

Introduction à la DSP - Chromatographie

Vos objectifs:

A la fin de la leçon, vous devriez être capable de comprendre en détail le processus de la chromatographie et d'expliquer les séparations qui se produisent.

L'un des aspects les plus importants des processus de fabrication de Biogen est la récupération et la purification d'une seule molécule, la protéine cible. Cette molécule existe généralement en solution et doit être isolée des autres composants de la solution.

La chromatographie fournit une méthode pour séparer les molécules des solutions complexes. En analysant les caractéristiques d'une molécule cible, on peut la différencier des autres molécules présentes dans une solution. La molécule cible peut alors être séparée à l'aide des procédés chromatographiques appropriés.

Les méthodes de chromatographie et le nombre d'étapes de chromatographie dépendent de la composition chimique de la molécule ainsi que du degré de pureté requis pour le produit final. En général, les méthodes de chromatographie impliquent un type spécifique de liaison qui est réversible. Les méthodes de chromatographie sont si puissantes et précises qu'elles peuvent souvent distinguer des protéines dont la composition ne diffère que d'un seul acide aminé ou même d'un seul atome. De plus, comme les conditions et les processus de la chromatographie sont doux, elle permet de séparer de manière fiable des composants délicats et très fragiles.

La chromatographie comporte deux phases : la phase stationnaire et la phase mobile, chacune se déplaçant dans une direction définie, et sont généralement requises pour l'approbation réglementaire des médicaments protéiques.

La façon la plus simple d'expliquer la chromatographie est de la comparer à une rivière en crue:

Une rivière en crue peut transporter de nombreux débris. La vitesse à laquelle les débris flottants sont déplacés dépend (1) des types de ces débris (par exemple, les grains de sable sont transportés plus rapidement que les cailloux) et (2) de la nature du lit de la rivière (par exemple, les surfaces rugueuses augmentent la friction des débris flottants, ce qui ralentit leur vitesse d'évacuation) sur la vitesse d'écoulement.

En chromatographie, diverses substances (= débris flottants dans la "rivière") sont transportées dans la phase dite mobile (= "eau de la rivière") sur une phase stationnaire (= "lit de la rivière"). En raison des interactions* dans l'échantillon, la phase stationnaire et la phase mobile, les substances individuelles sont transportées à des vitesses différentes et sont, pour cette raison, séparées et distinguées les unes des autres lorsqu'un mélange de "sable", de très petits et de plus gros "cailloux" est introduit à un certain moment dans la "rivière" ; selon l'analogie, après 100 mètres, tout le sable arrivera en premier (réparti sur quelques mètres), et, après une certaine période d'attente, tous les petits cailloux suivront et, beaucoup plus tard, les plus gros objets, tous éparpillés sur une certaine distance.

L'analogie avec la rivière est suffisamment illustrative pour permettre une première compréhension du processus de chromatographie (bien que le processus réel de chromatographie évoque peut-être davantage un processus connu sous le nom de "trafic stop-and-go"), dans lequel les molécules de l'échantillon sont soit entraînées par la phase mobile (comme un "radeau léger" qui est transporté passivement dans un courant), soit adhérent à la phase stationnaire (à "vitesse zéro"). Les molécules passent et repassent (vacillent) entre ces deux possibilités très rapidement et les vagues de chaleur agissent comme des "chocs".

L'analogie du lit de la rivière n'est pas exacte dans la mesure où les retards que subissent les différentes molécules de l'échantillon (à travers le système chromatographique) ne rendent pas compte du phénomène de friction. La base pour comprendre cette différence se trouve dans la répartition des différents types de molécules (types A, B, C, etc.), qui correspondent à des différences dans le temps que les différentes molécules passent dans la phase mobile. La chromatographie permet de convertir ces différences en "différences de vitesse", les rendant ainsi réellement efficaces pour une séparation, sans laquelle ces différences infimes (minuscules) ne pourraient être utilisées, ni pour les processus de séparation et de nettoyage, ni pour les analyses appropriées.

* (Pour les interactions, voir les principes de "division sous séparation").

Le processus

Quatre phases de chromatographie sont effectuées :

1. Établissement du flux de la phase mobile,
2. Injection de l'échantillon à séparer,
3. Séparation effective, et
4. Détection des composants

L'écoulement de la phase mobile est obtenu par l'un des trois moyens suivants : par pression (par exemple, pompe hydraulique, pression de gaz), par force capillaire, ou encore par application d'une tension électrique.

L'injection (c'est-à-dire l'introduction du mélange de substances dans le système chromatographique) a lieu soit avant que l'écoulement de la phase mobile ne soit établi (chromatographie en couche mince), soit lorsque la phase mobile est déjà en écoulement. Dans le cas d'un grand nombre d'échantillons, on utilise ce que l'on appelle des échantillonneurs automatiques avec des types de chromatographie automatisables (ainsi que leurs propres systèmes d'acquisition de données), qui injectent les échantillons de manière entièrement automatique.

La séparation proprement dite du mélange de substances s'effectue dans la phase de séparation.

Enfin, (comme pour la séparation ou la phase séparée), la chromatographie serait inconcevable sans détection (rendue visible lorsqu'une substance passe une certaine section du système chromatographique ou lorsqu'une substance s'arrête à la fin du processus). Différents systèmes de détection sont appliqués pour chaque type de chromatographie, soit en utilisant les propriétés physiques des substances (par exemple, l'absorption de la lumière, la fluorescence, la diffusion de la lumière et la conductivité thermique), - soit en obtenant un signal par le biais de réactions chimiques ; par exemple, une coloration obtenue en **Chromatographie Couche Mince** (par exemple des acides aminés à l'aide de la ninhydrine), - soit ensuite par le biais de réactions effectuées avant la séparation (dérivatisation pré-colonne) ou sinon après la séparation (dérivatisation post-colonne), en **chromatographie sur colonne**.

Dans le cas de la **chromatographie préparative**, un collecteur de fraction est en outre nécessaire pour recueillir la substance séparée.

De par leur conception, les procédés de purification chromatographique sont toujours des procédés par cycles. Cela signifie que seule une certaine quantité de substance peut être injectée et séparée avant de passer à la quantité suivante (égale), ce qui est particulièrement problématique lorsque l'on traite de grandes quantités. C'est pourquoi des méthodes spécifiques, qui ne pourraient pas toutes être réalisées autrement par une simple purification sur colonne, ont été développées afin de faire fonctionner la chromatographie en continu:

La **chromatographie annulaire continue (CAC)**, la **chromatographie à lit mobile véritable (TMB)** et la **chromatographie à lit mobile simulé (SMB)**.

La CAC se prête à la séparation de mélanges à plusieurs composants ainsi qu'à des mélanges à deux composants.

La TMB est utilisée comme un procédé rentable.

La SMB est un concept théorique.

Nota bene:

Une méthode de **dérivatisation précolonne** a été développée pour la détermination de la pénicilline par chromatographie liquide à haute performance (**CLHP, HPLC**) en utilisant la détection par fluorescence. ... Le mélange réactionnel résultant a été injecté directement sur une colonne à phase inversée et analysé par HPLC.

La dérivatisation post-colonne, également appelée réaction **post-colonne**, rend visibles certains composés qui sont normalement invisibles. Cette astuce est réalisée **après** la séparation en effectuant une réaction chimique sur les substances qui leur donne une propriété physique facilement détectable.