutés n'est totale sur aucune de nos phases, pour trouver des conditions où leur séparation est améliorée.

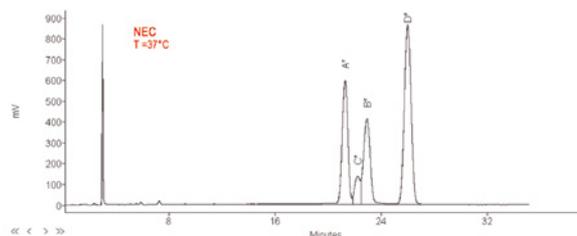
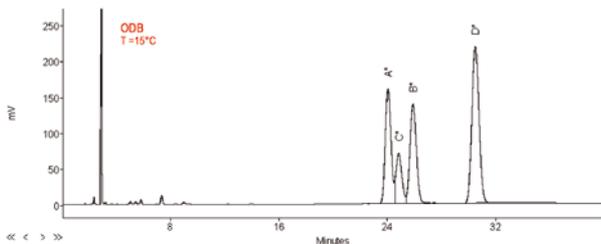
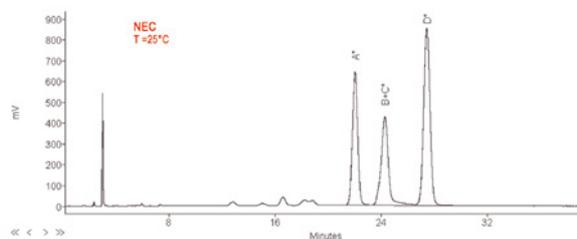
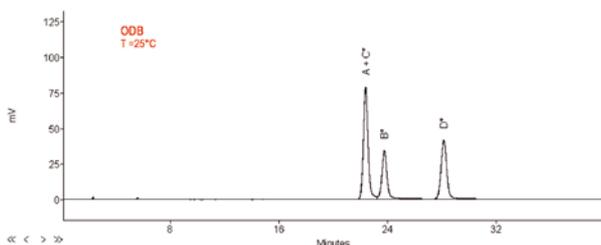
Dans les deux cas cela nécessite de faire 2 expériences complémentaires :

- soit enregistrer le chromatogramme à des compositions plus et moins riches
- soit enregistrer le chromatogramme à deux températures plus et moins 10°C de celle de l'expérience initiale

Nous montrons ci-dessous le net changement de séparation sur la phase NEC à 25°C en jouant sur un changement de 8 % de la composition de la phase mobile MeOH/H<sub>2</sub>O par rapport aux conditions initiales du développement de méthode.



Nous montrons ci-dessous l'amélioration de la séparation sur la phase ODB en passant de 25 à 15°C ou en passant de 25°C à 37°C sur la phase NEC en milieu MeCN/H<sub>2</sub>O.

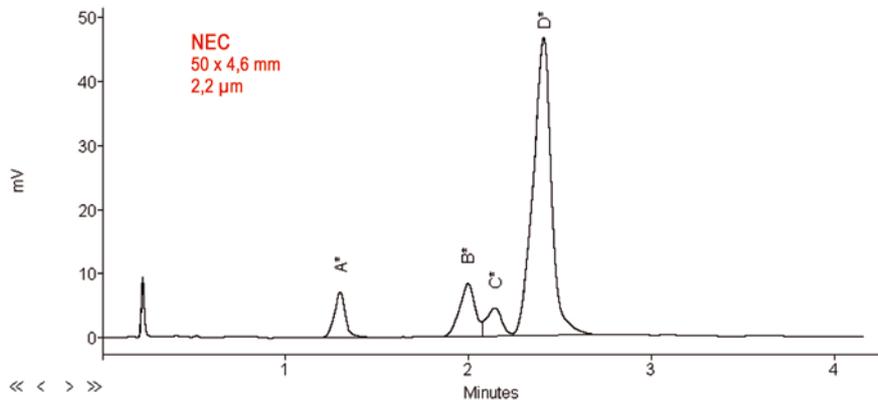
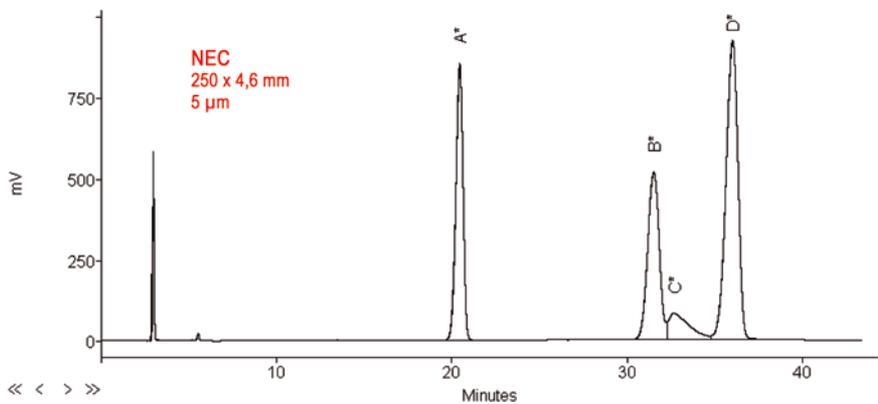
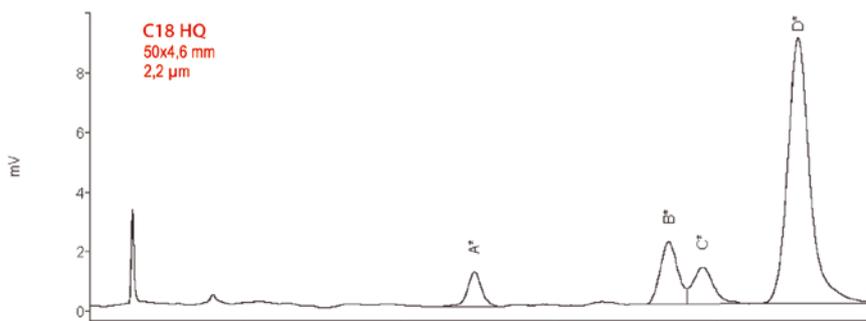
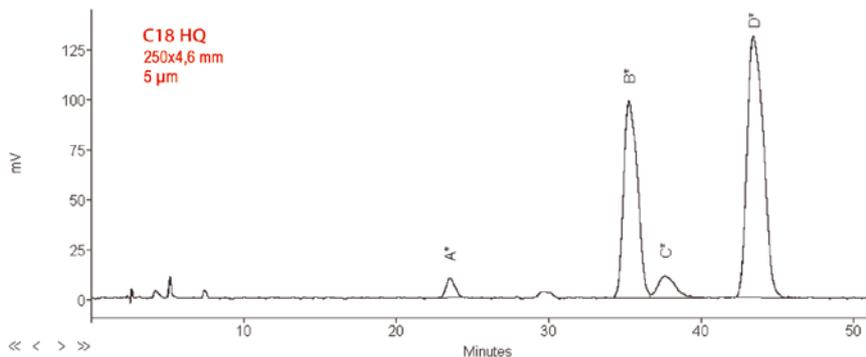


Rappelons que, pour une phase stationnaire donnée, si la paire de solutés mal séparés n'est pas la même dans la phase mobile méthanol-eau que dans la phase mobile acétonitrile-eau déterminées par nos règles d'équivalence, il est possible de trouver une composition ternaire de phase mobile permettant la séparation (non montré ici).

Enfin, si vous voulez gagner en temps d'analyse, comme les paramètres thermodynamiques de chacune de nos phases sont identiques lorsqu'on change le diamètre des particules, vous obtiendrez le même chromatogramme dans un temps divisé par un facteur 5 en passant d'une colonne 250 mm 5 µm à une colonne 110 mm 2,2 µm, en adaptant le débit de travail.

En passant sur une colonne de 50 mm 2,2 µm on perd un peu en résolution mais on gagne encore un facteur 2 en temps d'analyse.

En utilisant directement notre règle de transfert à partir des résultats obtenus sur la Kromasil C18, nous présentons ci-dessous à titre d'exemple les chromatogrammes obtenus sur 2 de nos phases de géométrie 250 x 4,6 mm, 5 µm et 50 x 4,6 mm, 2,2 µm.





## Classification des solvants selon Trappe

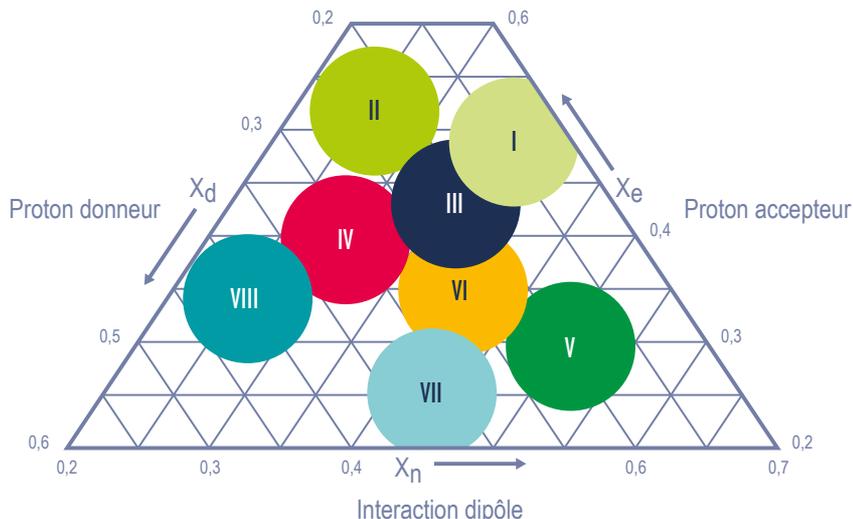
Elle est exprimée en séries éluotropes classées en force éluante croissante

- Basée sur l'énergie d'adsorption par unité de surface de la phase stationnaire
- Le pentane est utilisé comme référence

| Solvant                 | ξ <sub>0</sub> Silica Virgin | ξ <sub>0</sub> Alumina | ξ <sub>0</sub> Silica Diol | ξ <sub>0</sub> Silica CN | ξ <sub>0</sub> Silica NH <sub>2</sub> | ξ <sub>0</sub> Silica C18.C4.C8.PH.RPAQ | ξ <sub>0</sub> Magnésie | ξ <sub>0</sub> Florisil |
|-------------------------|------------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------------------|---|-------------------------|-------------------------|
| Acetone                 | 0.470                        | 0.560                  | 0.141                      | 0.470                    | 0.470                                 |   | 0.325                   | 0.291                   |
| Acetonitrile            | 0.501                        | 0.650                  | 0.150                      | 0.501                    | 0.501                                 | 0.577                                   | 0.377                   | 0.338                   |
| Benzene                 | 0.246                        | 0.319                  | 0.074                      | 0.246                    | 0.246                                 |   | 0.185                   | 0.166                   |
| Butanol                 | 0.550                        | 0.714                  | 0.165                      | 0.550                    | 0.550                                 |   | 0.414                   | 0.371                   |
| Carbon tetrachloride    | 0.139                        | 0.180                  | 0.042                      | 0.139                    | 0.139                                 |   | 0.104                   | 0.094                   |
| Chloroform              | 0.260                        | 0.400                  | 0.078                      | 0.260                    | 0.260                                 |   | 0.232                   | 0.208                   |
| Cyclohexane             | 0.030                        | 0.0400                 | 0.000                      | 0.000                    | 0.000                                 |   | 0.023                   | 0.021                   |
| Cyclopentane            | 0.000                        | 0.05                   | 0.000                      | 0.000                    | 0.000                                 |   | 0.029                   | 0.026                   |
| 1,2-Dichloroethane      | 0.339                        | 0.490                  | 0.102                      | 0.339                    | 0.339                                 |   | 0.284                   | 0.255                   |
| Dichloromethane         | 0.323                        | 0.420                  | 0.097                      | 0.323                    | 0.323                                 |   | 0.244                   | 0.218                   |
| Diethylamine            | 0.485                        | 0.630                  | 0.146                      | 0.485                    | 0.485                                 |   | 0.365                   | 0.328                   |
| Diethyl ether           | 0.385                        | 0.380                  | 0.115                      | 0.385                    | 0.385                                 |   | 0.220                   | 0.198                   |
| Diisopropyl ether       | 0.223                        | 0.280                  | 0.067                      | 0.223                    | 0.223                                 |   | 0.162                   | 0.146                   |
| N,N-Dimethylformamide   | 0.640                        | 0.831                  | 0.192                      | 0.640                    | 0.640                                 |   | 0.482                   | 0.432                   |
| Dimethyl sulfoxide      | 0.470                        | 0.620                  | 0.141                      | 0.470                    | 0.470                                 |   | 0.360                   | 0.322                   |
| Dioxane                 | 0.490                        | 0.560                  | 0.147                      | 0.490                    | 0.490                                 |   | 0.325                   | 0.291                   |
| Ethanol                 | 0.677                        | 0.879                  | 0.203                      | 0.677                    | 0.677                                 |   | 0.510                   | 0.457                   |
| Ethyl acetate           | 0.380                        | 0.580                  | 0.114                      | 0.380                    | 0.380                                 |   | 0.336                   | 0.302                   |
| Heptane                 | 0.000                        | 0.000                  | 0.000                      | 0.000                    | 0.000                                 |   | 0.000                   | 0.000                   |
| Hexane                  | 0.000                        | 0.010                  | 0.000                      | 0.000                    | 0.000                                 |   | 0.006                   | 0.005                   |
| Hexanol                 | 0.385                        | 0.500                  | 0.115                      | 0.385                    | 0.385                                 |   | 0.290                   | 0.260                   |
| Isooctane               | 0.000                        | 0.010                  | 0.000                      | 0.000                    | 0.000                                 |   | 0.006                   | 0.005                   |
| Isopropanol             | 0.590                        | 0.820                  | 0.177                      | 0.590                    | 0.590                                 |   | 0.476                   | 0.426                   |
| Isopropyl chloride      | 0.223                        | 0.290                  | 0.067                      | 0.223                    | 0.223                                 |   | 0.168                   | 0.151                   |
| Methanol                | 0.732                        | 0.950                  | 0.219                      | 0.732                    | 0.732                                 | 0.450                                   | 0.551                   | 0.494                   |
| Methyl acetate          | 0.393                        | 0.510                  | 0.118                      | 0.393                    | 0.393                                 |   | 0.296                   | 0.265                   |
| Methyl ethyl ketone     | 0.393                        | 0.510                  | 0.118                      | 0.393                    | 0.393                                 |   | 0.296                   | 0.265                   |
| Methyl tert-butyl ether | 0.470                        | 0.610                  | 0.141                      | 0.470                    | 0.470                                 |   | 0.354                   | 0.317                   |
| Pentane                 | 0.000                        | 0.000                  | 0.000                      | 0.000                    | 0.000                                 |   | 0.000                   | 0.000                   |
| Petroleum ether         | 0.000                        | 0.010                  | 0.000                      | 0.000                    | 0.000                                 |   | 0.006                   | 0.005                   |
| Propanol                | 0.631                        | 0.819                  | 0.189                      | 0.631                    | 0.631                                 |   | 0.475                   | 0.426                   |
| Pyridine                | 0.550                        | 0.714                  | 0.165                      | 0.550                    | 0.550                                 |   | 0.414                   | 0.371                   |
| Tetrahydrofuran         | 0.346                        | 0.449                  | 0.104                      | 0.346                    | 0.346                                 | 0.726                                   | 0.261                   | 0.234                   |
| Toluene                 | 0.223                        | 0.290                  | 0.067                      | 0.223                    | 0.223                                 |   | 0.168                   | 0.151                   |
| Water                   |                              |                        |                            |                          |                                       | 0.000                                   |                         |                         |



### Classification de Snyder



|                          | Force éluante (sur silice) | P'   | Groupe (Snyder) | Famille (Snyder)  |
|--------------------------|----------------------------|------|-----------------|---|
| Hexane                   | 0                          | 0,1  |                 |   |
| Iso-octane               | 0,02                       | 0,1  |                 |   |
| Cyclohexane              | 0                          | -0,2 |                 |   |
| Tétrachlorure de carbone | 0,11                       | 1,6  |                 |   |
| Toluène                  | 0,223                      | 2,4  | ● VII           | Hydrocarbures aromatiques, dérivés nitrés, éthers aromatiques     |
| Benzène                  | 0,25                       |      |                 |   |
| Chloroforme              | 0,26                       | 4,1  | ● VIII          | Eau   |
| Chlorure de méthylène    | 0,32                       | 3,1  | ● V             | Chlorure de méthylène, 1-2 dichloroéthane                         |
| Tetrahydrofuran          | 0,35                       | 4    | ● III           | Dérivés de pyridines, sulfoxides                                  |
| Ethyl ether              | 0,30                       | 2,8  | ● I             | Ethers aliphatiques   |
| Acétone                  | 0,43                       | 5,1  | ● VI            | (a) Cétones aliphatiques, esters, dioxanne (b) sulfones, nitriles |
| Acétate d'éthyle         | 0,48                       | 4,4  | ● VI            | (a) Cétones aliphatiques, esters, dioxanne (b) sulfones, nitriles |
| Acétonitrile             | 0,52                       | 5,8  | ● VI            | (a) Cétones aliphatiques, esters, dioxanne (b) sulfones, nitriles |
| Pyridine                 |                            | 5,3  | ● III           | Dérivés de pyridines, sulfoxides                                  |
| Isopropanol              | 0,63                       | 3,9  | ● II            | Alcools aliphatiques  |
| Ethanol                  | 0,68                       | 4,3  | ● II            | Alcools aliphatiques  |
| Méthanol                 | 0,70                       | 5,1  | ● II            | Alcools aliphatiques  |
| Eau                      | >>0,70                     | 10,2 | ● VIII          | Eau   |
| Acide acétique           | >>0,70                     | 6    | ● IV            | Glycols, acide acétique   |

Moins polaire  
Force d'éluant en phase inverse croissante ↑

Plus polaire  
Force d'éluant en phase normale croissante ↓

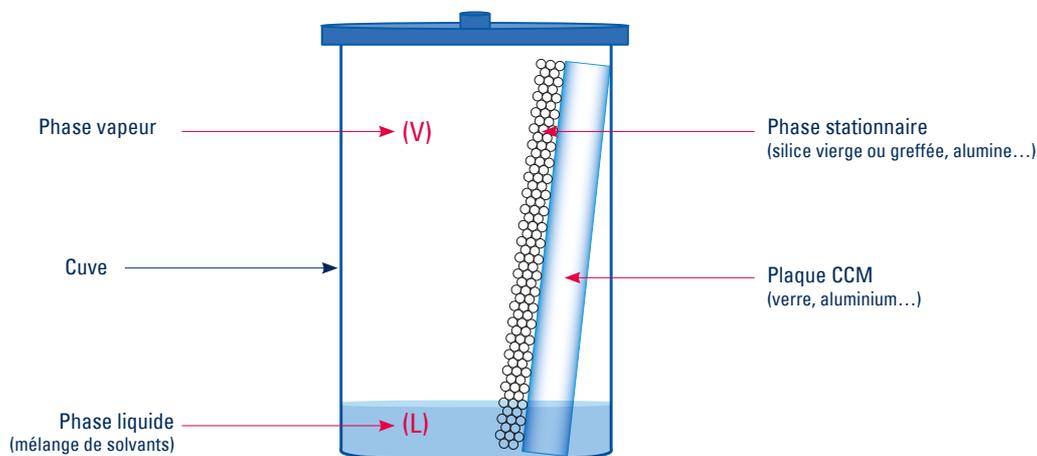
La force éluante  $\epsilon_0$  d'un solvant ne reflète pas les propriétés de ce solvant à savoir les interactions dipôle-dipôle, le pouvoir accepteur ou donneur de proton.

Classement d'une série éluotrope, représentant le  $R_f$  d'un produit de référence élué avec les différents solvants de la liste.



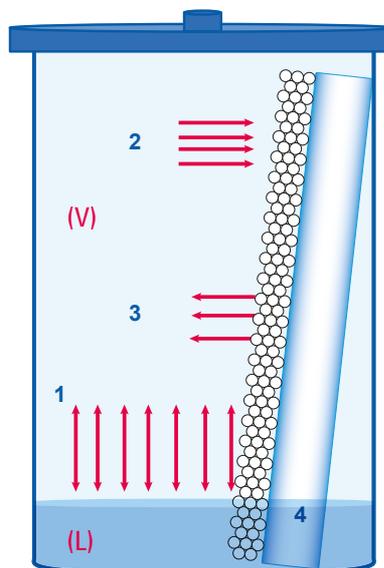
## Principe

La CCM est une chromatographie dans laquelle les solutés restent en contact avec la phase mobile et la phase stationnaire durant la même période de temps. Ils parcourent différentes distances en fonction de leurs interactions avec les deux phases. La rétention de chacun des solutés est caractérisée par le **rapport frontal  $R_f$** .



## Spécificités liées aux phénomènes d'évaporation

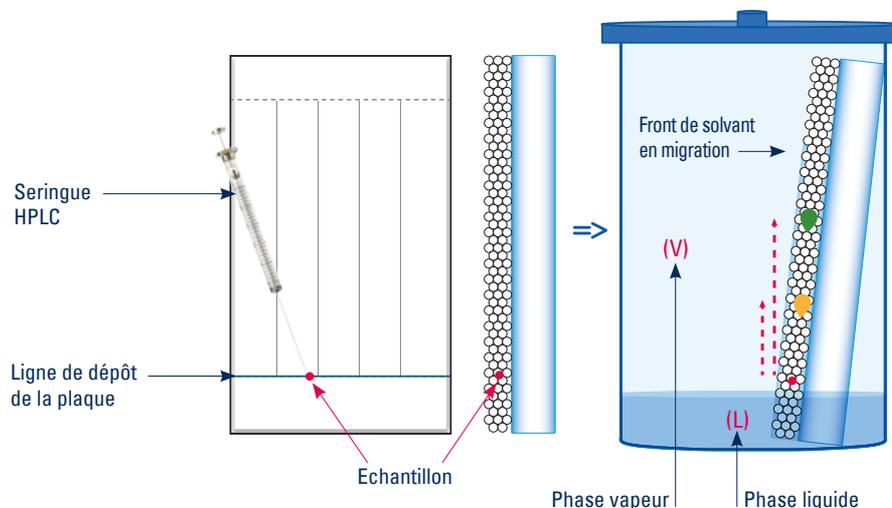
1. Pour un éluant composé de différents solvants, à l'équilibre liquide/vapeur (L/V), la composition de la phase mobile est différente de la phase vapeur car chaque solvant possède une capacité à s'évaporer qui lui est propre.
2. La phase stationnaire s'équilibre avec la phase vapeur par l'adsorption de celle-ci jusqu'à saturation. Si la phase stationnaire est une silice vierge, les vapeurs des solvants polaires sont plus fixées que celle des solvants apolaires. Donc, sa composition est différente de la phase vapeur (V) et de l'éluant (L).
3. Pendant la migration, la phase stationnaire humide se rééquilibre en permanence avec la phase vapeur (V) et les différents composants de la phase mobile peuvent parfois être séparés en conduisant à un front secondaire.





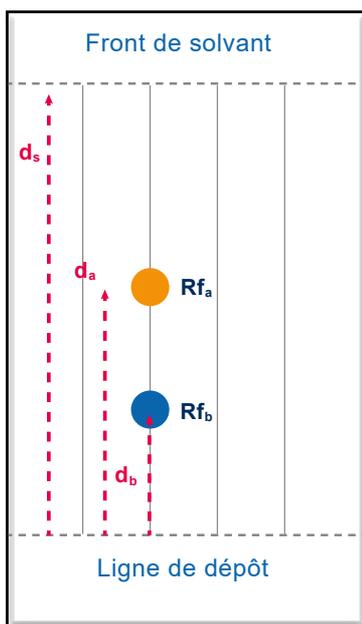
### La migration des analytes

L'échantillon est déposé avec un **capillaire** sur la ligne de dépôt, préalablement tracée, de la plaque CCM qui est plongée dans la cuve contenant la phase mobile. Cette dernière s'élève par capillarité dans la phase stationnaire en emportant chaque analyte qui migre à sa propre vitesse en fonction de son affinité envers l'adsorbant et l'éluant.



### L'interprétation des résultats

Le facteur de rétention ( $R_f$ ) est défini comme le rapport de la distance parcourue par l'analyte ( $d_a$ ) sur la distance parcourue par l'éluant ( $d_s$ )



$$R_{f_a} = d_a / d_s$$
$$R_{f_b} = d_b / d_s$$

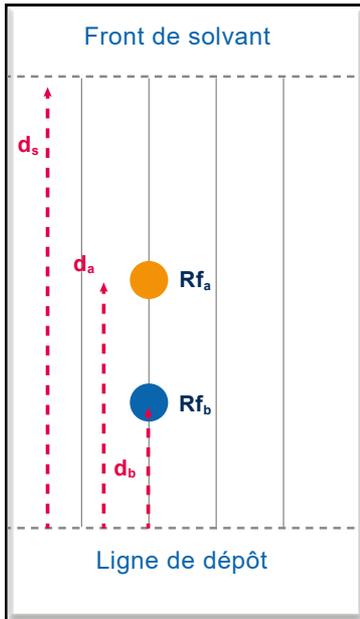
Il en résulte un différentiel de rétention qui donne une idée de la séparation des composés pour des conditions opératoires données :

$$\Delta R_f = R_{f_a} - R_{f_b}$$

La zone idéale de séparation se trouve entre les valeurs  $0,1 \leq R_f \leq 0,4$ , là où les facteurs de rétention correspondent à  $2 \leq k \leq 10$  en chromatographie sur colonne.



### Comparaison CCM et chromatographie liquide sur colonne



Le transfert vers la chromatographie sur colonne impose de raisonner en volume de phase mobile nécessaire pour éluer les analytes. On en déduit la correspondance suivante où l'acronyme CV (aussi appelé Vs) est un nombre sans dimension :

$$Vs_a = CV_a = 1/Rf_a = 1 + k_a$$

$$Vs_b = CV_b = 1/Rf_b = 1 + k_b$$

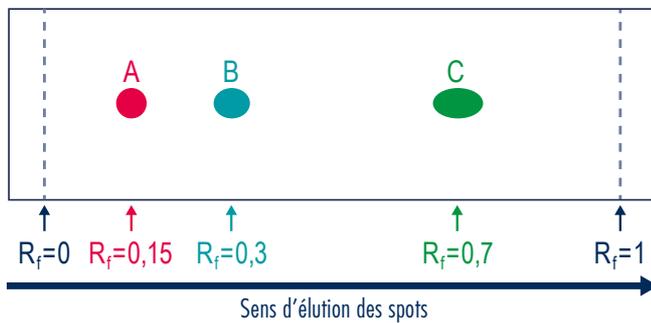
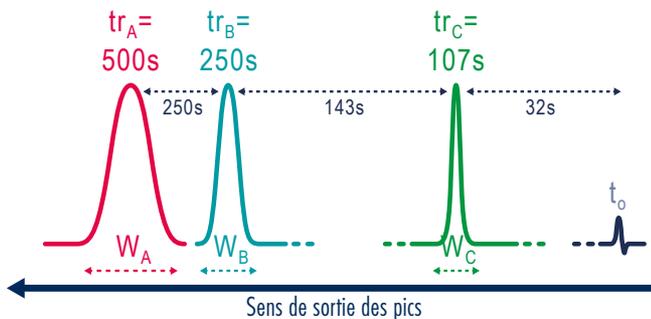
$$\Rightarrow \Delta CV = CV_b - CV_a$$

CV et le facteur de rétention k en HPLC sont liés par une relation mathématique =>

$$k = K_{tr} \times (1/Rf - 1) \text{ et avec } K_{tr} = cste = 1$$

$$\Rightarrow \Delta k = K_{tr} \times [(1/Rf_b - 1) - (1/Rf_a - 1)]$$

$$\Rightarrow CV = \Delta k$$



En théorie, dans un mode d'élution isocratique, il est possible d'être prédictif sur le résultat d'une colonne LC par rapport à une CCM en tenant toutefois compte de variables comme les différences des caractéristiques physico-chimiques des adsorbants utilisés. L'exemple ci-contre montre une transposition idéale pour les conditions ci-dessous :

#### Colonne Flash :

L = 115 mm • Taille des particules = 50 μm

Type Interchim : 25G • Débit = 21 mL/min

$$tr_A = 500 \text{ s} \quad tr_B = 250 \text{ s} \quad tr_C = 107 \text{ s} \quad t_0 = 75 \text{ s}$$

$$Rs_{A/B} = 3,5 \quad Rs_{B/C} = 4,2 \quad Rs_{A/C} = 6,9$$

$$k_A = 5,7 \quad k_B = 2,3 \quad k_C = 0,43$$

$$W_A = 93 \text{ s} \quad W_B = 47 \text{ s} \quad W_C = 20 \text{ s}$$



### Transfert CCM vers la purification

Calcul des paramètres de la colonne analytique et préparative

a) Volume mort  $V_0 = \pi (D^2 / 4) \times L \times \epsilon$  ( $\epsilon$ : porosité totale de la colonne, généralement entre 0,6 et 0,8)

b) Temps mort  $T_0 = V_0 / \text{débit opt.}$  (le débit optimal dépend de la taille des particules et du diamètre interne de la colonne)

La détermination de  $T_0$  est réalisable en utilisant l'uracil ou le  $\text{NaNO}_3$  comme composé non retenu.



250 x 4,6 mm  
 $V_0 = 2,90 \text{ mL}$   
Débit opt. = 0,75 mL/min  
 $T_0 = 3,87 \text{ min}$



250 x 10,0 mm  
 $V_0 = 13,70 \text{ mL}$   
Débit opt. = 3,50 mL/min  
 $T_0 = 3,87 \text{ min}$



250 x 21,2 mm  
 $V_0 = 61,70 \text{ mL}$   
Débit opt. = 16,00 mL/min  
 $T_0 = 3,87 \text{ min}$



250 x 30,0 mm  
 $V_0 = 123,60 \text{ mL}$   
Débit opt. = 32,00 mL/min  
 $T_0 = 3,87 \text{ min}$



250 x 50,8 mm  
 $V_0 = 354,50 \text{ mL}$   
Débit opt. = 92,00 mL/min  
 $T_0 = 3,87 \text{ min}$

### Calcul des conditions préparatives =>

Le débit doit être ajusté en gardant la vitesse linéaire constante entre la colonne analytique et la colonne préparative, en tenant compte de la tailles des particules et de la géométrie de la colonne.

$$F_{\text{prep}} = F_{\text{ana}} \times \left( \frac{id_{\text{prep}}^2}{id_{\text{ana}}^2} \right) \times \left( \frac{d_p \text{ ana}}{d_p \text{ prep}} \right)$$

Exemple :

$$F_{\text{prep}} = 0,75 \times \left( \frac{30,0^2}{4,6^2} \right) \times \left( \frac{5}{15} \right) = 11,0 \text{ mL/min}$$



5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm  
Débit opt. = 0,75 mL/min



15  $\mu\text{m}$ , 250 x 30,0 mm  
Débit = 11,0 mL/min



### Calcul des conditions d'élution en pente de gradient =>

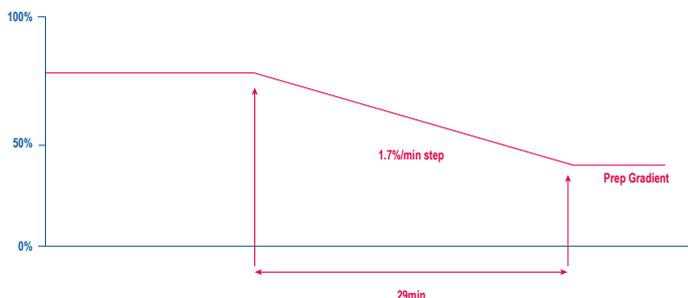
Les compositions initiales et finales doivent rester les mêmes pendant le transfert. La nouvelle pente de gradient est calculée en conservant le facteur « pente x temps mort » constant dans le but d'avoir finalement le même nombre de volumes de colonnes.

$$T_{\text{prep}} = \left( \frac{\%B_{\text{final ana}} - \%B_{\text{initial ana}}}{S_{\text{prep}}} \right)$$

T = temps de la pente de gradient

Exemple :

$$T_{\text{prep}} = \left( \frac{75 - 25}{1.7} \right) = 29\text{min}$$

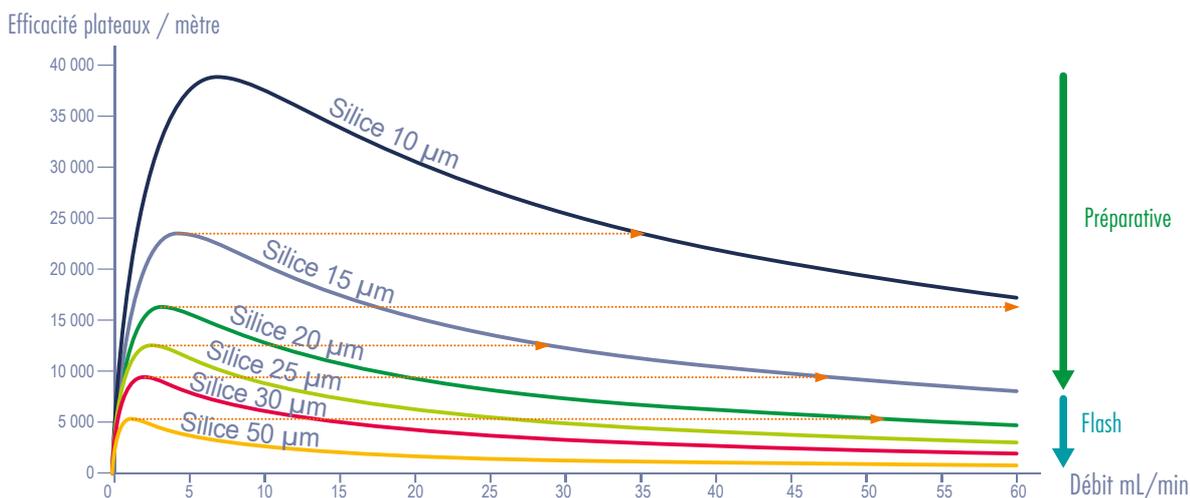


### Influence du débit sur l'efficacité pour une colonne de diamètre 21 mm

(format Flash F0025 Interchim®)

Le débit optimum dépend du diamètre de la colonne et de la taille des particules. Au débit optimum, la colonne présente la plus grande efficacité. La productivité peut être maximisée en augmentant le débit.

Une petite taille de particules permet de réduire le temps de purification, le volume collecté et la consommation de solvant sans trop compromettre la résolution.





### Charge des colonnes (silices non greffées)

Les quantités ci-dessous sont données à titre indicatif, pour des colonnes Flash de 1 g à 1800 g, et peuvent varier en fonction de l'injection de la méthode, des conditions d'élution et des composés à purifier. Elles sont corrélées au delta CV ou delta k représentant les écarts de sélectivités entre les composés en CCM ou en chromatographie sur colonne.

IR: Gel de silice irrégulier - Valeurs moyennes pour les composés <800 MW

HP: Gel de silice haute performance - Valeurs moyennes pour les composés <800 MW

HC: Gel de silice haute capacité - Valeurs moyennes pour les composés <500 MW

| ΔCV ou Δk autour de 7 |    |        |        |       |       |       |        |       |       |       |       |       |
|-----------------------|----|--------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Colonne               |    | F0001  | F0004  | F0012 | F0025 | F0040 | F0080  | F0120 | F0220 | F0330 | F0800 | F1600 |
| 15 μm                 | HP | 0,10 g | 0,45 g | 1,4 g | 2,8 g | 4,5 g | 9,1 g  | 14 g  | 25 g  | 37 g  | ---   | ---   |
|                       | HC | 0,11 g | 0,52 g | 1,6 g | 3,2 g | 5,2 g | 10,4 g | 16 g  | 29 g  | 43 g  | ---   | ---   |
| 20 μm                 | IR | 0,08 g | 0,38 g | 1,1 g | 2,4 g | 3,8 g | 7,6 g  | 11 g  | 21 g  | 31 g  | ---   | ---   |
| 25 μm                 | HC | 0,09 g | 0,40 g | 1,2 g | 2,5 g | 4,0 g | 8,0 g  | 12 g  | 22 g  | 33 g  | 80 g  | 160 g |
| 30 μm                 | HP | 0,07 g | 0,34 g | 1,0 g | 2,1 g | 3,4 g | 6,7 g  | 10 g  | 18 g  | 28 g  | 67 g  | 134 g |
| 50 μm                 | IR | 0,06 g | 0,29 g | 0,9 g | 1,8 g | 2,9 g | 5,8 g  | 9 g   | 16 g  | 24 g  | 58 g  | 116 g |
|                       | HP | 0,06 g | 0,30 g | 0,9 g | 1,9 g | 3,0 g | 6,0 g  | 9 g   | 17 g  | 25 g  | 60 g  | 120 g |
|                       | HC | 0,07 g | 0,35 g | 1,0 g | 2,2 g | 3,5 g | 6,9 g  | 10 g  | 19 g  | 29 g  | 69 g  | 138 g |

| ΔCV ou Δk autour de 5 |    |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------|----|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Colonne               |    | F0001  | F0004  | F0012 | F0025 | F0040 | F0080 | F0120 | F0220 | F0330 | F0800 | F1600 |
| 15 μm                 | HP | 0,09 g | 0,42 g | 1,3 g | 2,6 g | 4,2 g | 8,5 g | 13 g  | 23 g  | 35 g  | ---   | ---   |
|                       | HC | 0,10 g | 0,48 g | 1,5 g | 3,0 g | 4,8 g | 9,7 g | 15 g  | 27 g  | 40 g  | ---   | ---   |
| 20 μm                 | IR | 0,07 g | 0,35 g | 1,0 g | 2,2 g | 3,5 g | 7,0 g | 10 g  | 19 g  | 29 g  | ---   | ---   |
| 25 μm                 | HC | 0,08 g | 0,36 g | 1,1 g | 2,3 g | 3,6 g | 7,3 g | 11 g  | 20 g  | 30 g  | 73 g  | 146 g |
| 30 μm                 | HP | 0,06 g | 0,29 g | 0,9 g | 1,8 g | 2,9 g | 5,7 g | 9 g   | 16 g  | 24 g  | 57 g  | 114 g |
| 50 μm                 | IR | 0,04 g | 0,21 g | 0,6 g | 1,3 g | 2,1 g | 4,2 g | 6 g   | 11 g  | 17 g  | 42 g  | 84 g  |
|                       | HP | 0,05 g | 0,22 g | 0,7 g | 1,4 g | 2,2 g | 4,4 g | 7 g   | 12 g  | 18 g  | 44 g  | 88 g  |
|                       | HC | 0,05 g | 0,25 g | 0,7 g | 1,6 g | 2,5 g | 5,0 g | 7 g   | 14 g  | 21 g  | 50 g  | 100 g |

| ΔCV ou Δk autour de 2 |    |         |        |        |       |       |       |       |       |       |        |       |
|-----------------------|----|---------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| Colonne               |    | F0001   | F0004  | F0012  | F0025 | F0040 | F0080 | F0120 | F0220 | F0330 | F0800  | F1600 |
| 15 μm                 | HP | 0,04 g  | 0,18 g | 0,5 g  | 1,1 g | 1,8 g | 3,5 g | 5 g   | 10 g  | 14 g  | ---    | ---   |
|                       | HC | 0,04 g  | 0,20 g | 0,6 g  | 1,3 g | 2,0 g | 4,0 g | 6 g   | 11 g  | 17 g  | ---    | ---   |
| 20 μm                 | IR | 0,03 g  | 0,14 g | 0,4 g  | 0,9 g | 1,4 g | 2,7 g | 4,1 g | 7 g   | 11 g  | ---    | ---   |
| 25 μm                 | HC | 0,03 g  | 0,14 g | 0,4 g  | 0,9 g | 1,4 g | 2,9 g | 4 g   | 8 g   | 12 g  | 29 g   | 58 g  |
| 30 μm                 | HP | 0,02 g  | 0,10 g | 0,3 g  | 0,6 g | 1,0 g | 2,0 g | 3 g   | 5,5 g | 8,2 g | 20 g   | 40 g  |
| 50 μm                 | IR | 0,015 g | 0,07 g | 0,20 g | 0,4 g | 0,7 g | 1,3 g | 2 g   | 3,7 g | 5,5 g | 13,5 g | 27 g  |
|                       | HP | 0,015 g | 0,07 g | 0,21 g | 0,4 g | 0,7 g | 1,4 g | 2,1 g | 3,9 g | 5,8 g | 14,0 g | 28 g  |
|                       | HC | 0,017 g | 0,08 g | 0,24 g | 0,5 g | 0,8 g | 1,6 g | 2,4 g | 4,4 g | 6,7 g | 16,0 g | 32 g  |



### Charge des colonnes (silices non greffées)

Les quantités ci-dessous sont données à titre indicatif, pour des colonnes Flash de 1 g à 1800 g, et peuvent varier en fonction de l'injection de la méthode, des conditions d'élution et des composés à purifier. Elles sont corrélées au delta CV ou delta k représentant les écarts de sélectivités entre les composés en CCM ou en chromatographie sur colonne.

IR: Gel de silice irrégulier - Valeurs moyennes pour les composés <800 MW

HP: Gel de silice haute performance - Valeurs moyennes pour les composés <800 MW

HC: Gel de silice haute capacité - Valeurs moyennes pour les composés <500 MW

| ΔCV ou Δk autour de 0,8 |    |         |        |        |        |        |        |       |       |       |        |        |
|-------------------------|----|---------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|
| Colonne                 |    | F0001   | F0004  | F0012  | F0025  | F0040  | F0080  | F0120 | F0220 | F0330 | F0800  | F1600  |
| 15 μm                   | HP | 0,014 g | 0,07 g | 0,20 g | 0,41 g | 0,7 g  | 1,3 g  | 2,0 g | 3,6 g | 5,5 g | ---    | ---    |
|                         | HC | 0,016 g | 0,08 g | 0,23 g | 0,47 g | 0,8 g  | 1,5 g  | 2,3 g | 4,2 g | 6,2 g | ---    | ---    |
| 20 μm                   | IR | ---     | 0,05 g | 0,15 g | 0,30 g | 0,5 g  | 1,0 g  | 1,5 g | 2,7 g | 4,0 g | ---    | ---    |
| 25 μm                   | HC | ---     | 0,05 g | 0,16 g | 0,32 g | 0,5 g  | 1,0 g  | 1,6 g | 2,8 g | 4,3 g | 10,5 g | 21,0 g |
| 30 μm                   | HP | ---     | 0,04 g | 0,11 g | 0,22 g | 0,4 g  | 0,71 g | 1,1 g | 2,0 g | 2,9 g | 7,0 g  | 14,0 g |
| 50 μm                   | IR | ---     | ---    | 0,07 g | 0,15 g | 0,24 g | 0,5 g  | 0,7 g | 1,3 g | 2,0 g | 4,8 g  | 9,6 g  |
|                         | HP | ---     | ---    | 0,08 g | 0,16 g | 0,25 g | 0,5 g  | 0,8 g | 1,4 g | 2,1 g | 5,0 g  | 10,0 g |
|                         | HC | ---     | ---    | 0,09 g | 0,18 g | 0,29 g | 0,6 g  | 0,9 g | 1,6 g | 2,4 g | 5,8 g  | 11,6 g |

| ΔCV ou Δk autour de 0,4 |    |       |        |        |        |        |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------|----|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Colonne                 |    | F0001 | F0004  | F0012  | F0025  | F0040  | F0080 | F0120 | F0220 | F0330 | F0800 | F1600 |
| 15 μm                   | HP | ---   | 0,04 g | 0,12 g | 0,25 g | 0,40 g | 0,8 g | 1,2 g | 2,2 g | 3,3 g | ---   | ---   |
|                         | HC | ---   | 0,05 g | 0,14 g | 0,29 g | 0,46 g | 0,9 g | 1,4 g | 2,5 g | 3,8 g | ---   | ---   |
| 20 μm                   | IR | ---   | ---    | 0,09 g | 0,18 g | 0,29 g | 0,6 g | 0,9 g | 1,6 g | 2,4 g | ---   | ---   |
| 25 μm                   | HC | ---   | ---    | 0,09 g | 0,19 g | 0,31 g | 0,6 g | 0,9 g | 1,7 g | 2,6 g | 6 g   | 12 g  |
| 30 μm                   | HP | ---   | ---    | 0,06 g | 0,13 g | 0,21 g | 0,4 g | 0,6 g | 1,2 g | 1,7 g | 4,2 g | 8,5 g |

### Charge des colonnes (silices greffées pour phase normale et phase inverse)

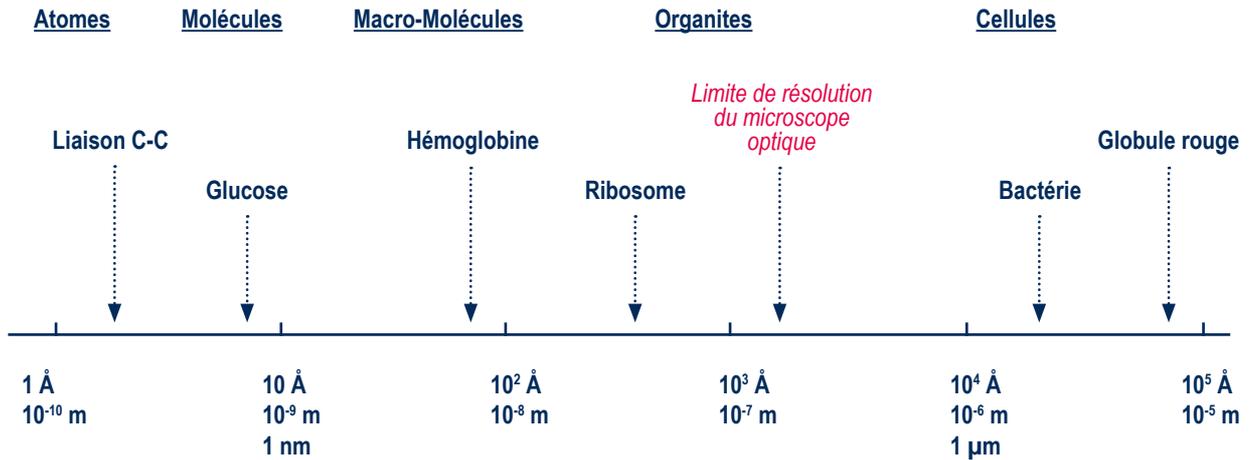
Les quantités ci-dessous sont données à titre indicatif et peuvent varier en fonction de l'injection, de la méthode, des conditions d'élution et des composés à purifier. Elles sont corrélées au delta k représentant les écarts de sélectivités entre les composés en chromatographie sur colonne.

Valeurs en % de la masse d'adsorbant dans la colonne

| Charge exprimée en pourcentage de la masse d'adsorbant contenu dans la colonne |                           |          |          |        |        |        |
|--|---------------------------|----------|----------|--------|--------|--------|
|  |                           | Δk = 0,4 | Δk = 0,8 | Δk = 2 | Δk = 5 | Δk = 7 |
| 15 μm  | 60 Å < pore size < 120 Å  | 0,12 %   | 0,20 %   | 0,55 % | 1,30 % | 1,40 % |
|  | 200 Å < pore size < 300 Å | 0,06 %   | 0,10 %   | 0,25 % | 0,65 % | 0,70 % |
| 30 μm  | 60 Å < pore size < 120 Å  | 0,07 %   | 0,10 %   | 0,30 % | 0,90 % | 1,10 % |
|  | 200 Å < pore size < 300 Å | 0,03 %   | 0,06 %   | 0,15 % | 0,45 % | 0,60 % |
| 50 μm  | 60 Å < pore size < 120 Å  | ...      | 0,08 %   | 0,20 % | 0,70 % | 0,90 % |
|  | 200 Å < pore size < 300 Å | ...      | 0,04 %   | 0,10 % | 0,35 % | 0,50 % |



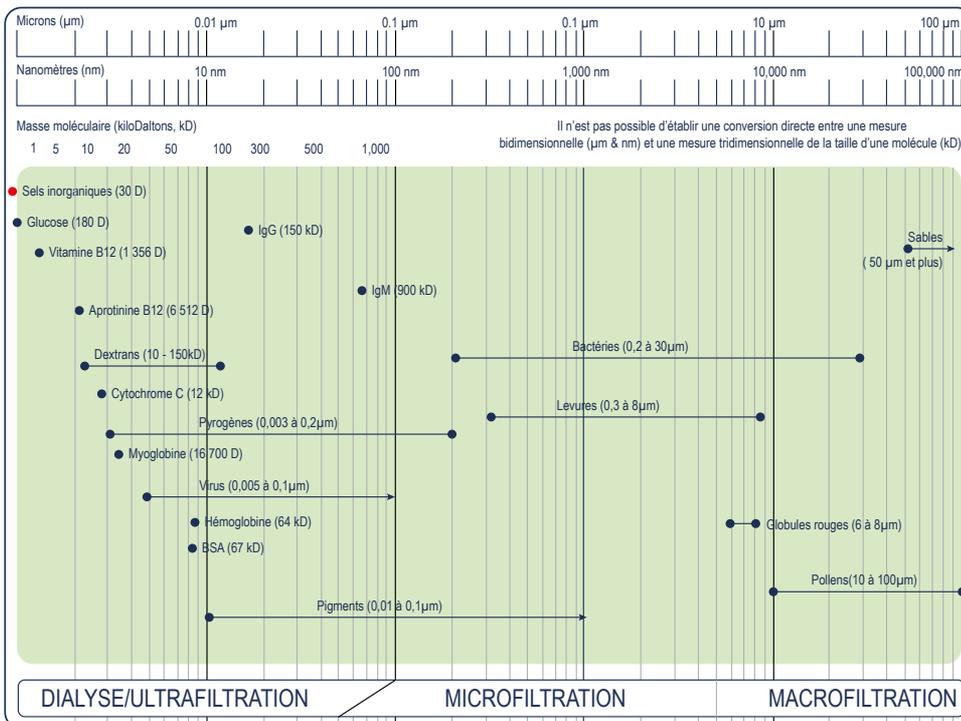
### Dimensions des molécules biologiques



### Limites d'exclusion usuelles en chromatographie sur colonne

|         |  |
|---------|--|
| 100 Å   | 0-2 500 Daltons                        |
| 300 Å   | 150-400 000 Daltons                    |
| 500 Å   | Jusqu'à 1 million de Daltons           |
| 1 000 Å | Jusqu'à environ 1,5 million de Daltons |
| 4 000 Å | Plusieurs million de Daltons           |

### Limites d'exclusion par filtration

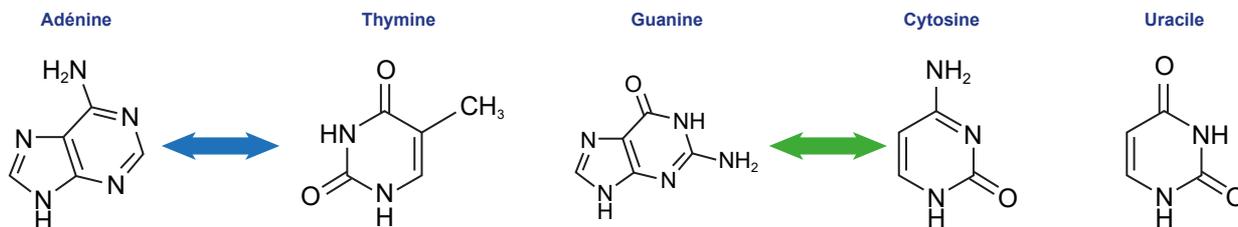




## Purines, pyrimidines, ADN, ARN

Les cinq bases nitrées :

Pour l'ADN : adénine (A), thymine (T), guanine (G), cytosine (C)

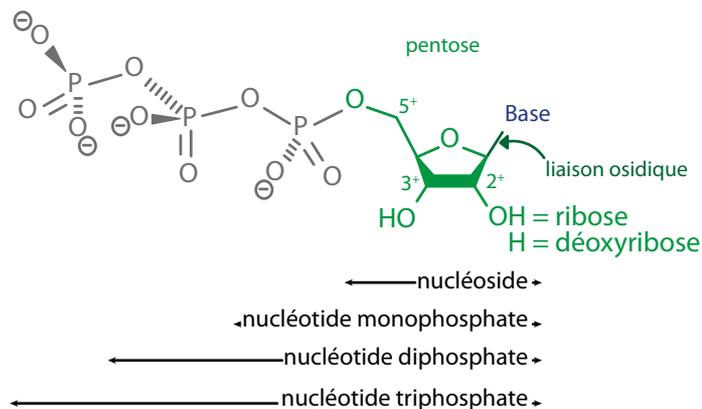


Pour l'ARN : adénine (A), guanine (G), cytosine (C), uracile (U)

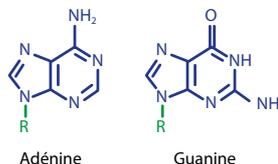
Pour constituer les acides nucléiques, chaque base nitrée est associée à un sucre à 5 carbones (désoxyribose pour l'ADN, ribose pour l'ARN) et à au moins un groupe phosphate.

L'ADN est formé par les nucléotides : adénosine, guanosine, cytidine, thymidine.

L'ARN est formé par les nucléotides : adénosine, guanosine, cytidine, uridine.



### Purines



### Pyrimidines



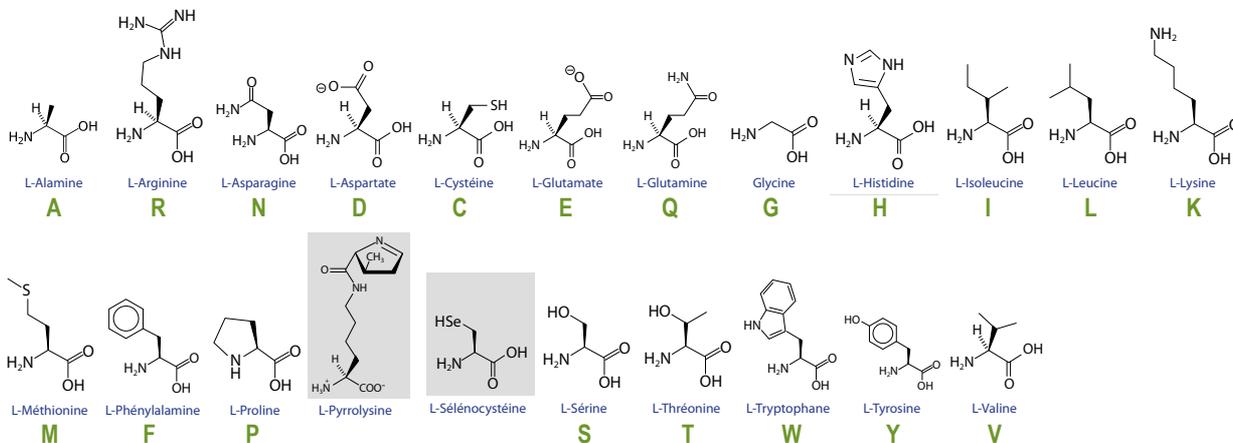


### Acides aminés, peptides, protéines

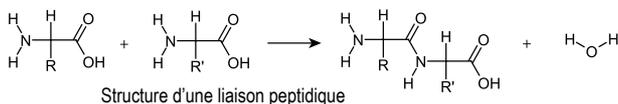
Les acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (condensation d'un acide carboxylique avec une amine) constituent les peptides et les protéines. En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de 100 acides aminés, et de peptides ou polypeptides si elle contient moins de 100 acides aminés.

Les peptides et protéines présentent des structures complexes à 3 voire 4 niveaux :

Structures **primaires** (linéaires), **secondaires** (bidimensionnelles), **tertiaires**, **quaternaires** (tridimensionnelles : agencement des structures secondaires dans l'espace).



**Structure primaire** : chaîne polypeptidique linéaire dans laquelle les acides aminés sont unis les uns aux autres par une liaison peptidique.



**Structure tertiaire** : structure tridimensionnelle ou 3D : il s'agit du repliement dans l'espace des structures primaires et secondaires. Ces repliements sont déterminés par des liaisons faibles (hydrogènes, interactions hydrophobes) et covalentes.

La structure tertiaire dépend de :

- Sa séquence d'acides aminés : 2 protéines possédant 2 séquences très proches (plus de 80 % d'homologie) auront des structures très proches.
- De son environnement : une protéine n'adoptera sa conformation que si son environnement est favorable (milieu aqueux pour une protéine soluble dans l'eau par exemple).

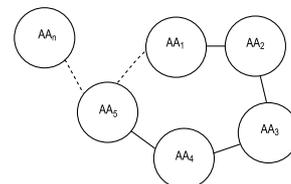
La structure tertiaire est responsable de :

- La fonction de la protéine. La dénaturation protéique correspond à la destruction de cette structure tertiaire.
- L'hydrophobicité de la protéine : une protéine hydrophobe est une protéine dans laquelle les acides aminés hydrophobes (non polaires) sont situés à l'extérieur de la structure.

Inversement, une protéine hydrophile (soluble dans l'eau) possède un cœur hydrophobe et une surface hydrophile (polaire).

**Structure secondaire** : repliement local de la structure primaire. Ces repliements sont dus aux liaisons hydrogènes faibles entre les groupements amide et carbonyle des acides aminés. Ces liaisons sont très nombreuses.

Les structures secondaires sont énergétiquement stables et sont spécifiques d'un enchaînement d'acides aminés.



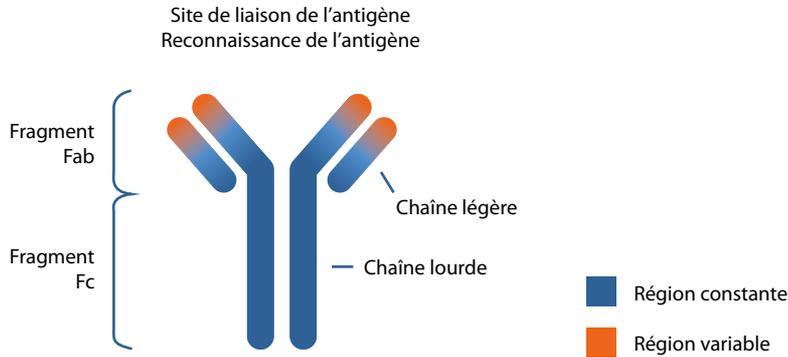
**Structure quaternaire** : unions d'au moins 2 chaînes peptidiques. Chaque sous unité est appelée monomère



## Anticorps

Ils sont composés d'un complexe de glycoprotéines en forme de lettre Y contenant des chaînes dites lourdes (H) et légères (L). Des ponts disulfures les relient entre elles à la base et dans les "bras" du Y.

Ils présentent certaines caractéristiques identiques à tous les anticorps d'un même organisme et des parties variables à l'extrémité des bras qui permettent la reconnaissance des corps étrangers.





### Techniques d'analyses et de purification des protéines et des anticorps

IEX (échange d'ions SCX WCX SAX)

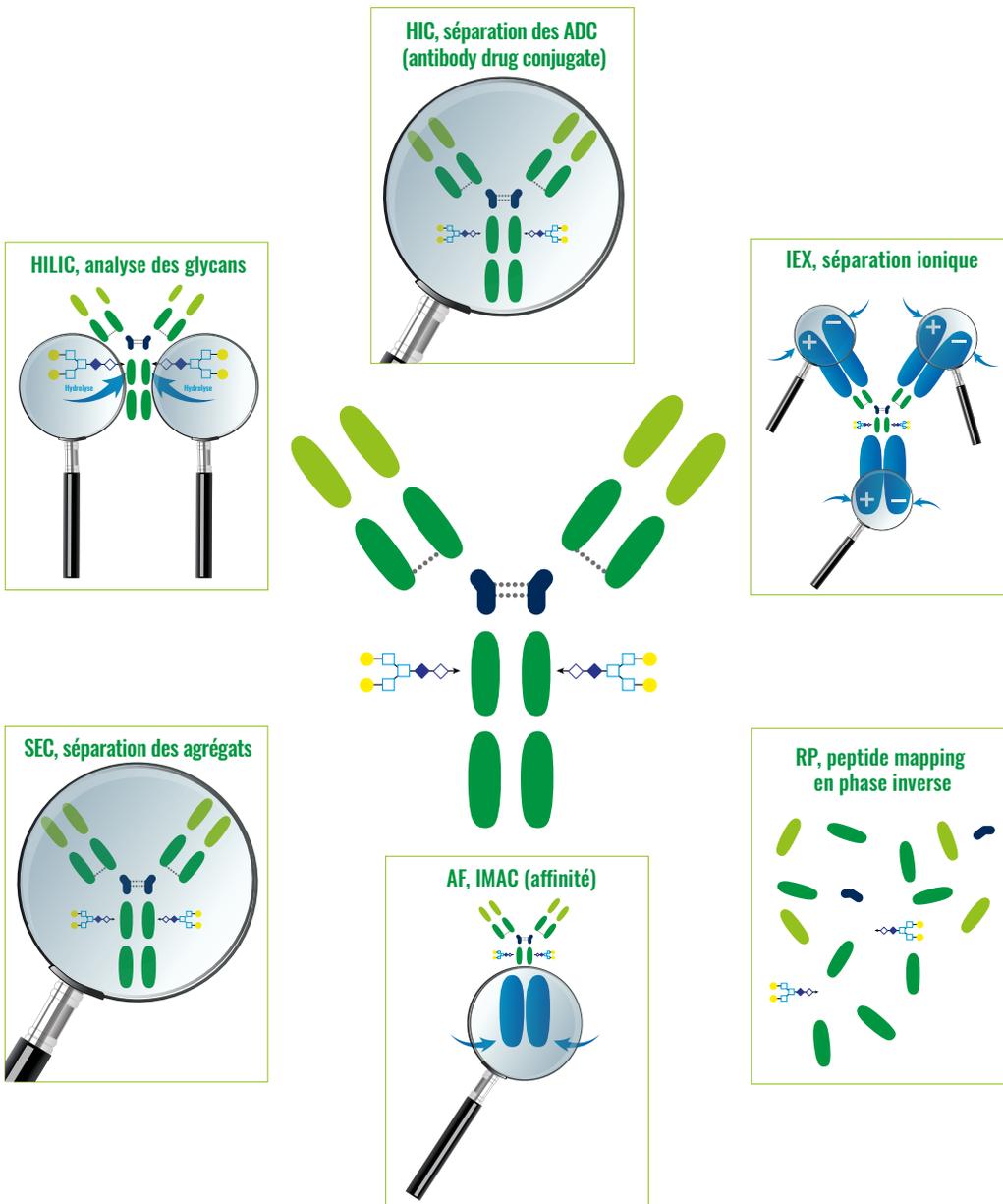
AC (affinité, protéine A)

HIC (interaction hydrophobe)

RP (phase inverse, C4 C8 C18)

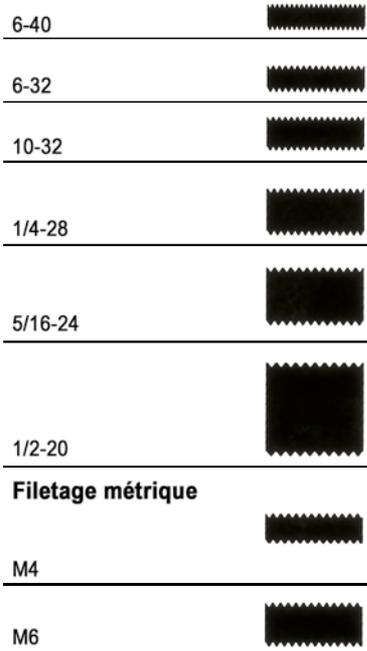
HILIC (interaction hydrophile, amine, imine, amide)

GF SEC (filtration sur gel, exclusion stérique) (Taille de la molécule)

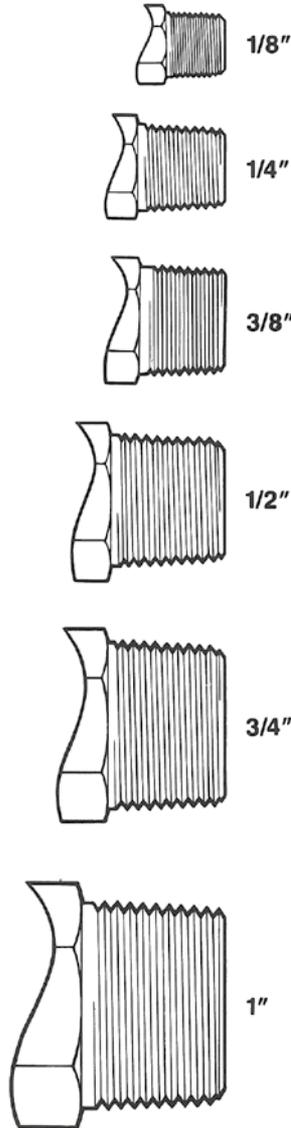




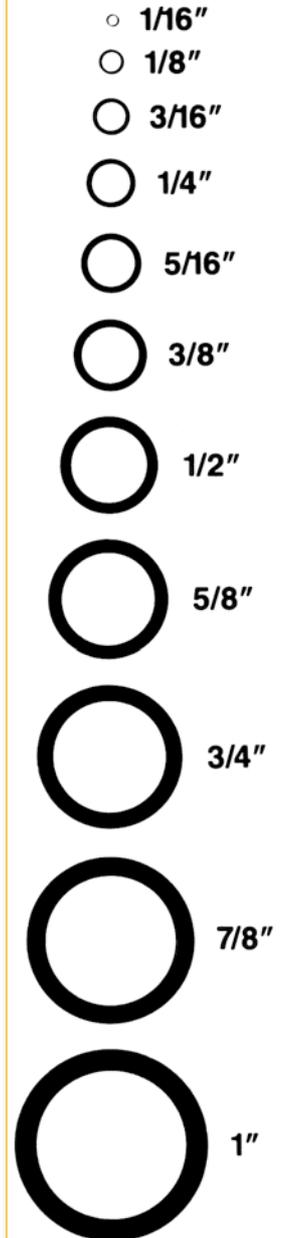
### Schéma de filetages à taille réelle HPLC et Basse Pression



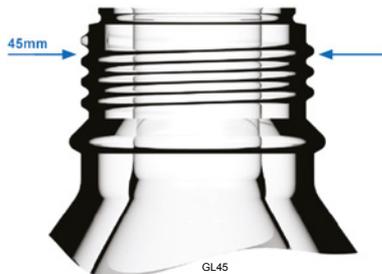
### Raccords NPT à taille réelle



### Ø ext. des tubes à taille réelle

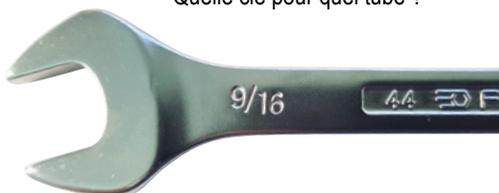


### Bouteilles de solvants



**ATTENTION !!!** Toutes les dimensions mentionnées sont susceptibles (selon le fabricant) de présenter des écarts de plus ou moins 0,5 mm !!!

Quelle clé pour quel tube ?



### Ø tube    Clé à utiliser

|       |          |
|-------|----------|
| 1/16" | 1/4"     |
| 1/8"  | 7/16"    |
| 1/4"  | 9/16"    |
| 3/8"  | 1" 1/16" |
| 1/2"  | 1" 5/16" |
| 1"    | 1" 7/16" |



### Conversions

| Longueurs | mm       | cm    | m                    | Inch                  | Foot                   |
|-----------|----------|-------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 mm      | = 1      | 0,1   | $10^{-3}$            | $3,937 \cdot 10^{-2}$ | $3,2808 \cdot 10^{-3}$ |
| 1 cm      | = 10     | 1     | $10^{-2}$            | 0,3937                | $3,2808 \cdot 10^{-2}$ |
| 1 m       | = $10^3$ | 100   | 1                    | 39,37                 | 3,28084                |
| 1 Inch    | = 25,4   | 2,54  | $2,54 \cdot 10^{-2}$ | 1                     | $8,333 \cdot 10^{-2}$  |
| 1 Foot    | = 304,8  | 30,48 | 0,3048               | 12                    | 1                      |

| Capacités | ml                    | litre     | U.S. pint             | U.S. quart            | U.S. gallon           |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 ml      | = 1                   | $10^{-3}$ | $2,113 \cdot 10^{-3}$ | $1,057 \cdot 10^{-3}$ | $0,264 \cdot 10^{-3}$ |
| 1 l       | = $10^3$              | 1         | 2,113436              | 1,056718              | 0,264179              |
| 1 pint    | = $0,473 \cdot 10^3$  | 0,473163  | 1                     | 0,5                   | 0,125                 |
| 1 quart   | = $0,9463 \cdot 10^3$ | 0,946326  | 2                     | 1                     | 0,25                  |
| 1 gallon  | = $3,785 \cdot 10^3$  | 3,785306  | 8                     | 4                     | 1                     |

| Pression             | PSI       | atm                  | Kg/ cm <sup>2</sup>  | kPa    | Bar                   |
|----------------------|-----------|----------------------|----------------------|--------|-----------------------|
| 1 psi                | = 1       | $6,8 \cdot 10^{-2}$  | $7,03 \cdot 10^{-2}$ | 6,8948 | $6,895 \cdot 10^{-2}$ |
| 1 atm                | = 14,696  | 1                    | 1,0332               | 101,32 | 1,0133                |
| 1 Kg/cm <sup>2</sup> | = 14,223  | 0,9678               | 1                    | 98,06  | 0,9806                |
| 1 kPa                | = 0,145   | $9,87 \cdot 10^{-3}$ | $1,02 \cdot 10^{-2}$ | 1      | $10^{-2}$             |
| 1 Bar                | = 14,5038 | 0,9869               | 1,0197               | 100    | 1                     |

| Volumes             | Litres  | Gallon US | m <sup>3</sup> | Pied <sup>3</sup>     |
|---------------------|---------|-----------|----------------|-----------------------|
| 1 Litre             | = 1     | 0,2642    | $10^{-3}$      | $3,53 \times 10^{-2}$ |
| 1 US Gallon         | = 4,546 | 1         | 0,00379        | 0,161                 |
| 1 M <sup>3</sup>    | = 1000  | 264,0     | 1              | 35,31                 |
| 1 Pied <sup>3</sup> | = 28,32 | 6,23      | 0,0283         | 1                     |

| Poids         | g       | Once    | Livres                |
|---------------|---------|---------|-----------------------|
| 1 g           | = 1     | 0,03527 | $2,205 \cdot 10^{-3}$ |
| 1 Once (Oz)   | = 28,35 | 1       | 0,0625                |
| 1 Livre (Lbs) | = 453,6 | 16      | 1                     |

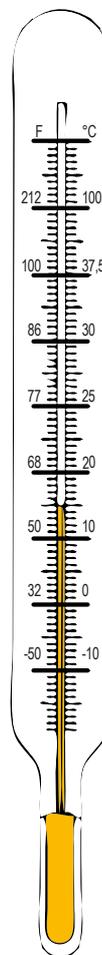
| Microns | Mesh | Microns | Mesh | Microns | Mesh |
|---------|------|---------|------|---------|------|
| 38      | 400  | 250     | 60   | 1700    | 12   |
| 45      | 325  | 300     | 50   | 2000    | 10   |
| 53      | 270  | 355     | 45   | 2360    | 8    |
| 63      | 230  | 425     | 40   | 2800    | 7    |
| 75      | 200  | 500     | 35   | 3350    | 6    |
| 90      | 170  | 600     | 30   | 4000    | 5    |
| 106     | 140  | 710     | 25   | 4750    | 4    |
| 125     | 120  | 850     | 20   | 5600    | 3,5  |
| 150     | 100  | 1000    | 18   |         |      |
| 180     | 80   | 1180    | 16   |         |      |
| 212     | 70   | 1400    | 14   |         |      |

### Températures

Fahrenheit = 9/5 Celsius + 32  
Celsius = 5/9 (Fahrenheit - 32)

F : température en degrés Fahrenheit  
°C : température en degrés Celsius

Quelques repères :





|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| <b>A</b>                              |   |
| additif                               | Substance ajoutée à un éluant pour minimiser des effets secondaires indésirables d'un adsorbant ou améliorer la détection et la séparation des analytes.  |
| ADCs (antibody drug conjugates)       | Anticorps monoclonaux (mAbs) attachés à des médicaments biologiquement actifs par des liaisons chimiques avec des liaisons labiles. En combinant le ciblage unique des anticorps monoclonaux avec la capacité des médicaments cytotoxiques, les ADC permettent une discrimination sensible entre les tissus sains et les tissus malades. Ils combinent des innovations de la biotechnologie et de la chimie pour former une nouvelle classe de médicaments biopharmaceutiques très efficaces. |
| adsorbant (phase, media)              | Support remplissant une colonne HPLC, Flash ou SPE créant la séparation chromatographique.  |
| <b>B</b>                              |   |
| BET                                   | Méthode de mesure de la surface spécifique d'un adsorbant par l'adsorption d'azote liquide.   |
| bidentate                             | Se dit d'un greffage dont le silane est greffé en deux points sur l'adsorbant.  |
| bimodal                               | Adsorbant présentant deux tailles de pores différentes (SEC) ou bien deux fonctionnalités différentes (RP et IC en LC).   |
| biocompatible                         | Matériel ne présentant pas d'interaction indésirable, de type adsorption irréversible, avec les biomolécules. Il est en général exempt de métaux et composé de polymères (PEEK, PTFE) ou céramique.   |
| blanc                                 | Evaluation de la contamination éventuelle d'un échantillon pendant sa préparation en élaborant une solution équivalente à la matrice que l'on injecte comme un échantillon.   |
| bleeding (ressuage)                   | Perte d'un constituant de la colonne ou du septum due aux conditions opératoires (pH, température, solvant etc.), conduisant à des perturbations de détection (pics "fantômes", bruit de fond).   |
| bruit de fond                         | Variations rapides et irrégulières de la ligne de base chromatographique, pouvant être générées par le dégazage de l'éluant, des à-coups électriques etc ...  |
| <b>C</b>                              |   |
| CAD (charged aerosol detection)       | Méthode de détection universelle. Un nuage de particules d'analytes chargées électriquement est formé par nébulisation. Le courant induit est ensuite mesuré.   |
| capacité d'échange ionique            | Nombre de sites ioniques d'un adsorbant pouvant intervenir dans le mécanisme d'échange d'ions. Elle est exprimée en milliéquivalents par gramme. Le pH de l'éluant fait varier fortement la capacité des échangeurs cationiques et anioniques faibles (WCX, WAX).   |
| capillaire                            | Tube de diamètre très faible utilisé en GC ou LC. En GC, une colonne capillaire présente un diamètre interne inférieure à 1 mm.   |
| CEC (capillary electrochromatography) | Technique combinant la haute sélectivité d'un adsorbant HPLC et l'efficacité de l'électrophorèse capillaire. La colonne capillaire est remplie d'un adsorbant HPLC dont l'éluant est mis en mouvement par un flux électroosmotique.   |
| chaîne carbonnée                      | Nom générique désignant le squelette carbonné du greffon d'une silice. Elle peut être caractérisée par un nombre d'atomes de carbone plus ou moins important mais aussi par sa fonctionnalité (butyle, octyl, octadécyle, amino propyle, cyanopropyle etc...)   |
| clapet                                | Petit instrument installé en entrée et en sortie d'une pompe, n'autorisant le solvant à se déplacer que dans un seul sens.  |
| coefficient de diffusion              | Paramètre fondamental qui définit la mobilité d'une molécule dans un milieu gazeux ou liquide. Il est directement lié à la viscosité de l'éluant, la masse moléculaire de l'analyte, la température ...   |



|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>C</b>                            |   |
| conditionnement                     | En SPE, première étape qui consiste à imprégner l'adsorbant avec un solvant avant le passage de l'échantillon. En GC, montée progressive de la colonne en température et maintien à un palier pendant un temps donné pour stabiliser la phase stationnaire avant sa première utilisation.                         |
| core-shell                          | Silice superficiellement poreuse composée d'un noyau solide non poreux entouré d'un anneau de silice poreuse.   |
| chromatographie multidimensionnelle | Séparation de solutés par plusieurs colonnes chromatographiques ou techniques chromatographiques où une partie de l'échantillon séparé est réinjectée sur le système suivant.   |
| CSP (chiral stationary phase)       | Adsorbant destiné à séparer les isomères optiques.  |
| <b>D</b>                            |   |
| DAD (diode array detector)          | Détecteur à barrette de diodes dont chaque diode mesure une longueur d'onde UV.   |
| DEAE (diethylaminoéthyle)           | Groupe fonctionnel échangeur d'anion faible couramment utilisé pour l'analyse de biomolécules.  |
| DEDL                                | Détecteur évaporatif à diffusion de lumière.  |
| dérivatisation                      | Modification chimique d'un composé par un réactif spécifique pour le rendre détectable en changeant sa solubilité, sa volatilité ou sa polarité.  |
| dérive de ligne de base             | Modification du signal de fond à tendance régulière croissante ou décroissante occasionnée par une modification de l'éluant ou le bleeding (ressuage) de l'adsorbant.   |
| dessalage                           | Technique consistant à éliminer des sels d'un échantillon contenant des composés de hauts poids moléculaires.   |
| <b>E</b>                            |   |
| ELSD                                | Evaporating Light Scattering Detector (voir DEDL)   |
| éluant binaire                      | Phase mobile constituée de 2 composants différents.   |
| éluant ternaire                     | Phase mobile constituée de 3 composants différents.   |
| éluant quaternaire                  | Phase mobile constituée de 4 composants différents.   |
| exactitude                          | Aptitude d'un instrument de mesure à donner des indications proches de la valeur vraie d'une grandeur mesurée. L'exactitude représente la qualité globale de l'instrument, dans des conditions données.   |
| <b>F</b>                            |   |
| fidélité                            | Aptitude d'un instrument de mesure à donner des valeurs très voisines pour une même valeur de la grandeur mesurée dans des conditions identiques.   |
| FID (flame ionization detector)     | Détecteur relativement universel. Les molécules, sortant d'un système analytique, traversent une flamme générée par la combustion d'hydrogène et d'air ultrapur. Elles sont alors oxydées et produisent des ions chargés électriquement. Des électrodes mesurent alors le courant électrique généré par ces ions. |
| <b>H</b>                            |   |
| H (HEPT)                            | Hauteur équivalente de plateau théorique. Valeur caractérisant la dimension minimale d'un "étage de séparation" d'une colonne chromatographique. Elle s'exprime généralement en $\mu\text{m}$ et représente, en LC, $n$ fois le diamètre des particules.  |
| h                                   | Hauteur de plateau réduite. Elle est calculée par le rapport de H sur le diamètre des particules en LC et H sur le diamètre interne de la colonne en GC. Cette valeur caractérise la qualité du remplissage d'une colonne chromatographique.  |



| I   |  |
|---|--|
| ICP (inductively coupled plasma, torche à plasma) | Méthode d'analyse qui consiste à ioniser un échantillon en l'injectant, sous forme de fines particules, dans un plasma d'argon ou d'hélium pour transformer les atomes en ions sous l'effet de la chaleur (plusieurs milliers de °C) |
| ICP OES (optical emission spectrometry)           | La technique OES mesure la lumière émise par l'ion recherché et le compare à un étalon connu analysé dans les mêmes conditions.  |
| ICP MS (mass spectrometry)                        | Les ions sont séparés, selon leur masse atomique, leur vitesse et leur charge électrique, alors qu'ils passent à travers des champs électromagnétiques. Cette méthode répond parfaitement pour des concentrations de l'ordre du ppb. |
| injection directe                                 | En GC, balayage immédiat de l'échantillon par le gaz vecteur dans la colonne, sans scission ni vaporisation.   |
| injection split                                   | En GC, réduction automatique de la quantité injectée par la partition très précise du volume de l'échantillon. Elle évite la surcharge de la colonne.  |

| J        |   |
|----------|---|
| justesse | Ecart entre la valeur moyenne de la mesure et la valeur vraie. Aptitude d'un instrument à donner des indications égales à la valeur vraie de la grandeur mesurée. |

| K          |  |
|------------|--|
| Kieselguhr | Terre de diatomées (squelette calcaire de micro organismes) utilisée pour la filtration ou la préparation d'échantillon par SLE (supported liquid extraction). |

| L                              |   |
|--------------------------------|---|
| LLE (liquid/liquid extraction) | Séparation de solutés par partition dans deux solvants non-miscibles de polarités différentes. Habituellement une phase composée d'eau dans laquelle les composés hydrophiles se solubiliseront et une autre, organique, qui retiendra les composés plus hydrophobes. |
| LOD (limite de détection)      | Concentration d'un analyte à laquelle un pic est clairement différencié de la ligne de base, soit au moins 3 fois le rapport signal/bruit.  |
| LOQ (limite de quantification) | Concentration minimale mesurable d'un analyte avec un niveau de certitude défini, en général égale à 3 à 5 fois la LOD.   |

| N                               |  |
|---------------------------------|--|
| NPD (détecteur azote phosphore) | Comme un détecteur à ionisation de flamme, un NPD utilise une flamme hydrogène / air dans laquelle passe l'échantillon. Un NPD contient une perle de rubidium ou de chlorure de césium alcalin qui est chauffée par une bobine au-dessus de laquelle passe le gaz porteur mélangé avec de l'hydrogène. La perle chaude émet des électrons par émissions thermo-ioniques qui sont recueillies au niveau de l'anode et fournissent le courant de base. Lorsqu'un composant contenant de l'azote ou du phosphore quitte la colonne, les composés azotés et phosphorés partiellement brûlés sont adsorbés à la surface de la perle. Cela augmente l'émission d'électrons et le courant qui est ensuite mesuré. |

| O             |   |
|---------------|---|
| orthogonalité | Séparation de composés en utilisant deux colonnes de sélectivités différentes. Une partie de l'échantillon récupéré de la première est réinjectée sur la seconde. |



|                                |  |  |
|--------------------------------|--|--|
| <b>P</b>                       |  |  |
| PAH (polyaromatic hydrocarbon) | Composés hydrocarbonés contenant au moins un cycle aromatique.   |  |
| passages préférentiels         | Passages dans le lit de l'adsorbant où le solvant et les analytes se déplaceront plus vite que la vitesse moyenne dans la colonne, provoquant une distorsion des pics détectés. Un remplissage non uniforme de la colonne ou une détérioration de la silice par dissolution sont en général à l'origine de ces phénomènes. |  |
| PCB (polychlorinated biphenyl) | Composés constitués d'un squelette biphenyle lié à plusieurs atomes de chlore. Classés toxiques, ce sont des polluants fréquents rencontrés dans les eaux, les sédiments et toute la chaîne alimentaire.   |  |
| PEG (polyethylene glycol)      | Polymère de l'éthylène glycol utilisé comme phase stationnaire en chromatographie gazeuse.   |  |
| PEI (polyethylene imine)       | Fonctionnalité chimique souvent utilisée par la séparation des peptides et des protéines en chromatographie liquide.   |  |
| porosité interstitielle        | Fraction de volume de la colonne comprise entre les particules qui la remplissent.   |  |
| précision                      | Mesure évaluant l'écart des analyses par rapport à la moyenne des résultats.   |  |

|          |   |  |
|----------|---|--|
| <b>Q</b> |   |  |
| QuEChERS | Acronyme signifiant : Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe. Technique d'extraction SPE utilisée de plus en plus couramment pour l'extraction des pesticides dans les légumes, les fruits et les viandes. |  |

|                                   |  |  |
|-----------------------------------|--|--|
| <b>R</b>                          |  |  |
| répétabilité                      | Mesure évaluant la dérive en réalisant plusieurs analyses le même jour, par le même opérateur, selon la même méthode.  |  |
| reproductibilité                  | Mesure évaluant la dérive en réalisant plusieurs analyses à des jours différents, par un autre opérateur, sur un appareil différent, selon la même méthode.  |  |
| résine                            | Phase stationnaire constituée d'un polymère (PSDVB, PMMA etc...) souvent utilisé en chromatographie ionique par une modification chimique de sa surface mais aussi en chromatographie liquide de phase inversée. |  |
| réticulation (taux de)            | Pourcentage d'un monomère ajouté pour lier les longues chaînes d'un polymères entre elles.   |  |
| RF (response factor)              | Valeur caractérisant la surface d'un pic par rapport à la quantité de soluté injectée.   |  |
| RF (rapport frontal)              | En CCM (TLC) mesure du temps de migration d'un analyte rapporté au temps de migration de l'éluant.   |  |
| RID (refractive index detection)  | Détection basée sur la différence de réfraction entre l'analyte contenu dans l'éluant et l'éluant lui-même.  |  |
| RSD (relative standard deviation) | Ecart type ou coefficient de variation d'une distribution statistique. Souvent utilisé en analyse pour définir la précision ou la répétabilité d'un dosage.  |  |

|                                       |   |  |
|---------------------------------------|---|--|
| <b>S</b>                              |   |  |
| scavenger                             | Matériau solide utilisé après une synthèse pour éliminer, par une réaction chimique, des composés indésirables, comme des catalyseurs, dans le milieu réactionnel.  |  |
| SEC (steric exclusion chromatography) | Méthode de séparation basée sur la discrimination des molécules par leur masse moléculaire et leur taille. En passant au travers d'un matériau solide dont la porosité est calibrée, une gamme plus ou moins large de molécules sont incluses ou exclues. La perméation sur gel (GPC) et la filtration sur gel (GFC) correspondent à cette méthode. |  |



| S   |   |
|---|---|
| SFC<br>(supercritical fluid chromatography) | Technique dans laquelle l'éluant est composé d'un fluide (CO <sub>2</sub> ) à l'état supercritique, en lieu et place d'un mélange de solvants.  |
| silane                                      | Réactif utilisé pour la préparation d'un adsorbant greffé chimiquement.   |
| silanols résiduels                          | Silanols encore présents à la surface d'une silice après qu'elle ait subi un greffage. Ces silanols sont susceptibles de créer des interactions avec les composés polaires injectés dans la colonne.  |
| silice irrégulière                          | Silice dont les particules sont de forme non sphérique, utilisée principalement en purification par Flash chromatographie ou préparative compte tenu de son prix peu élevé.   |
| site actif                                  | Site réactif très attractif sur la surface de l'adsorbant, pouvant créer des réactions secondaires parasites comme des sources de traînées de pics.   |
| SMB   | Simulated Moving Bed. Système permettant une purification par chromatographie préparative en continu.   |
| surcharge                                   | Phénomène induit par le dépassement de la quantité injectable sur une colonne, dépendante de sa surface spécifique et du nombre de sites interagissant avec les analytes. Les pics subiront une distortion qui les rendra difficiles à quantifier. Cette surcharge est par contre souvent recherchée en purification sur colonne préparative. |
| surface spécifique                          | Surface totale développée par un adsorbant, exprimée en m <sup>2</sup> /g.  |
| T   |   |
| taille moyenne des particules               | L'adsorbant remplissant une colonne est composé de particules dont la taille correspond toujours plus ou moins à la granulométrie annoncée. Une silice donnée pour 5 µm contiendra majoritairement des particules allant de 4,5 µm à 5,5 µm.  |
| tampon                                      | Solution contenant des paires d'acides ou de bases capables de maintenir le pH de l'éluant malgré l'adjonction de petites quantités de produits acides ou basiques.   |
| V   |   |
| vitesse linéaire                            | Vitesse à laquelle un solvant ou un gaz traverse une colonne. En LC, cette vitesse est reliée au ratio débit/section colonne. En GC la vitesse moyenne doit être aussi reliée à la compressibilité du gaz vecteur.  |
| vitesse linéaire optimale                   | Vitesse de la phase mobile correspondant à la hauteur minimale d'un plateau théorique.  |
| volume de fin de fixation                   | Volume pompé à travers une colonne à partir duquel un analyte commencera à être élué. Cette mesure est liée au volume de la colonne et au facteur de rétention de l'analyte.  |
| volume mort                                 | Volume d'un système chromatographique occupé par l'éluant. Les volumes extra-colonne, comme les tubulures, la boucle d'injection, doivent être réduits au maximum car ils participent à la dilution de l'échantillon et affectent le profil chromatographique.  |
| volume poreux spécifique                    | Volume occupé par les pores d'un adsorbant.   |
| volume de rétention nulle                   | Fraction volumique de la colonne comprenant le volume entre les particules et le volume des pores des particules. Il définit le temps de rétention nulle (T <sub>0</sub> ) mis par un composé non retenu à traverser la colonne.  |