

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE - HPLC

## Introduction

### 1 Appareillage

1.1 Réservoir de PM

1.2 Pompe

1.3 Dispositif d'injection

1.4 Les colonnes

1.5 La phase stationnaire

1.6 Les détecteurs

1/Spectrophotométrie +++

2/Fluorimétrie

3/Réfractomètre

4/Conductimètre

5/Electrochimique

6/SM

### 2 Différents types de chromatographie liquide

2.1 Chromatographie d'adsorption (S/L)

2.2 Chromatographie de partage (L/L) +++

En phase normale

En phase inversée

2.3 Chromatographie par échanges d'ion

2.4 Chromatographie par appariements d'ions ou paire d'ions

2.5 Chromatographie d'exclusion-diffusion

2.6 Chromatographie d'affinité

### 3 Choix d'une méthode chromatographique

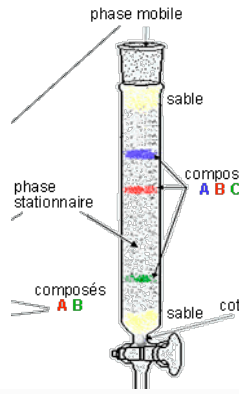


# 1 Appareillage

➤ **2 grands type d'appareillage :**

○ La chromatographie « Classique » :

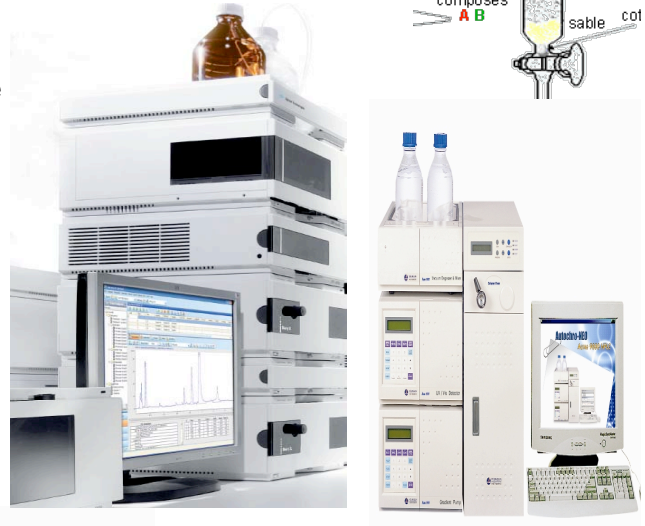
- Granulométrie > 10µm
- Appareillage simple : Tube en verre avec plaque en verre fritté à la base ou tampon de coton
- substances descendent le long de la colonne selon affinité
- recueil de l'éluat par petites fractions
- Mais :
  - ✓ peu sensible
  - ✓ long
  - ✓ peu d'analyse de trace ou dosage



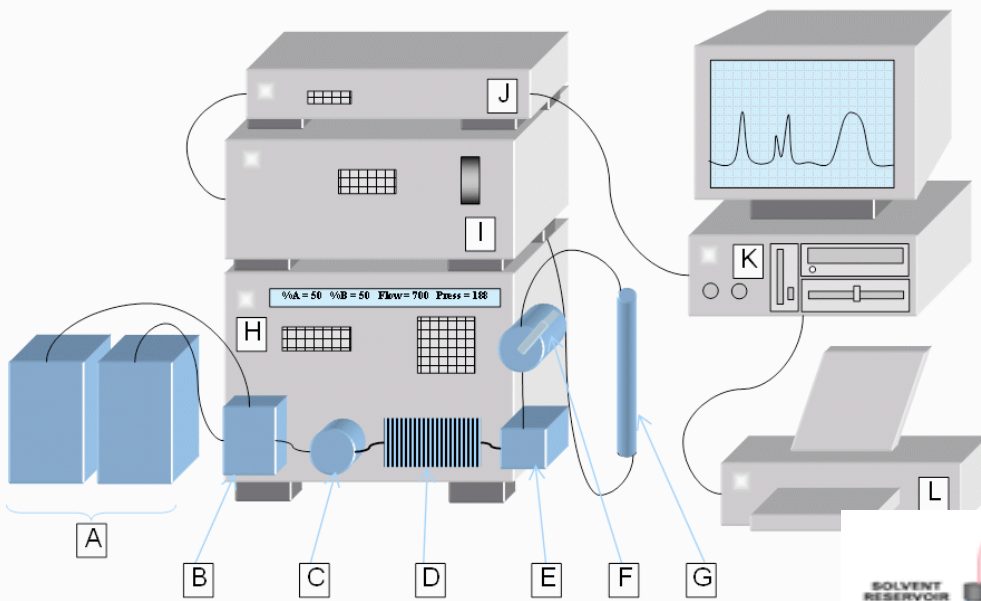
○ La chromatographie haute performance (HPLC)

- Granulométrie entre 2-10 µm
- Meilleure efficacité et résolution
- Très utilisé +++

➤ **Structure générale d'un HPLC :**



## Typischer Aufbau einer HPLC-Apparatur



- A : réservoir de PM
- B : Vanne électro magnétique de mélange des PM
- C : Pompe
- D : Egaliseur de pression
- E : Chambre de mélange
- F : Injecteur
- G : colonne
- H : Unité HPLC
- I : Détecteur
- J : Interface PC

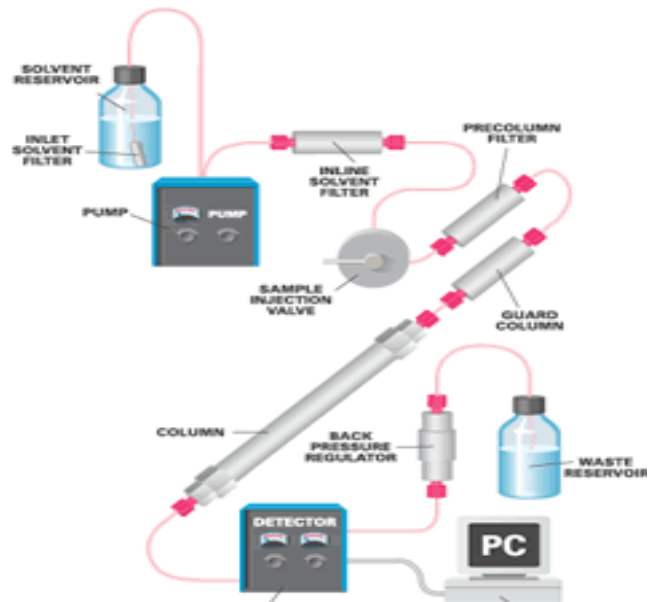
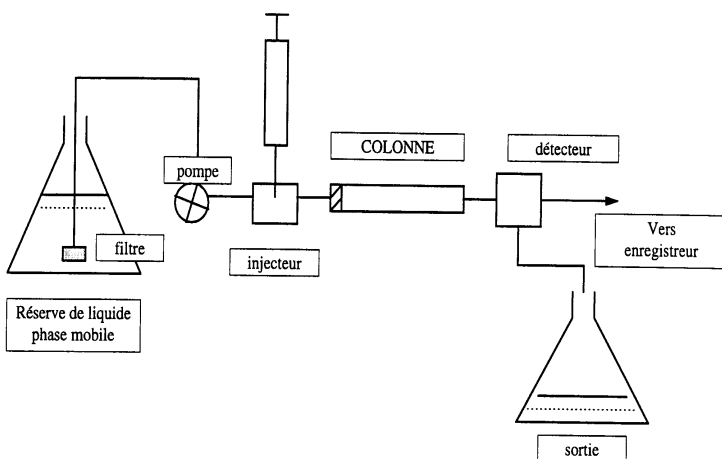


Figure 3 : principe de fonctionnement de l'HPLC

### 1.1 Réservoir de PM

- Flaçon étanche (1 à 2L)
- Parfois fois munis d'un **syst de dégazage** (évite bulles d'air)
- **Différents modes :**
  - **mode isocratique** = PM de compo cte au cours l'extraction (analyse possible avec 1 seul réservoir)
  - **mode programmation de solvant** (+ cplx) = gradient de polarité (nécessite pls réservoirs)

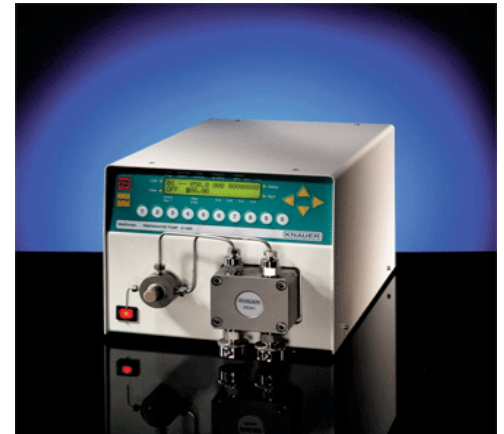
**NB** : les appareils pouvant travailler en prog peuvent travailler en isocratique mais ce n'est pas réciproque



### 1.2 Pompe

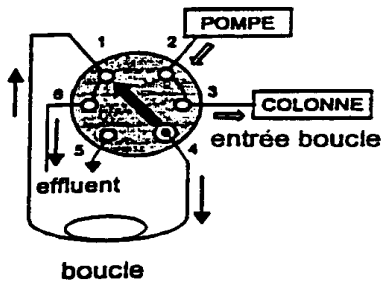
- Fonctionne / **piston** alternatif (svt à pls pistons) → Assure un **débit cst**
- **Appareil à gradient de polarité :**
  - syst de **vannes EM** proportionnelles qui permet les mélanges des solvants en amont d'une pompe unique (ces vannes s'ouvrent en tps proportionnel)
- Qualités :
  - pas de pulsation
  - résiste à la corrosion
  - débit constant

Schéma Huguette gradient de PM

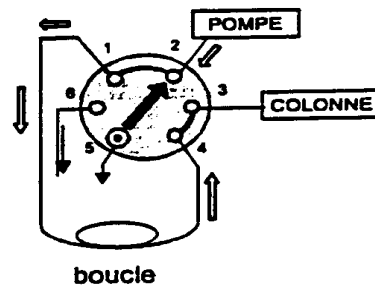


### 1.3 Dispositif d'injection

- Injection manuelle ou automatique avec un **passeur d'ech**
- P° élevée en **tête de colonne dc impossible d'injecter** à la seringue comme en CPG
- Syst d'injection particulier → **Injecteur à boucle** :
  - vanne à boucle d'échantillonnage ,commandé manuellement
  - Vol : **1 à 100µl**
  - Assure des injections **très répétables**
  - Ces boucles ont des **volumes variables**
  - La boucle peut être mise en communication par des vannes avec le réservoir de  $\varphi_m$  et la colonne



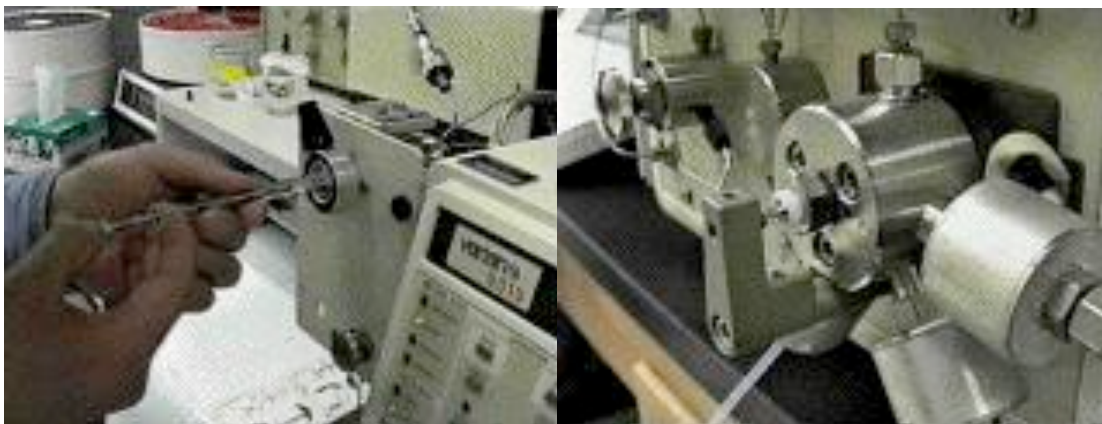
a) chargement



b) injection

*Figure 4 : les deux phases de l'injection avec une boucle*

- Remplissage de la boucle à P° atm
- Le trop plein est rejeté vers l'ext
- Pdt cette étape , la  $\varphi_m$  circule en permanence sur la colonne.
- Puis injection du contenu de la boucle en tournant la vanne d'injection ,la  $\varphi_m$  est mise en communication avec la boucle et la colonne





## 1.4 Les colonnes

- Tubes droits en acier inoxydable
- 5 à 30 cm de long
- 3 à 4.6 mm de  $\varnothing$  interne (auj,  $\exists$  en a de 2 mm)
- qlq fois, on place en amont une **colonne de garde** = petite colonne courte (1 à 2 cm) remplie avec la même  $\varphi$ s que la colonne analytique

## 1.5 La phase stationnaire (voir type de chromato correspondante)

- Située dans la colonne
- **2 types de PS :**
  - **PS imprégnées :**
    - Phase solide de **silice** retenant à sa surface les composés
    - Surtt utilisé en chromato d'adsorption (S/L)
  - **PS greffées +++**
    - Formées par formation de liaisons covalentes entre les gpt **silanols** de la silice et des molécules organiques de nature variées
    - Le plus courant = **diméthylchlorosilane**
    - Les caractéristiques de la PS greffée sont déterminées par la nature du gpt greffé
    - Mais 50 des silanols ne seront pas greffés (encombrement stérique) → Pics dissymétriques
    - Bonne efficacité, mais utilisable qu'entre pH 2 et 8
- Constituée de grains de 3 à 10  $\mu$ m de  $\varnothing$  de nature poreuse
- Cette  $\varphi$ s dépend de la séparation à réaliser
  - silice
  - silice greffée de gpts polaires ou apolaires, échangeur d'ion ou gel
  - zirconium (moins bonne efficacité mais utilisable entre pH 1 et 12)
- Cette  $\varphi$ s est retenue dans la colonne par des disques poreux (frittés) aux 2 extrémités de la colonne

## 1.6 Les détecteurs

- Doit fournir une réponse qui reflète en continu les variations de composition de l'éluat à la sortie
- Choix en fonction des composés à analyser
- **Qualités requises :**
  - **linéaire** = réponses proportionnelles à la concentration à chaque instant
  - **sensible**
  - réponse rapide, **reproductible**, et stable dans le temps
  - **peu de bruit de fond** (variation aléatoire de la ligne de base)
  - **limite de détection** faible compatible avec les résultats attendus
  - Volume mort le plus réduit possible

### a- spectrophotométrie +++

- **Le + courant** pour les composés qui absorbent dans UV-visible (doubles liaisons)
  - soit directement (si gpt chromophore)
  - soit après dérivation
    - soit pré colonne
    - soit post colonne
- on mesure l'absorbance à 1 ou plusieurs  $\lambda$
- La  $\varphi$ m ne doit pas absorber à cette  $\lambda$
- Ces détecteurs peuvent être utilisés en gradient d'éluant
- Régi par la loi de Beer-Lambert :

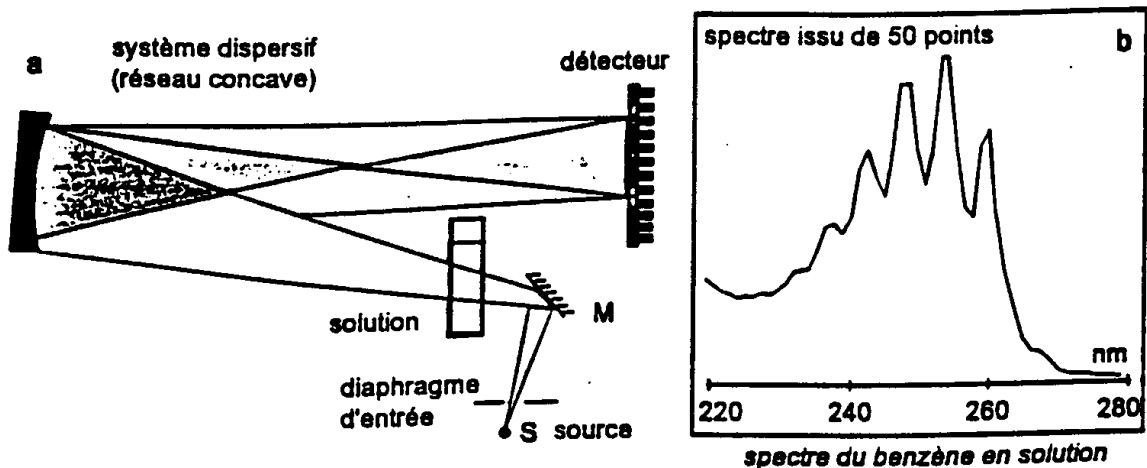
$$A = \epsilon LC$$

## Section 2 item 5

NB : 2 substances à des conc  $\neq$ tes peuvent donner une même valeur de pic (dpd  $\epsilon$ )

### a-1. détecteur monochromatique (spectrophotométrie)

- source UV-visible  $\rightarrow$  syst monochromateur ( $\lambda$  max)  $\rightarrow$  L=trajet optique de la cuve ( $c^*$  à  $\mu$  circulation)  $=\varphi_m$   $\rightarrow$  détecteur (photomultiplicateur ou photodiode)
- $\Rightarrow$  permet analyse quantitative  $\rightarrow$  chromatogramme à  $\lambda$  choisie
- $\rightarrow$  ne permet pas de tracé spectre instantanément, tracé point à point :  $\lambda_1 \rightarrow$  Aire 1,  $\lambda_2 \rightarrow$  aire 2...
- le spectre enregistré est celui ds la  $\varphi$
- càd identique à celui pris en dissolvant l'ech ds  $\varphi_m$



### a-2. détection polychromatique (détecteur à barrette de diodes)

- permet enregistrer les signaux à ttes les  $\lambda$  instantanément
  - source polychromatique traverse  $c^*$  de mesure en permanence
  - absorbe +/- en fct° des propriétés
  - à la sortie,  $\exists$  réseau (polychromatique) qui disperse les  $\lambda$
  - l'intensité à chaque  $\lambda$  est enregistrée sur une barrette de diode
  - chaque diode enregistre ds un petit domaine de  $\lambda$
- $\rightarrow$  info en 3D

A en fct° du tps et en fct° de  $\lambda$

$A=f(T) \rightarrow$  spectre du composé au tps T (qualitative)

$A=f(t)$  à  $\lambda$  donnée  $\rightarrow$  chromatogramme

$\Rightarrow$  info qualitative (spectre) et quantitative (calcul des aires)

### b- spectrofluorimétrie

substances fluorescentes (directement ou après transformation chimique)

$=m^*$  planes, rigides à doubles liaisons conjuguées

$I=Kc \rightarrow$  analyse quantitative (cf. fluorimétrie 2<sup>ème</sup> année)

Source UV  $\rightarrow \lambda$  excitation sélectionnée / filtre ou monochromateur  $\rightarrow c^*$  à la sortie de la colonne  $\rightarrow \lambda$  d'émission (filtre)  $\rightarrow$  photomultiplicateur

Avantages :

- très sensible
- très sélectif

Pharmaetudes

## Section 2 item 5

peu ut ds analyse pharma ,  
srft en analyse bio  
et en analyse environnementale  
après transformation en général (seulement 5% des substances sont fluorescentes)

### c- détecteur réfractométrique

basé sur mesure en continue de l'indice de réfraction de l'éluant  
réponse basée sur la  $\Delta$  d'indice de réfraction vs éluant (n) et  $\varphi_m$  (no)  
détecteur universel :répond à ts les composés )  
peu sensible  
non utilisable en gradient d'éluant (variation de l'lr (indice de réfraction) de la  $\varphi_m$   
très sensible aux variations de T° (fluctuation de la réponse  
assez peu ut (srft substance qui n'absorbent pas ds UV )  
→analyse des sucres

### d- détecteur conductimétrique

basé sur la conductivité des ions  
proportionnelle à leur conc  
→analyse des ions

### e- détecteur électrochimique

basé sur la prop d'un composé à être oxydé ou réduit par une électrode portée à un potentiel donné  
très délicat à employer  
ut pour analyse des catécholamines : absorbent peu ds UV  
facilement oxydables à l'électrode

### f- spectrométrie de masse

permet d'identifier composé par leur spectres de masse ,coûteux mais très sensibles  
ut en pharmacocinétique pour identifier métabolites  
ut ds centres de recherche pour identifier les impuretés

### g- Autres

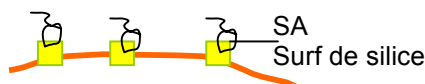
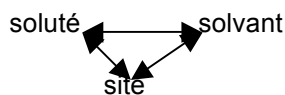
- IR
- Radioactivité
- Polarimétrie
- chimiluminescence



## 2 Différents types de chromatographie

### 2.1 Chromatographie d'adsorption

- Ce mode de chromatographie met en jeu un mécanisme d'adsorption du soluté sur la phase stationnaire solide et un mécanisme d'éluion (désorption) par la phase mobile (éluant).
- Adsorption = Solide – liquide
- PS = silice (alumine + rarement) = adsorbant (solide)
- SiO<sub>2</sub> → caractère acide très polaire
- Ut pour traité composé à caractère basique
- Gel de silice ,réseau 3D
- **3 types de sites :**
  - silanols (OH) libres
  - silanols liés /LH
  - ponts siloxanes
  - silanols libres hydratés
  - gel de silice fortement hydratés
- les sites actifs qui réagissent sont les silanols libres et silanols libres faiblement hydratés et liés /LH
- selon l'état d'hydratation de la silice ,les sites sont ± bloqués
- à la surf ,∃ compet vs m\* de soluté et m\* de solvant de la φm
- ce sont les solutés polaires qui vont se fixer

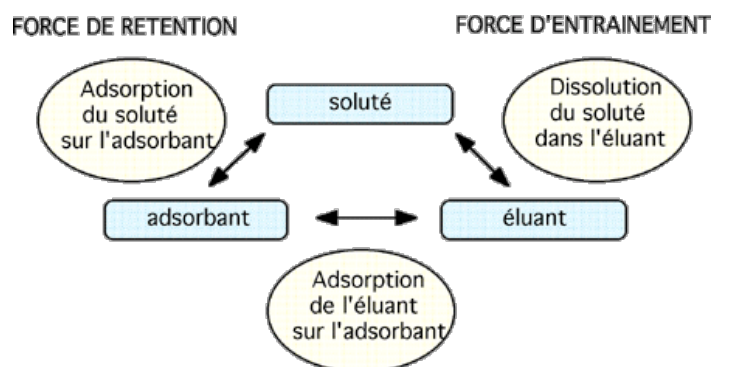


#### a- Méca d'adsorption (compet sur SA)

- ou partage vs eau fixée sur site et φm
- →chroma de partage
- la fixation se fait avec énergie d'adsorption forte des composés polaires sur les sites actifs silanols libres (- forte sur silanols liés ,libres avec une m\* d'H<sub>2</sub>O)
- c'est l'eau qui contrôle l'activité de ces SA

#### b- Rétention et règle d'éluion

- **Rétention fct° :**
  - du soluté :
    - nrj d'adsorption des gpmts fonctionnels
    - encombrement stérique
  - de l'adsorbant :
    - surf spécifique
    - granulométrie
    - porosité
    - teneur en eau (activité)
  - du solvant :
    - forme éluante :solvants classés d'après leur force d'éluion vis à vis de la φs
    - elle suit la polarité pour la chromato d'adsorption

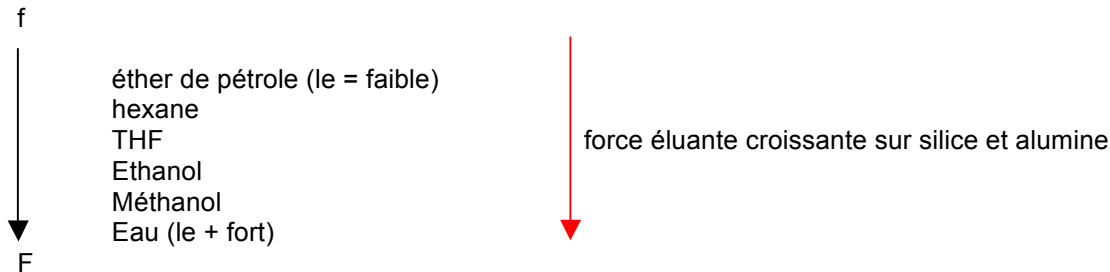


## Section 2 item 5

◇ solvant faible : déplacement difficile du soluté fixé sur SA

◇ solvant fort : déplacement facile

◇ série éluotrope : solvant classés du moins polaire au + polaire , même ordre pour silice et alumine



➤ Chromato d'adsorption → PM peu ou moyennement polaire = mélange de solvants miscibles + acide ou base (silice  $2 < \text{pH} < 8.5$ )

Ex :

-R COOH ajout acide pour obtenir forme  $m^* \alpha$  non ionisé

-R NH<sub>2</sub> + base ou alcaloïde

➤ règle d'éluotion :

-silice = polaire → substances polaires les + retenues

⇒ ↑ caractère polaire de  $\varphi_m$  (ex : ajout H<sub>2</sub>O) → ↓ rétention

### c- Optimisation de la sélectivité de la PM

➤ Optimiser la force éluante  $\epsilon_0$

- la capacité de la PM à changer  $\alpha$  n'a rien à voir avec force de l'éluant capacité vav PS
- des solvants ou mélange ayant même force éluante peuvent avoir 1 sélectivité  $\neq$  te (interaction  $\neq$  tes)

➤ sélectivité  $\alpha$  : fct° de la nature des solvants qui  $\neq$  rent par leur capacité

- accepteur de protons Xe
- donneur de protons Xd
- caractère dipolaire Xn

➤ Classement des solvants en fct de leur polarité → triangle de sélectivité de Snyder :

- 8 groupes de solvants → Ds 1 même gpe les solvants ont même caractère
- tt solvant à un certain % Xe ,Xd ,Xn
- $\Sigma=100\%$

Schéma snyder

## Section 2 item 5

### ➤ Ex :

- Chloroforme = gpe 8
- Et Acide tertiobutylique gpe 3
- Ont la même force éluante mais une sélectivité  $\alpha \neq$  car ds gpes opposés ,interactions polaires  $\neq$ tes

Chloroforme →25% Xe 41% Xd33% Xn

ac. Tertio butylique →56% Xe 20% Xd24% Xn

**$P' = \text{polarité mélange solvant} = \sum (P' \text{ solvant} \times \text{fraction volumique solvant})$**

$P'$  éther –hexane (52.48 ;v/v) =  $2.8 \times 0.52 + 0 \times 0.48 = 1.46$

→mélange chloroforme ( $P'=4.1$ )-hexane(36.6 ;v/v)

même  $P'$  (1.4) mais  $\alpha \neq$

$P'$  mesure le **pouvoir de solvation** d'un solvant et se compose de 3 paramètres Xe ,Xd ,Xn

### ➤ Démarche ds optimisation :

- au début : **solvant S polaire + solvant P' négligeable** (type hexane) dont on fait varier le % pour assurer une rétention des composés convenable
- **on calcule  $P'$**  de cette  $\varphi_m$
- si  $\alpha$  insuffisant ,**on remplace S par un autre solvant S' de prop  $\neq$ tes de S** (éloigné de S ds triangle) en gardant le même  $P'$

NB : important : la valeur de  $P'$  utilisée ici n'est valable que pour la chromato d'adsorption

Elle varie si  $\varphi_s$  n'est pas polaire

### ➤ **Pb avec silice :**

- séparation peu reproductible** si teneur en eau non contrôlée
- inutilisable en **gradient de polarité**
- ut **limitée** en CLHP sur colonne

## 2.2 Chromatographie de partage

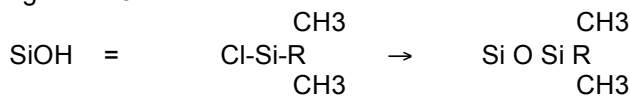
### ➤ Partage = **liq-liq**

### ➤ Mécanisme de **partage entre solvants** que constituent respectivement par la PS et la PM.

### ➤ La **PS** peut être constituée par un **film liquide** (non miscible avec la phase mobile bien sûr) imprégné sur un support rigide (silice) ou fixé par liaison covalente (phases **greffées++**).

### ➤ PS = silice dont la surf a été modifiée par greffage covalent (présence de silanols résiduels )

fig 17 – 18



- **R polaire** : fct° diols ,phényle ,amine ,nitrile
- **R apolaire** : chaîne alkyle C8 ,en C18 , phényle
- + chaîne apolaire longue + silice greffée a caractère apolaire

### ➤ greffage n'est jamais une réaction totale → $\exists$ silanols non gréffés

### ➤ →**phéno d'adsorption** srtp pour **composé basique**

### ➤ pour élim traînée de pics , $\exists$ réactif pour cacher ces sylanols résidu « **endcapping** »=**recouvrement**

### ➤ les silices greffées ne sont ut en général qu'à **pH 2.5 et 8** :

- à pH acide : hydrolyse de la chaîne
- à pH alcalin ,la silice se dissout
- $\exists$  actuellement des silices qui peuvent résister à des pH acide

❖ Si **R polaire** et  $\varphi_m$  – polaire que  $\varphi_s$  →**chromato de partage en  $\varphi$  normale (NP)**

❖ Si **R apolaire** et  $\varphi_m$  + polaire →**chromato de partage à polarité de  $\varphi$  inversé (RP =reverse  $\varphi$ )**

## Section 2 item 5

- **Rétention en chromatographie de partage** :
  - Du soluté
  - De la  $\varphi_s$  (polarité)
  - Du solvant (polarité)
- **Une bonne phase mobile doit avoir 2 propriétés :**
  - Une force éluante telle que le **facteurs de capacité** des solutés soit compris entre **2 et 5** pour un mélange simple, 0,5 et 20 pour un mélange complexe
  - Une **bonne sélectivité** pour le couple le plus difficile à séparer.

### 2.2.1 En phase normale

#### a) rétention et règle d'élution

- **substance P les + retenues** (idem chromatographie d'adsorption sur silice P)
- **PS = polaire**
- **PM :**
  - **solvant apolaire** (Hexane, heptane, cyclohexane, isoctane)
  - **+ solvant peu polaire ou polaire** (= modificateur polaire = chloroforme, dichlorométhane, THF, éthanol, ACN) pour régler force éluante → la teneur en solvant polaire augmente en même temps que la force éluante de la PM
- règle d'élution #silice : ↑ de caractère polaire de  $\varphi_m$  → ↓ rétention
- **Plus un composé sera polaire, plus il sera retenu, plus, il sortira tard.**
- eau = solvant le + fort
- Force éluante = **Eau > MeOH > ACN > THF**

#### b) mécanisme de partage

- on suppose que sur silice greffées aminopropyles que **le solvant le + polaire de la  $\varphi_m$  solvate les greffons polaires aminopropyles**
- qd injecte soluté, il se partage vs greffon solvaté/ $\varphi_m$  = partage liq/liq du soluté S : greffon solvaté/ $\varphi_m$

#### c) Optimisation de la sélectivité de la PM

- idem chromatographie d'adsorption
- démarche : mel solvant polaire avec solvant dépourvu de force éluante (polarité négligeable)

| phase polaire normale | solvants classes par polarité croissante   | phase à polarité inversée |
|-----------------------|--|---------------------------|
|                       | hexane<br>toluène<br>trichlorométhane<br>dichlorométhane<br>éther<br>acétate d'éthyle<br>acétonitrile<br>méthanol<br>eau |                           |

tableau 1 : pouvoir d'élution de la phase mobile en HPLC

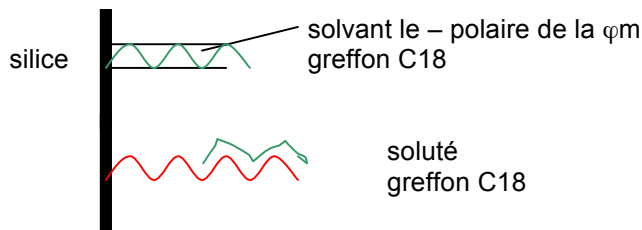
### 2.2.2 Polarité de phase inversée

#### a) rétention et règle d'élution

- les substances **les + apolaires sont mieux retenues**
- **PS = apolaire** ou peu polaire (greffon R = polaire)
- **PM = moyennement polaire ou polaire** (+ polaire que  $\varphi_S$ )
  - Mélange d'un solvant polaire auquel on ajoute un solvant – polaire qui règle l'élution (on l'appelle modificateur organique)
  - **mélange ACN** (acétonitrile) **et/ou MeOH** (THF qlq fois ut) **+ eau ou tampon**
- **Valeurs de P' redéfinies :**
  - THF P'=4.5
  - ACN P'=3.2
  - Méthanol P'=2.6
  - Eau P'=0
- **Plus un composé sera apolaire, plus il sera retenu, plus, il sortira tard.**
- Force éluante = **THF > ACN > MeOH > eau**

#### b) mécanisme de partage L-L

- **2 théories** proposées sur silice greffée alkyle :
  - partage du soluté le – polaire de la PM avec le greffon solvato  $\varphi_m$
  - adsorption du solvant le – polaire sur le greffon assimilée à un liq par effet hydrophobe  
→ partage des solutés entre la PM et la phase liquide adsorbée

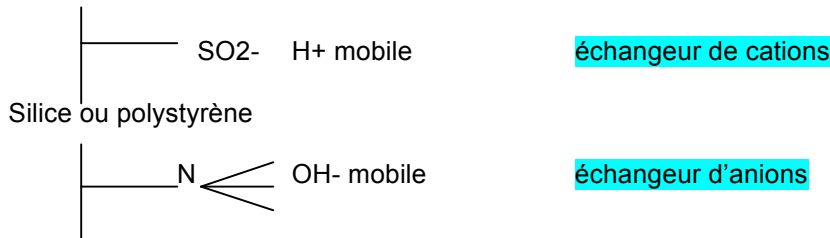


#### c) Optimisation de la sélectivité de la PM

- **Triangle de Snyder → 4 solvants peuvent être ut :**
  - eau
  - méthanol
  - ACN
  - THF
- Solvant – sélectifs par chromato d'adsorption (+ au centre du triangle)
- **Démarche ds optimisation :**
  - Au début ,par ex : MeOH + eau (ou tampon) dont on fait varier le % pour assurer une rétention des composés convenable
  - Calcul de P'
  - Si sélectivité insuffisante ,on remplace MeOH /ACN (prop  $\neq$ te du MeOH ,en gardant le même P4
- **rôle important du pH** de la PM (tampon) pour composés ionisables :
  - + composé ionisé + élution rapide
  - si pH auquel  $\exists$  recul d'ionisation →  $\uparrow$  rétention

### 2.3 Chromatographie par échanges d'ion

- chromatographie des substances ionisées (minéraux) ou ionisables en fct° du pH (molécules organiques).
- PS = résine échangeuse d'ion
- PM = tampon ionique = acide ou base forte
- détecteur = détecteur conductimétrique
- Méca : équilibre d'échange d'ions
- PS : support + gpmts fct°nels + contre ions



→ Contre ions mobiles peuvent être éch avec ions de même signe de la solution

◇ **Echangeur** : fort, faible (taux d'ionisation varie en fct° du pH)

◇ **Capacité d'échange** : (meq/g ou eq/g)

- =nbre d'ions qui peuvent être éch / unité de poids de résine sèche
- Caractéristiques d'un échangeur
- *Varie en fct°* :
  - du nbre de gpmts fixés
  - de la force des gpmts
  - du pH (pour les échangeurs faibles)
- elle affecte la rétention des solutés (+ capacité grande + rétention ↑)

#### a) nature et structure des échangeurs d'ions (PS) :

- **Gpmts fonctionnels** :
  - **échangeur de cation** :
    - fort = sulfonique nRSO<sub>3</sub><sup>-</sup> H<sup>+</sup>
    - faible = carboxylique nRCO<sub>2</sub><sup>-</sup> H<sup>+</sup>
  - **échangeur d'anions** :
    - fort = ammonium IV<sub>α</sub> : nR N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> OH<sup>-</sup>
    - faible = amine I<sub>α</sub> : nR NH<sub>3</sub><sup>+</sup> OH<sup>-</sup>
  - **échangeurs plurifonctionnel** : pls types de gpmts
- **Support** :
  - **résine de structure gel** :
    - grains très fins de **co-polymère styrène-divinylbenzène DVB**
    - + greffés gpmts fct°nels →réseau Mm\*<sub>α</sub>
    - degré de réticulation ↑ avec % DVB (tx de pontage X)
    - + maille du réseau petites →m\* volumineuse bloquées
    - résistance méca médiocre : ↑ avec X
    - cinétique d'éch lente (pics larges) →ut granulométrie assez fine (µm)
    - capacité d'éch élevé →chromato préparative →sep fraction pure
    - 2 < pH < 13 = avantage
  - **microparticules de silice** :
    - greffes de gpmts Vb + greffe gpmts fct°nels

Section 2 item 5

- très bonne résistance méca → ut en HPLC
- capacité d'éch élevée → chroma préparatif
- très gde surf de contact d'où eq rapides (pics étroits)
- 2 < pH < 8.5

○ **échangeur pelliculaire :**

- billes de verre (30 à 50 μm)
- + pellicules de résine (1 à 2 μm) portant les gpmts échangeurs
- bonne résistance méca (HPLC), dc poss d'avoir des taux de pontage faibles, dc mailles de réseau assez grosses → analyse espèces volumineuses
- faible capacité d'éch
- pas de chromato préparative, slmt analytique
- cinétique d'éch rapide d'où bonne effi  
2 < pH < 13

**b) Méca de séparation**

➤ **Mécanisme principal = échange d'ions :**

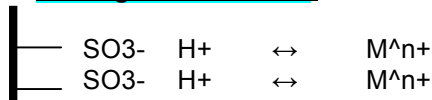
- 1/ solvation des gpmts fonctionnels /H<sub>2</sub>O : gonflement en présence d'eau de la φm
- 2/ ionisation des gpmts fonctionnels (dpd du pH de la φm pour échangeurs faibles types carboxylique)

• si degré de réticulation élevé, ∃ peu d'éch d'eau

➤ **Les mécanimes :**

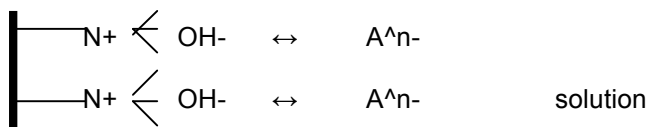
- principal → ech ions échangeurs /ions de la sol° φm irréversible/lavage de la résine
- IIα → partage (effet Donnan) ; réversible par lavage de la résine  
∃ que m\* soient chargées ou non

➤ **échangeur de cations :**



→ ordre décroissant d'affinité : Citrate > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > oxalate > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > formiate > acétate > OH<sup>-</sup> > F<sup>-</sup>

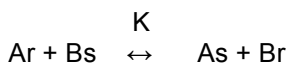
➤ **échangeur d'anions :**



→ Ordre décroissant d'affinité : Ba<sup>2+</sup> > Pb<sup>2+</sup> > Ca<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup> > K<sup>+</sup> > NH<sup>4+</sup> > Na<sup>+</sup> > H<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup>



- Equilibre régit par une cste d'éch K
- échange charge à charge, respectant l'électroneutralité
- soit A l'ion fixé sur R
- et B l'ion apporté par l'éch ds φm



$$K(A/B) = \text{As} \times \text{Br} / \text{Ar} \times \text{Bs}$$

Br/Bs = Pb = coeffts

??????

Pa coefficient de partage ionique r/s

## Section 2 item 5

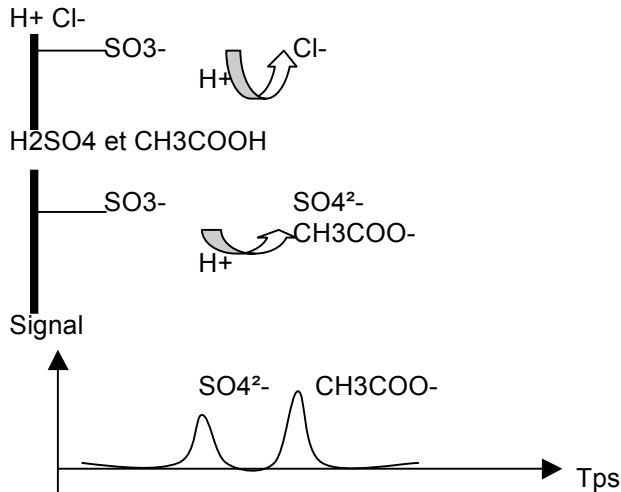
$$K(A/B) = \frac{PB}{PA}$$

$PB > PA \rightarrow B$  a + d'affinité par la résine que A

### ➤ Mécanisme $II\alpha$ = Partage (Effet Donnan) :

- Partage des  $m^*$  **quelles soient chargées ou non**
- soluté non chargé  $\rightarrow$  pénètre ds résine jusqu'à eq
- soluté chargé  $\rightarrow$  pénètre ds résine ,qu'il soit échangeable ou non
- degré de pénétration = fct° de nature de la résine et de l'ionisation du soluté

ex : sur résine sulfonique  $R\text{OS}3\text{H}^+$



### c) Règles de l'échange

#### ➤ Affinité de l'ion pour la résine d'pd de :

- **charge** de l'ion  $\rightarrow$  affinité  $\uparrow$  avec charge
- **taille** de l'ion solvaté  $\rightarrow$  affinité  $\uparrow$  qd taille  $\downarrow$

$\text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \dots \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$   
(sels de  $\text{K}^+$  + éluant que  $\text{Na}^+$ )

#### ➤ Déplacement des équilibre en :

- $\uparrow$  conc de A ds  $\varphi_m$
- modifiant PB et PA en **modifiant  $\varphi_m$**  (pH ,force ionique ,addition agent complexant)

### d) Choix des cdt° opératoires et optimisation

#### ➤ Choix de l'échangeur :

- nature
- granulométrie 75 à 150  $\mu\text{m}$
- CLHP  $< 20\mu\text{m}$

#### ➤ Choix de la $\varphi_m$ :

- tampon aqueux  $\rightarrow$  maintient du pH (tampon citrate, phosphate/acide et ammoniaq/basiq)
- nature de l'ion développeur
- pH (sélectivité)  $\rightarrow$  généralement proche des pK des solutés
- force ionique

#### ➤ Choix du procédé de séparation :

- séparation préparative :
  - gdes qtité de prod à sep / résine



## Section 2 item 5

- analyse par déplacement des ions fixés sur R / ions de la  $\varphi m$  qui ont + d'affinité pour R que les ions à sep

➤ ex : séparation  $Na^+$  (NaCl) et  $K^+$  (KCl) sur  $RSO_3H$  :

- $\varphi m$   $CaCl_2$
- $Ca^{2+} > K^+ > Na^+$  : ech rapide car bcp d'affinité
- Espèces conc à la sortie , sortent ssf de bandes

➤ chromato analytique : espèce à séparer

en petite qtité par rapport à qtité de résine de  $\varphi s$

-analyse par élution (fig 21) : ions de l'ech fixés sur R élués par des ions de la  $\varphi m$  qui ont une affinité moins importante pour R

-séparation  $Na^+$  (NaCl) et  $K^+$  (KCl) sur  $RSO_3H$  ,  $\varphi m$  HCL

$K^+ > Na^+ > H^+$

-échange lent car peu d'affinité

espèces diluées à la sortie , sortent ssf de pics

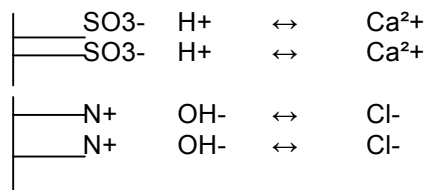
NB : si  $T^\circ$  augmente  $\rightarrow$  efficacité augmente (max à 50-80°C)

### d- application de la chromato par ech d'ions , ionique

➤ **Purification de l'eau :**

eau purifiée pharmacopée = eau déionisée

eau mixte : cation fort (forme  $H^+$ ) et anion fort (forme  $OH^-$ )



L'eau ctt par ex :  $CaCl_2$  ,  $MgCl_2$  ,  $NaCl$ ...

$Ca^{2+}$  ech vs  $2H^+$

$2Cl^-$  ech vs  $2OH^-$

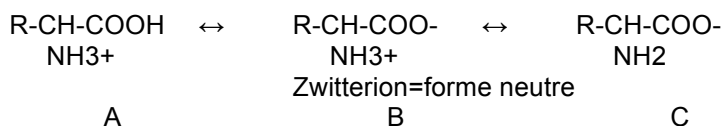
$\Rightarrow H_2O$

passage sur charbon actif

l'eau distillée après passge sur résine est très chargée en composés organique

➤ **Séparation d'aa (impossible par CPG)**

aa= substance amphotère , 3 formes possibles en fct° du pH



pH

Echangeur de cation + gradient de pH  $\varphi m$

• départ : fixation de ts les aa à pH acide , forme A

• puis  $\uparrow$  lentement pH  $\rightarrow$  élution des aa ssf de zwitterion

ordre d'élution suit  $pK_a$  les + acides ( $pK_a$  les + fble) sortent en 1ers

En réalité ,  $\exists$  modif de l'ordre d'élution à cause de l'effet Doman

$\rightarrow$  prendre ech d'anion et commencer à pH alcalin

## Section 2 item 5

### ➤ **Conc des ions**

intérêt : eaux radioactives → conc en ions  
des ions à faible conc peuvent être élués avec un faible volume de Fm

### ➤ **Préparation d'échantillon en vue de leur dosage**

analyse  $\text{Ca}^{2+}$  en présence de  $\text{PO}_4^{3-}$  - difficile  
 $\text{CaPO}_4$  = composé réfractaire  
On fixe  $\text{PO}_4^{3-}$  sur échangeur d'anion et recueille  $\text{Ca}^{2+}$  ds l'éluant  
On peut fixer  $\text{Ca}^{2+}$  sur échangeur de cation et élim  $\text{PO}_4^{3-}$   
Puis élution  $\text{Ca}^{2+}$  / acide nitrique par ex

### ➤ **Chromato ionique**

colonne d'ech d'ions  
analyse avec détection conductimétrique (surtout anions)  
ions minéraux en hydrologie  
ions organiques (acides organiques ds vins)  
pour analyse des cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ) → spectro atomique  
 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  surtout PF

## 2.4 Chromatographie par appariements d'ions ou paires d'ion

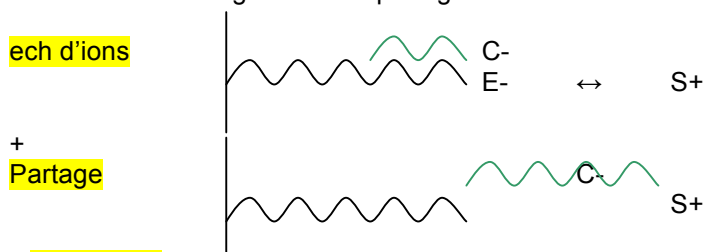
- Séparation des substances ionisées ou ionisables en fct<sup>o</sup> du pH
- Appareillage classique (cf. HPLC)
- **PS** = silice greffée alkyle (C8 ou C18)
- **PM** = ACN ou MeOH, eau ou tampon + contre ions ( $\pm$ ) à longue chaîne

### ➤ **Contre ions les + ut :**

- **Dosage cations :**
  - composés anioniques →  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{SO}_3^- \text{H}^+$
- **Dosage anions :**
  - hydroxyde de tertiary ou tetrapropyl ammonium
  - $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{-N}^+ \text{OH}^-$  /  $(\text{C}_3\text{H}_7)_4\text{-N}^+ \text{OH}^-$
  - travail tjrs avec PM dont le pH assure l'ionisation du composé à analyser

### a) Mécanisme

- A la fois échange d'ions et partage :



◇ **l'ech d'ions**, le contre ion se fixe sur partie apolaire sur  $\varphi$  alkyle de la  $\varphi$ m et fonctionne comme ech d'ion

◇ **Partage** : la paire d'ion hydrophobe préformé ds  $\varphi$ m fixe greffon sur partie apolaire → partage vs greffon et  $\varphi$ m (liq-liq)

### b) règles d'élution

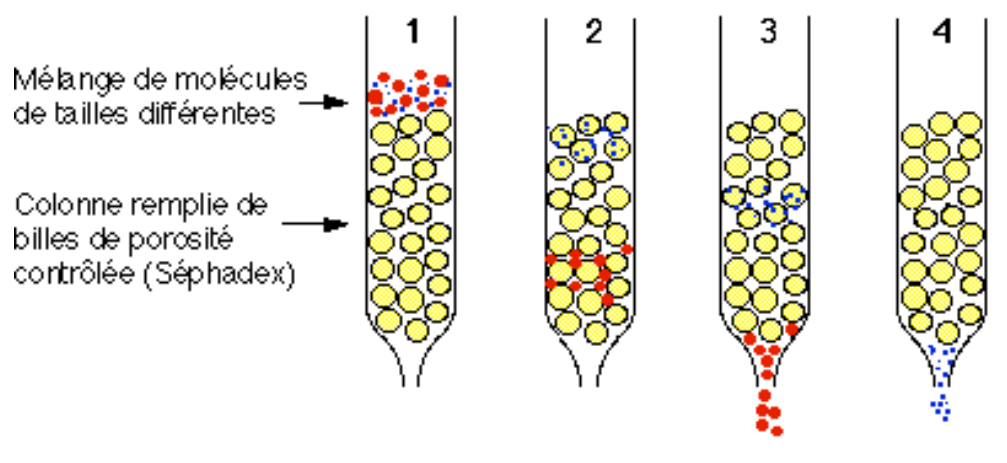
- **Rétention suit règles de chromato à polarité de  $\varphi$  inversé :**
  - ↓ avec ↑° du % en solvant organique de  $\varphi_m$
  - ↑ avec le % en eau de la  $\varphi_m$
- **Rétention dpd pH de la  $\varphi_m$  :**
  - si pH où soluté est fortement ionisé ,paire d'ions favorisée et rétention ↑tée
- **Rétention ↑ avec :**
  - conc en contre ion ds  $\varphi_m$
  - caractère hydrophobe de la chaîne du contre ion

## 2.5 Chromatographie d'exclusion sur gel

- m\* séparée par taille et non par phéno d'affinité car indpdt de la nature du solvants (seulement véhicule )
- =filtration de gel qd support hydrophile (sep P\*)
- =perméation de gel qd support à caractère hydrophobe (organique)
- PS = gel ,struct~tamis →criblage /taille
- PM = solvants → induit le gonflement de la PS et dissout l'ech.
  - Eau pour les gels hydrophiles
  - Solvant organiques (chloroforme, DMF...) si gel hydrophobe
- PS = gel = milieu d'aspect homogène formé :
  - d'une  $\varphi$  solide dispersée :
    - constituée de petite particule calibrée = grains poreux
    - chaque grain résulte de liaison de Macrom\* assemblée pour former un réseau caractérisé /sa porosité
    - + réseau dense + pores petits
  - d'une  $\varphi$  aqueuse dispersante :
    - eau ou sel minéraux (gel hydrophile )→sep peptide ,P\*
    - ou de nature organique (chloroforme ou THF)
    - si gel à caractère lipophile → ut pour sep polymère ou fraction lipidique

### a) Principe

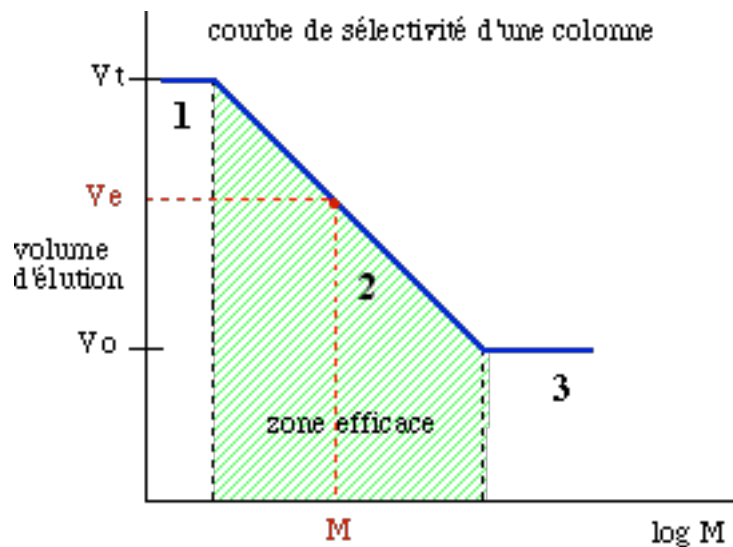
- **Classement des m\* en fct° de leur taille :**
  - Grosses M\* exclu des pores→ sorte en 1<sup>er</sup>
  - petits m\* éluee en dernier (les plus ralenti car passe dans les pores)
  - moyenne classés selon taille



b) Théorie

$$V_r = V_e + K \cdot V_p$$

- $V_r$  = Volume de rétention (ou d'élution)
- $V_e$  = vol extra particulaire (ou interstitiel)  $V_e$  = volume de PM
- $V_p$  = vol de porosité intraparticulaire  $V_p$  = volume des pores
- $K_d$  = coefficient de diffusion ds pores = conc  $m^*$  ds pores / conc  $m^*$  à l'ext =  $C_p/C_e$ 
  - $K_d=0$  → exclusion totale
  - $0 < K_d < 1$  → exclusion -diffusion
  - $K_d=1$  → diffusion totale
- Si  $m^*$  trop grosse pour pénétrer ds pores, elles sont exclues et passent ds vol extraparticulaire  $V_e$
- Les  $m^*$  intermédiaires diffusent ± ds pores selon leur taille → fct de K



c) caractéristiques des gels

- **Porosité :**
  - fct° du  $d^\circ$  de réticulation
  - + gel réticulé +  $\emptyset$  pores faibles (qlq 10aines à qlq milliers d'Å)
  - le vol de porosité  $V_p$  ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) ↑ avec porosité
  - il a une influence sur la capacité de gonflement du gel
- **Grains :**
  - de 40 à 300  $\mu\text{m}$  à  $P^\circ$  atm
  - 10 à 80  $\mu\text{m}$  en HPLC (hte  $P^\circ$ )
- **Gel inertes vis-à-vis :**
  - des solvants
  - des composés à séparer
- **Caractérisés par leur consistance :**
  - **gel mou** →  $P^\circ < 2$  bar ( $2 \times P_{\text{atm}}$ )
    - dextran
    - aggarose
    - polyacrylamide
  - **gel semi rigide**  $P^\circ \rightarrow 70$  bar
    - polystyrène

## Section 2 item 5

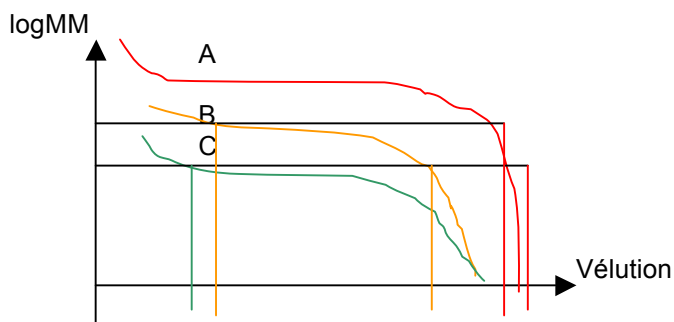
- **gel rigide** →  $P^0 > 70$  bar
  - aérogels

### d) types de gel

- **Gel de dextrane = sephadex (P\*)**
  - hydrates de carbone polymérisé à caractère polaire H $\phi$ le
  - ut pour sep P\*
- **Gel d'agarose = sephadex ou gelarose :**
  - prep à partir d'Agar-Agar
  - polysaccharides solubles à chaud et donnant gel par refroidissement
  - struct due à la création de LH ds polysaccharides
- **Gel de polyacrylamide :**
  - amide acrylique polymérisé (polaire)
  - insoluble ds H<sub>2</sub>O → gonflet → gel
  - ut pour sep Mm\* bio telles que P\* ou polysaccharides
- **Gel de polystyrène – divinylbenzène**
  - sep m\* lipophile (lipides ou polymères de \$)
- **Aérogels :**
  - perles de silice ou de verre ou poudre de verre à surf poreuse
  - ut en suspension en HPLC

### e) Choix du gel (PS)

- **En fct° m\* à sep :**
    - nature du gel → hydrophile ou hydrophobe
    - porosité → tracé **courbe d'étalonnage log MM = f(V<sub>élution</sub>)** avec des étalons de MM connues de nature similaire à l'ech
  - MM de forme variées pelote ,filiforme...
  - Ex pour P\* → nature globulaire
- Pour gamme étalon ,il faut
- 1 composant exclu totalement
  - 1 composant pénétrant ds les pores partiellement

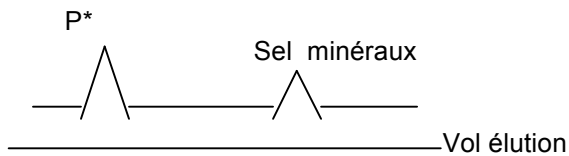


Zone linéaire : pente faible (le compo B à **le plus gd volume d'élution**)  
 $10^3 < MM < 10^4$

## Section 2 item 5

### f) Application

- Désalage des P\* (ut gel très réticulé)



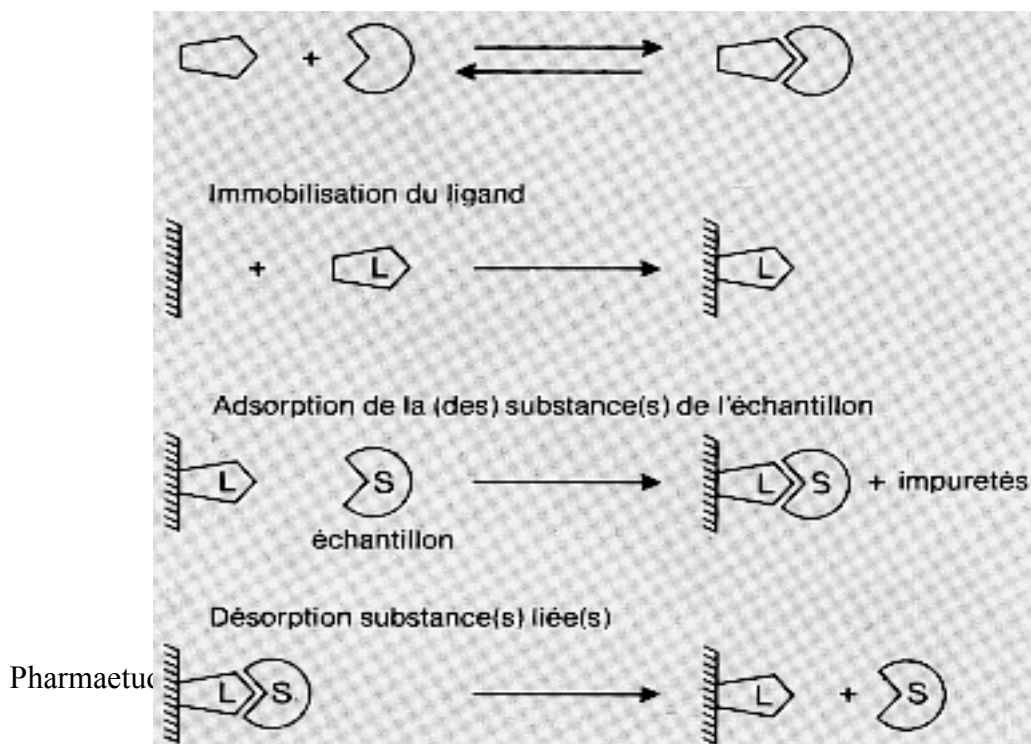
- Sep de m\* de taille très  $\neq$ te, de cellule (lymphocytes) ou de particules (virus...)
  - Fractionnement d'un mélange de macromolécules.
  - Détermination des constantes d'équilibre
  - **Détermination de MM**  $\rightarrow$  sep des masses de 200 à  $10^7$ 
    - Polymères naturels ou de \$ : peptides , hormones , enzymes
    - Pour m\* de taille peu  $\neq$ te ut colonne + longue :
- $\rightarrow$ recyclage (recueille éluant à la sortie et remet dedans)

### g) Caractéristiques de la chromato/gel

- ttes les m\* sont éluées
- tps de séparation prévisible car correspond au vol d'éluion tot
- vol d'éluion ou tps est fct° de la taille des m\*  $\rightarrow$ d'où détermination MM
- 2 m\* peuvent être sep si  $\exists$  au moins 10% de  $\neq$ ce vs MM
- les pics ne s'élargissent pas en fct° du tps de rétention
- l'effi, càd nbre de plateau théorique, est en général  $<$  à la chromato liq habituelle

## 2.6 Chromatographie d'affinité

- Utilise une PS constituée d'un support (silice, polymère) sur lequel on a greffé une molécule organique particulière qui présente une affinité sélective pour certains constituants d'un mélange dont on cherche à les isoler.
- eux-ci vont être sélectivement adsorbés ou tout au moins retenus sur la colonne, tandis que les autres composants sont très rapidement élués.
- Un changement de la phase mobile (pH, force ionique ou ajout d'un compétiteur) permet ensuite d'éluier les substances intéressantes, avec un facteur de purification pouvant atteindre 1000.
- C'est le type de chromatographie le plus sélectif, une protéine pouvant être purifiée d'un facteur 103 à 104 en une seule fois.



## 9 - LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ :

### Principe :

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser.

Trois types d'affinités sont utilisées :

- affinité enzyme-substrat
- affinité ligand-récepteur
- affinité antigène-anticorps

Très souvent, la molécule fixée sera le substrat, le ligand, ou bien l'anticorps. Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement.

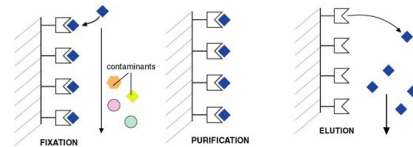


Figure 1 : Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

**1 - Etape de FIXATION :** Le mélange de molécules contenant le composé à purifié est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.

**2 - Etape de PURIFICATION :** En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.

**3 - Etape d'ELUTION :** La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluat. Souvent, l'un des deux partenaires de l'interaction au moins est une protéine (P), l'autre sera qualifié de ligand (L) de cette protéine :  $P + L \rightleftharpoons PL$

L'association de P et de L forme le complexe PL. La constante définissant cet équilibre est :

$$K_a = \frac{(P).(L)}{(PL)}$$

**NB :** C'est une constante d'association à l'équilibre, qui s'écrit donc avec un "K" majuscule.

**La phase stationnaire (le gel d'affinité) :** elle est constituée d'un effecteur fixé par covalence à un support (carboxyméthylcellulose, Séphadex, gel de polyacrylamide) par l'intermédiaire d'un bras de fixation ("spacer" en anglais).

**Exemples de dérivés de la carboxyméthylcellulose ou CM-cellulose :**

- La CM-aminohexylique : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle.  
- O - CH<sub>2</sub> - CO - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> - NH<sub>2</sub> (spacer long)
  - La CM-hydrazide : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle.  
- O - CH<sub>2</sub> - CO - NH - NH<sub>2</sub> (spacer court)
  - La CM- aminohexylique (ou aminododécylique) succinylée : permet la fixation d'un effecteur à fonction  
-NH<sub>2</sub> réactive.  
- O - CH<sub>2</sub> - CO - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - NH - CO - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - COOH (n = 6 ou 12, spacer long)
- La longueur du bras est choisie de manière à limiter les contraintes stériques.

**Effecteurs :**

- Affinité enzyme-substrat : substrats, analogues, inhibiteurs réversibles, effecteurs allostériques, coenzymes.
- Affinité ligand-récepteur : haptènes, antigènes, anticorps.
- Affinité antigène-anticorps : hormones, peptides, analogues peptidiques.

**Elution :** elle peut être réalisée de différentes façons :

- Tampon de pH différent de celui ayant permis la charge : changement de l'état d'ionisation de la protéine : désorption
- Tampon de force ionique différente de celle ayant permis la charge : changement de conformation de la protéine.
- Compétition avec un ligand libre

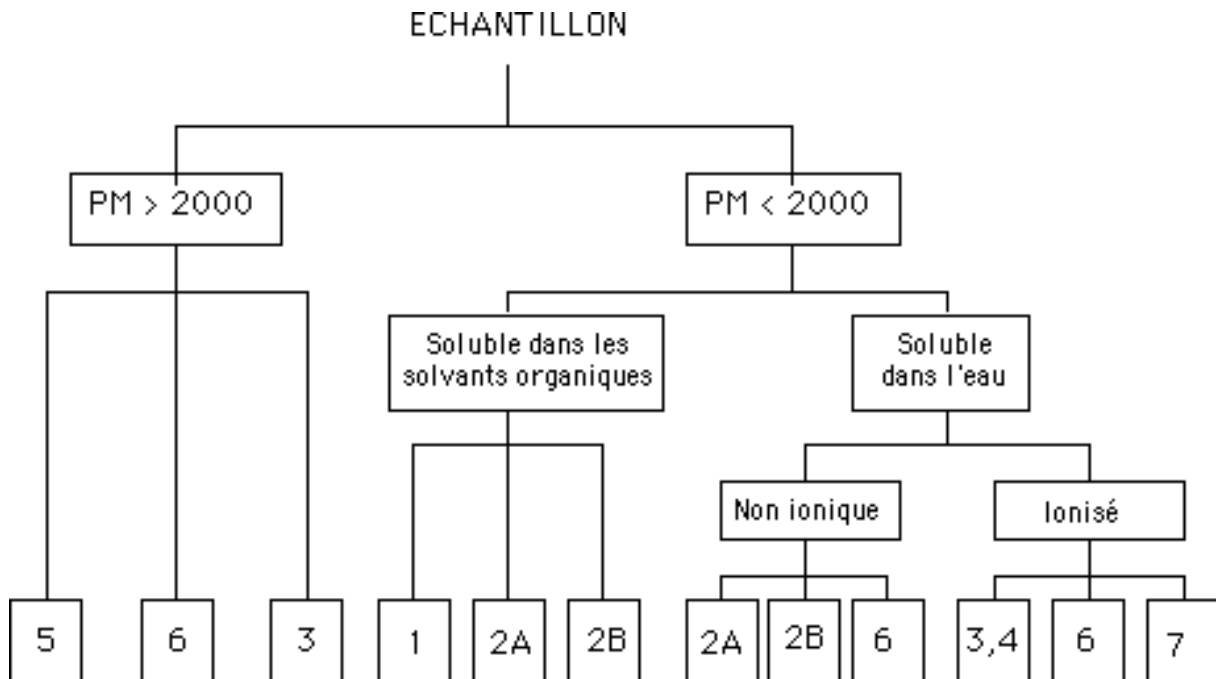
L'une des principales applications de la chromatographie d'affinité est l'isolement de protéines ou d'acides nucléiques dont voici quelques exemples :

| ligand  | exemples de molécules isolées   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>protéine A</b> (<i>recombinante</i>) : protéine de <i>Staphylococcus aureus</i> à haute affinité pour le fragment F<sub>c</sub> des anticorps de type IgG ;</li> <li>• <b>protéine G</b> (<i>recombinante</i>) : protéine de surface des streptocoques du groupe G, récepteur de type III du fragment F<sub>c</sub> des anticorps de type IgG.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>IgG</b> de mammifères</li> <li>• exonucléases</li> </ul>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>concanavaleine A</b> (<i>les lectines en général</i>) : protéines qui se fixent sur des résidus spécifiques de la partie osidique des glycoprotéines et qui ont des propriétés agglutinantes (exemple : érythrocytes).</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• fixation sur des résidus α-D-mannopyranosyl ou α-D-glucopyranosyl terminaux des <b>glycoprotéines</b></li> </ul>                                   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ADN</b> natif ou dénaturé de thymus de veau</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>polymerases</b> (ADN, ARN)</li> <li>• exonucléases</li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>lysine</b></li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>plasminogène</b></li> <li>• ARN ribosomal</li> </ul>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>iminodiacétate</b> : chélateur de métaux</li> <li>• boronate</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>métalloprotéines</b></li> <li>• protéines à groupements cis-diol</li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>colorants</b> de l'industrie textile (exemple : bleu de procion ou "Cibacron blue®") : les enzymes qui fixent les mono- ou dinucléotides puriques interagissent avec les cycles portés par les colorants dont la structure est très proche de celle du NAD<sup>+</sup>.</li> </ul> <p style="text-align: center;">voir l'exemple du "Bleu A™"</p>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>déshydrogénases</b> à NAD(P)<sup>+</sup></li> <li>• <b>kinases</b> dépendantes de l'ATP</li> </ul>  |
| <p style="text-align: center;"><b>3 Choix d'une méthode de chromatographie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>poly(U)</b> (<i>acide polyuridylique</i>)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ARN messagers</b> par hybridation à leur queue poly(A)</li> <li>• protéines se liant au poly (U) (interféron, transcriptase inverse)</li> </ul> |



## Section 2 item 5

Le choix de tel ou tel mode obéit à des règles logiques directement liées à la nature des composés à séparer :



- 1 - chromatographie d'adsorption
- 2 - chromatographie de partage (en phase directe (2A) ou inverse (2B))
- 3 - chromatographie d'échange d'ions (+ chromatographie ionique)
- 4 - chromatographie de paires d'ions
- 5 - chromatographie d'exclusion (séparation selon la taille)
- 6 - chromatographie d'affinité
- 7 - chromatographie adaptée à la séparation d'énantiomères

| paramètres  | type de chromatographie                        | domaine d'application  |
|---|--|--|
| la charge électrique  | échange d'ions                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• protéines</li> <li>• polypeptides</li> <li>• acides aminés</li> <li>• acides nucléiques</li> <li>• sucres</li> </ul>                        |
| la taille et la forme (en fait, le volume)  | exclusion ou gel de filtration                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• protéines</li> <li>• polypeptides</li> <li>• acides nucléiques</li> <li>• sucres</li> <li>• lipides</li> </ul>                              |
| l'existence de structures particulières qui permettent d'établir des liaisons spécifiques | affinité                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• protéines</li> </ul>  |
| la polarité<br>et/ou<br>l'hydrophobicité  | polarité de phase inversée<br>ou phase reverse | <ul style="list-style-type: none"> <li>• protéines</li> <li>• polypeptides</li> <li>• acides aminés</li> <li>• acides nucléiques</li> <li>• sucres</li> <li>• acides gras</li> </ul> |
|   | interactions hydrophobes                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• protéines</li> </ul>  |

schéma p294 moniteur

3. Tableau résumé des différents types de chromatographie.

| phase stationnaire | principe de séparation         | caractéristiques de la phase stationnaire   | principe de la fixation et de l'élution  |
|--------------------|--------------------------------|---|--|
| liquide            | partage                        | liquide fixé sur un support inerte (papier, silice...)  | distribution des composants du mélange à séparer dans les deux phases liquides selon leur coefficient de partage                           |
| solide             | adsorption                     | adsorbant solide polaire  | phénomène de surface : formation de liaisons spécifiques entre les composants et la surface adsorbante                                     |
|                    | adsorption (phase inverse)     | molécules hydrophobes greffées sur de la silice   | interactions hydrophobes et élution par diminution de la polarité de la phase mobile   |
|                    | échange d'ions                 | résine (polymères d'oses) porteuse de groupements chargés négativement ou positivement  | interactions électrostatiques avec les composants de charge opposée  |
|                    | exclusion (filtration sur gel) | solide poreux   | les composants de diamètre supérieur à celui des billes du support sont "exclus" et ceux de diamètre inférieur y diffusent et sont freinés |
|                    | affinité                       | support sur lequel est greffée une molécule (le ligand) spécifiquement reconnue par un des composants de l'échantillon à analyser | déplacement de l'équilibre de liaison [molécule - ligand greffé] en faveur de l'équilibre [molécule - tierce molécule]                     |