

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 532 055**

②1 N° d'enregistrement national :

**83 13252**

⑤1 Int Cl<sup>3</sup> : G 01 N 31/08.

①2

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 12 août 1983.

③0 Priorité IL, 15 août 1982, n° 66551.

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 8 du 24 février 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : CAIS Michael, SHIMONI Moshe et So-  
ciété dite : TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT  
FOUNDATION LTD. — IL.

⑦2 Inventeur(s) : Michael Cais et Moshe Shimoni.

⑦3 Titulaire(s) :

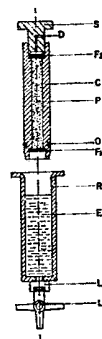
⑦4 Mandataire(s) : Armand Kohn.

⑤4 Procédé pour un type nouveau de chromatographie et dispositif pour l'application de ce procédé.

⑤7 L'invention concerne un procédé de chromatographie à  
colonne dynamique pour la séparation d'un ou de plusieurs  
composés présents dans une solution, qui se caractérise par  
l'emploi d'un lit mobile de matière adsorbante solide.

Le dispositif comporte un piston C muni, à la base, d'un  
élément d'étanchéité O et présentant un canal longitudinal  
contenant la matière adsorbante P entre deux barrières F1, F2,  
ainsi qu'un tube à essai R muni, à la base, d'une valve à  
plusieurs voies LV.

Ce procédé s'applique à la chromatographie au gel de silice,  
en phase liquide inversée, par affinité capillaire, à la chromato-  
focalisation, à la filtration par gel et à la chromatographie à  
échange d'ions.



FR 2 532 055 - A1

D

La présente invention concerne un procédé de chromatographie nouveau, qui sera appelé ci-après "chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique" (et qui est désigné en anglais par l'abréviation D C L C), destiné à la séparation de deux ou de plusieurs  
5 composants. L'invention concerne en particulier un procédé nouveau de séparation de deux ou de plusieurs composés présents dans une solution, selon lequel on utilise un système chromatographique à lit mobile.

Comme on le sait, le terme chromatographie désigne un certain  
10 nombre de procédés physiques qui sont utilisés en chimie et en biologie pour séparer et identifier des mélanges de composés chimiques. Le principe qui est à la base de toutes les variantes de procédés de chromatographie réside en ce que l'on soumet de façon répétée un mélange de composés chimiques à une extraction par  
15 liquide ou à une adsorption sur une surface d'une matière solide. Le mélange est déplacé physiquement sur une phase fixe (lit ou colonne), qui peut être soit une matière solide, soit une matière liquide immobilisée dans les pores d'une matière solide (placée dans le lit ou dans la colonne précitée). Pour la séparation de  
20 composés chimiques par chromatographie peuvent être utilisées, selon le système chromatographique particulier dont il s'agit, l'une ou plusieurs des forces physico-chimiques qui sont indiquées ci-après:

- 25 (a) différences d'adsorption par le milieu poreux, appelé sorbant;
- (b) différences entre les solubilités relatives d'un liquide couvrant le milieu inerte (phase fixe) et le liquide, appelé phase mobile, qui filtre à travers la colonne poreuse;
- (c) différences d'échange d'ions avec le sorbant;

(d) différences de dimension moléculaire, comme la solution filtrée à travers un gel de très petite dimension.

La chromatographie est aussi appelée chromatographie préparatoire lorsqu'elle est utilisée à l'isolement d'une fraction d'un mélange préalablement à l'exécution d'autres opérations, telles que  
5 celles que comportent la spectroscopie, l'identification et la synthèse à des fins de recherche ou dans des buts commerciaux.

Le travail initial, en ce qui concerne la chromatographie, est basé sur les différences d'adsorption sur une matière inerte contenue dans une colonne. La séparation des composants, également  
10 connue sous l'appellation de chromatographie de partage, est basée sur les solubilités relatives dans le solvant que l'on fait passer sur la colonne. Le pouvoir résolvant qui est obtenu dans le cas de cette chromatographie est fonction du pH et de la résistance ionique du solvant - la phase mobile - ainsi que des solubilités relatives des constituants dans les deux phases; les différentes matières peuvent être éluées au moyen d'un solvant convenable et les fractions liquides peuvent être recueillies dans  
15 une série de tubes et être ensuite analysées par des procédés chimiques ou physiques. La chromatographie sur couche mince (désignée en anglais par l'abréviation TLC) et la chromatographie sur papier sont basées sur les différences d'adsorption relative d'un composant sur un milieu inerte. Dans le cas de la chromatographie sur couche mince (TLC), la phase fixe est constituée par  
20 une mince couche d'une substance finement divisée appliquée à une feuille, à un support de matière plastique ou à une plaque de verre. Les sorbants communément utilisés, qui peuvent être obtenus dans le commerce sous la forme de plaques finies, sont

l'alumine, le gel de silice et la cellulose. Dans le cas de la chromatographie sur papier, la phase mobile peut se déplacer vers le haut, par effet de capillarité, auquel cas il s'agit de la chromatographie ascendante, ou la phase mobile peut se  
5 déplacer vers le bas, par gravité, auquel cas il s'agit de la chromatographie descendante.

La chromatographie à échange d'ions consiste en la séparation de molécules sur base de leur charge ionique. Le sorbant ou phase fixe est constitué par des polymères à ions à liaison  
10 covalente. Dans les résines échangeuses de cations, les ions étroitement liés sont chargés négativement et sont associés à des ions positifs qui sont reliés de façon lâche par des charges électrostatiques. Les substances chargées positivement qui sont à séparer d'un mélange sont tout d'abord adsorbées vers le sor-  
15 bant, les cations présents dans la résine étant déplacés. La solution est tamponnée à un pH qui facilitera la liaison et elle est ensuite éluée au moyen du même tampon afin qu'en soient éliminées les fractions non liantes. Un échangeur d'anions agit exactement de la même façon, si ce n'est que ses ions à liaison  
20 covalente sont chargés de façon opposée pour attirer les anions en dehors de la solution.

La séparation basée sur les différences de dimension moléculaire se rencontre dans la filtration par gel et est également connue sous l'appellation de chromatographie à tamis moléculaire.  
25 Par ce procédé, les molécules sont séparées selon leur dimension, bien que la forme de la molécule affecte la filtration dans une certaine mesure. Les gels se présentent sous la forme de perles contenant un réseau d'ouvertures de pores dans les-

- quelles de petites molécules peuvent être retenues. Le vaste intérêt commercial porté à la chromatographie, d'une manière générale, et à la chromatographie en phase liquide préparatoire, en particulier, est révélé par le grand nombre de publications dans  
5 lesquelles il est question de remplissages de colonnes microparticulaires de genres divers et de colonnes préalablement remplies de différentes sortes devant permettre d'obtenir une meilleure séparation que ne le permettent les adsorbants connus qui sont utilisés dans ce domaine.
- 10 Les inventeurs du procédé de chromatographie qui est proposé dans la présente demande de brevet ont concentré leur recherche sur la mise au point d'un principe nouveau de chromatographie selon lequel on utilise des adsorbants de types connus, mais qui permette de mener la séparation très rapidement et plus ai-  
15 sément que ce n'était le cas jusqu'à présent. Le principe nouveau de la chromatographie consiste, suivant la présente invention, à utiliser une colonne dynamique dans laquelle le lit contenant l'adsorbant soit mobile, contrairement à ce qui se présente dans le cas de la technique de la chromatographie clas-  
20 sique et courante, selon laquelle la matière adsorbante est fixe.

La présente invention concerne donc un procédé pour un type nouveau de technique de chromatographie, appelé ci-après chromatographie en phase liquide à colonne dynamique (désigné en anglais par l'abréviation DCLC), prévu pour la séparation d'un ou de plusieurs  
25 composés présents dans une solution, le procédé proposé étant caractérisé en ce qu'il est utilisé un lit de matière adsorbante solide mobile et un dispositif comportant un piston qui est muni à

la base d'un élément d'étanchéité et qui présente un canal longitudinal contenant une matière adsorbante qui est maintenue entre deux barrières, ainsi qu'un tube à essai qui est muni à la partie inférieure d'une valve à plusieurs voies, le piston précité s'a-

5 justant étroitement dans le tube à essai, et en ce qu'en poussant le piston dans le tube à essai, on fait passer dans le canal l'é-

10 luant voulu, qui a tout d'abord été amené à traverser la valve, les composés adsorbés à séparer se trouvant entre les barrières précitées étant ainsi déplacés et la solution obtenue sortant par

15 un ajustage prévu à l'une des extrémités du piston. Le cas général, qui semble se présenter le plus fréquemment, est l'emploi d'une colonne ou d'un lit de matière adsorbante solide comme zone d'adsorption, auquel cas le procédé concurrencera le plus favorablement les procédés de chromatographie classiques et usuels. Le procédé qui est proposé selon la présente invention est d'une très

20 grande précision et il offre, par rapport à ces procédés de chromatographie classiques et usuels, les principaux avantages qui sont indiqués ci-après:

- (a) contrairement au fait que, dans le cas de la chromatographie
- 20 classique et usuelle, il se présente un écoulement gravitationnel, dans le cas de la chromatographie en phase liquide à colonne dynamique, une certaine pression est exercée de façon inhérente dans le lit de matière adsorbante, ce qui assure un meilleur pouvoir résolvant dans la séparation des
- 25 constituants;
- (b) le procédé est d'une exécution très rapide, en conséquence de ce que la pression intrinsèque est exercée dans le système;
- (c) la quantité d'éluant que nécessite l'application du procédé

est moindre que celle que nécessite l'application des procédés de chromatographie classiques et usuels;

- (d) la présence de la pression intrinsèque dans le système de chromatographie dynamique permet d'utiliser une matière adsorbante à particules de moindre dimension que ce n'est le cas pour la chromatographie classique et usuelle, ce qui donne lieu à une plus haute sensibilité.

La prévision de la valve à plusieurs voies revêt un caractère d'importance particulière lorsqu'il doit être introduit dans le tube à essai plusieurs éluants consécutifs, qui doivent ensuite passer par le lit de matière adsorbante en vue de l'obtention du fractionnement voulu. Lorsque le lit de matière adsorbante est utilisé en ordre principal pour le traitement préalable d'un échantillon ou pour l'élimination de l'un des composés, la présence de la valve n'est pas obligatoire, et un simple tube à essai fermé à la base, qui est adjoint au piston, peut être utilisé. Dans ce cas, l'éluant doit être introduit dans le tube à essai avant que le piston soit abaissé. Il semble évidemment que, même si aucun fractionnement n'est nécessaire, il soit plus avantageux d'utiliser le tube à essai muni d'une valve, en ce qui concerne le lavage de la matière adsorbante et l'introduction de l'éluant par aspiration de celui-ci par la valve.

L'élément d'étanchéité glisse le long de la face interne de la paroi du tube à essai et se trouve donc en même temps en bon contact avec cette face interne, ce qui permet un ajustement étroit du piston dans le tube à essai. L'élément d'étanchéité sera en règle générale constitué par un joint torique fait de

caoutchouc ou d'une autre matière convenable, joint torique présentant une ouverture de passage et prévu pour glisser le long de la face interne de la paroi du tube à essai. Si le dispositif est fait de verre, la face externe du piston recevra à la  
5 fabrication un poli tel qu'elle puisse remplir le rôle du joint torique.

Le procédé, dans son ensemble, est d'une très grande souplesse et il peut trouver son application dans un grand nombre de cas, étant donné ses diverses formes de réalisation possibles entrant  
10 dans le cadre de la présente invention. Une question difficile à résoudre, qui se présente dans le cas de tous les genres de chromatographie, est l'application uniforme de l'échantillon à la surface du lit. Si l'échantillon est appliqué directement par écoulement gravitationnel, une application uniforme peut être re-  
15 lativement difficile à obtenir, étant donné que le lit a tendance à tourbillonner lorsque l'échantillon y est introduit. C'est là la raison pour laquelle il est d'une importance toute particulière que la surface soit protégée, par exemple au moyen d'un morceau de papier-filtre de rayonne. L'un des fabricants de colon-  
20 nes (la Pharmacia Fine Chemicals AB) munit certaines des colonnes d'un dispositif spécial, auquel il a donné le nom de "sample applicator" (dispositif applicateur d'échantillon), qui est destiné à protéger la surface du lit. Dans ce dispositif de protection, il est prévu un mince tissu de Nylon qui est placé à l'ex-  
25 trémité d'un court bout de tube de Perspex qui s'adapte à l'intérieur du tube de chromatographie. La prévision d'un dispositif de ce genre augmente évidemment le prix de la fabrication de l'appareil, sans compter qu'elle présente un inconvénient, en ce sens que la présence de ce dispositif a pour effet de faire agir une

pression sur l'écoulement de l'échantillon, ce qui entraîne un ralentissement de la filtration de celui-ci dans la colonne.

Dans le cas de la plupart des systèmes de chromatographie dans lesquels le principe de la présente invention est appliqué, la

5 difficulté d'obtenir une application uniforme et régulière est allégée dans une importante mesure. Dans le courant dynamique qui se présente dans le lit chromatographique, le liquide étant chassé vers le haut lorsque le piston est poussé dans le tube à

10 essai, il ne se manifeste aucune tendance au tourbillonnement du fait de l'introduction de l'échantillon. De plus, la pression qui est exercée dans le système lorsque le piston est poussé dans le tube à essai accélérera l'écoulement de l'échantillon.

Un autre moyen auquel on a recours pour favoriser une application uniforme et régulière de l'échantillon consiste à placer

15 au-dessus du lit une autre matière adsorbante convenable, différente de la matière adsorbante qui est déjà présente dans le lit, cette matière adsorbante supplémentaire ayant pour rôle de soumettre l'échantillon à une concentration préalable et de favoriser de cette manière l'obtention d'une étroite bande de résolution.

20 Un exemple type d'une telle matière adsorbante convenable est la silice grossière, qui diffère de la silice active par ses hautes propriétés d'adsorbant.

La dimension des particules et la répartition des dimensions des particules doivent être contrôlées avec minutie dans la plupart

25 des opérations de la chromatographie classique et usuelle. Comme on le sait, un lit qui sera constitué de petites particules donnera en règle générale un bon pouvoir résolvant. La raison de ceci est que les mécanismes qui donnent lieu à un élargissement des

zones sont amplifiés à mesure que la dimension des particules est accrue. Lorsque les particules sont de grosse dimension, la diffusion dans les particules et hors des particules prend plus de temps. L'écoulement dans un lit de grosses particules est inférieur, ce qui donne davantage lieu à un nouveau mélange. D'autre part, la résistance à l'écoulement dans un lit qui contient de grosses particules est plus faible et la vitesse d'écoulement maximum qui peut être atteinte est plus élevée. Par conséquent, dans le cas des opérations de la chromatographie classique et usuelle, il s'agit de réaliser, en ce qui concerne la dimension des particules, un compromis qui puisse assurer le maximum de résolution de zones dans les conditions d'écoulement requises. Dans le cas du procédé nouveau de chromatographie en phase liquide à colonne dynamique (DCLC), qui est proposé par la présente invention, on peut utiliser une matière adsorbante en particules de petite dimension sans éprouver l'inconvénient que l'on rencontre lorsqu'on a recours aux procédés connus, la faible pression qui est exercée de manière inhérente dans le système dominant la résistance à l'écoulement qui est due à la petite dimension des particules. Par conséquent, ce procédé peut même être adopté dans les cas où il s'agit d'obtenir un fractionnement rigoureux, lorsque l'emploi d'une matière relativement fine est nécessaire en vue de l'obtention du pouvoir résolvant voulu.

Dans l'une des demandes de brevet antérieures de la Demanderesse, (R.F.A. No. 3126926.5), on a décrit un procédé nouveau de transfert de masse et de séparation au moyen de barrières sélectives selon lequel on utilise un dispositif qui comporte des éléments semblables à ceux qui sont prévus dans le cas de la présente in-

vention. Comme on l'a indiqué dans cette demande de brevet, le dispositif comporte un séparateur-mélangeur qui est muni d'une membrane et un réservoir mélangeur dans lequel le séparateur-mélangeur est poussé. Sur le séparateur-mélangeur, il est prévu un

5 dispositif destiné à assurer l'accumulation d'une poche d'air en vue d'une diminution de la pression exercée sur la membrane. Au cours du fonctionnement du mélangeur-séparateur, une quantité d'air déterminée est retenue dans la poche d'air, quantité d'air qui, lorsqu'elle est comprimée, joue le rôle d'un coussin ou d'un

10 amortisseur de choc pour reprendre une partie de la pression qui résulte de la résistance de la membrane à l'écoulement du liquide. En ce qui concerne la chromatographie en phase liquide à colonne dynamique qui fait l'objet de la présente invention, la présence de la poche d'air peut être considérée comme moins nécessaire que dans le cas précédent. Toutefois, en ce qui concerne

15 certains systèmes, dans le cas desquels des pressions relativement élevées sont mises en jeu, la poche d'air semble avoir un rôle important à jouer, la quantité d'air retenue renvoyant dans le tube à essai tout liquide pouvant avoir grimpé dans l'espace

20 compris entre la face interne de la paroi du tube à essai et la face externe de la paroi de l'extrémité de bout du piston. La quantité d'air retenue par ce moyen sur le piston sera fonction de nombreux facteurs, tels que le type de barrière utilisé, les constituants des mélanges à séparer et les conditions particulières

25 régnant dans le système chromatographique spécifique en question. Un avantage particulier de l'utilisation d'une telle poche d'air se présente dans le cas où il est nécessaire de laisser sortir complètement l'éluant par un joint torique placé à la partie inférieure du piston pour jouer le rôle d'élément d'étanchéité.

Le procédé qui fait l'objet de la présente invention peut être utilisé avec succès dans les différentes sortes de chromatographie: chromatographie au gel de silice, chromatographie en phase liquide inversée, chromatographie capillaire, chromatographie 5 par affinité, chromatofocalisation, chromatographie à exclusion de dimension (également connue sous l'appellation de filtration par gel) et chromatographie à échange d'ions.

La chromatographie au gel de silice est l'un des procédés les plus communément répandus, le gel de silice, qui représente de 10 loin l'une des meilleures matières adsorbantes connues, étant relativement peu coûteux par rapport aux autres matières adsorbantes. Les résultats de séparation qui sont obtenus à l'aide du gel de silice dans le cas du procédé faisant l'objet de la présente invention sont en substance les mêmes ou sont meilleurs, 15 en ce qui concerne la précision de la séparation et les rendements de récupération, que ceux qui sont obtenus dans le cas des procédés de genre classique et usuel, mais cette séparation est plus rapide et nécessite également l'emploi d'une moindre quantité de solvant. Ce procédé offre aussi un avantage particulier en ce sens que la colonne peut être réutilisable. De plus, 20 on peut utiliser des particules de gel de silice de dimension relativement petite et prévoir un remplissage relativement dense, en bénéficiant des avantages d'une séparation plus élevée.

La chromatographie en phase liquide inversée se caractérise par 25 le fait que sa phase fixe est moins polaire que la phase mobile. Le principal inconvénient que présente l'utilisation du gel de silice est qu'il ne peut être obtenu qu'une récupération partielle

des composés qui passent par un tel lit. Etant donné les avantages qu'offre le procédé de chromatographie en phase liquide à colonne dynamique (DCLC) qui fait l'objet de la présente invention, la chromatographie en phase liquide inversée pourrait également  
5 être utilisée avec succès dans la chromatographie préparatoire. Au cours des derniers temps, un vif intérêt a été porté à la chromatographie capillaire, en particulier en raison de mises au point de microcolonnes permettant la chromatographie en phase liquide de haut rendement. La raison de ces mises au point réside dans les  
10 avantages de ce type de chromatographie qui sont indiqués ci-après:

(a) obtention possible de plus grands rendements de séparation pour des mélanges complexes et des produits difficiles à dissoudre;

(b) diminution sensible de la consommation d'éluant.

15 Le procédé de chromatographie en phase liquide à colonne dynamique (DCLC) qui fait l'objet de la présente invention pourrait aisément trouver son application dans le cas de la chromatographie capillaire, avec un étroit canal dans le piston qui a été décrit plus haut.

La filtration par gel, qui est également connue sous l'appellation  
20 de chromatographie à exclusion de dimension, fait actuellement l'objet d'un intérêt de plus en plus marqué dans l'épuration de substances biologiques, moyennant l'utilisation d'une matière adsorbante convenable comme milieu de séparation. De bons résultats ont été obtenus dans la séparation de l'Iodine-hCG marquée à par-  
25 tir d'Iodine marquée, par l'emploi d'une matière adsorbante du type Sephadex G (produite par la Pharmacia Fine Chemicals, Suède), la chromatographie dynamique qui fait l'objet de la présente in-

vention étant utilisée (voir exemple 3). La chromatographie à filtration par gel est également considérée comme un procédé simple et rapide pour le dessalement ou le changement de tampon. Le lit de gel doit être équilibré avant l'expérience au  
5 moyen d'une solution présentant la composition ionique qui est voulue, par exemple de l'eau distillée dans le cas du dessalement. L'élution est effectuée à l'aide du même liquide. Etant donné les hautes vitesses qui peuvent être prévues, l'ensemble de l'opération peut se terminer en un court laps de temps, la  
10 matière dessalée étant recueillie en quelques minutes. D'autres applications de la chromatographie à filtration par gel associée à la chromatographie dynamique sont le traitement préalable à la chromatographie en phase liquide à haute pression (désignée en anglais par l'abréviation HPLC) et la concentra-  
15 tion d'échantillons dilués suivie de séparation.

La chromatofocalisation est utilisée dans une ample mesure pour la séparation de protéines selon leurs points isoélectriques. Etant donné que la chromatofocalisation produit des bandes extrêmement étroites de matière séparée et nécessite en règle gé-  
20 nérale de longues colonnes étroites, il est clair que la chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique sera un procédé idéal pour ce type de chromatographie, avec un étroit piston pour le dispositif qui a été décrit précédemment.

La chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC)  
25 représente également un procédé qui se prête de façon avantageuse à la chromatographie à échange d'ions, bien connue comme l'un des procédés de séparation les plus courants. On a effectué différentes expériences pour séparer du sulfate de cuivre et du bichromate de sodium sur du Dowex 50 WX 8 comme matière adsorbante

(voir exemple 2). On a constaté qu'en utilisant la chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC), on pouvait obtenir d'importants avantages en ce qui concernait la durée, le volume de solvant et la commodité.

5 Un autre avantage qu'offre la chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC) qui fait l'objet de la présente invention est une importante diminution du volume mort. Comme on le sait, le volume mort est défini comme le volume de liquide qui est contenu dans l'espace interstitiel entre les grains  
10 de la matière adsorbante constituant le lit. Dans la plupart des opérations de chromatographie classique et usuelle, le volume mort représente une difficulté qui affecte la détermination d'un résultat précis. En ce qui concerne la chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC), étant donné  
15 qu'un remplissage dense est possible, la répartition d'équilibre de la substance entre la matière adsorbante et le liquide est établie très rapidement, avec un très faible volume mort. Par conséquent, il sera possible d'obtenir des zones nettes et étroites. Ceci est très important dans le cas des expériences de frac-  
20 tionnement, dans lesquelles les différences de volume d'élu- tion entre les substances sont en règle générale faibles. Dans le cas de la filtration sur gel, en particulier, d'importants volumes morts affaibliront le pouvoir de résolution obtenu.

Suivant une autre forme de réalisation de la présente invention,  
25 la matière adsorbante est contenue dans une cartouche que l'on place à l'intérieur du canal longitudinal du piston. De cette manière, le dispositif de chromatographie se prêtera à être utilisé

à de nombreuses fins; il suffira, dans chaque cas particulier, de remplacer la cartouche par une cartouche contenant la matière adsorbante convenable. La figure 5 des dessins qui sont annexés à ce mémoire illustre cette forme de réalisation de la présente invention. Le procédé est très simple, et sa grande souplesse d'application peut être citée au nombre de ses divers avantages. Il existe de nombreuses formes de réalisation, que l'on propose par la présente invention, du dispositif qui permet d'appliquer le procédé nouveau décrit dans ce mémoire. On expliquera ci-après, de façon amplement détaillée, certaines de ces formes de réalisation du dispositif en se référant aux figures 1 à 9 des dessins ci-annexés, mais il est bien entendu que ces formes de réalisation ne sont présentées qu'à simple titre d'exemples, afin de faire mieux comprendre l'invention, et qu'elles n'ont aucune portée limitative.

Sur la figure 1 des dessins annexés à ce mémoire, on a représenté un tube à essai, désigné par la lettre de référence R, qui est muni d'un obturateur de Luer L, auquel est fixée une valve à trois voies LV. L'éluant voulu, désigné par la lettre de référence E, est chassé dans le tube à essai R. Le piston, désigné par la lettre de référence C, que comporte le dispositif présente un canal longitudinal, dans lequel est placée la matière adsorbante, désignée par la lettre de référence P, qui est maintenue par les deux membranes F1 et F2, prévues respectivement à la partie inférieure et à la partie supérieure du piston C. Au-dessus de la membrane supérieure F2, il est prévu un bouchon S, qui est percé d'un passage D, par lequel la frac-

tion ayant été séparée du lit de matière adsorbante est recueillie. A la partie inférieure du piston C, il est prévu un joint torique O, dont le rôle est d'assurer l'étanchéité, joint torique qui est monté de façon qu'il puisse glisser le long de la face interne de la paroi du tube à essai R.

Dans le cas de la forme de réalisation du dispositif qui est proposé pour l'application du procédé faisant l'objet de la présente invention que l'on a illustrée par la figure 2 des dessins ci-annexés, il n'est pas prévu de valve à la partie inférieure du tube à essai, désigné ici encore par la lettre de référence R, une quantité limitée de l'éluant choisi E étant introduite dans le tube à essai R dès le début de l'opération. Le piston C présente, ici encore, le canal longitudinal dans lequel la matière adsorbante P est placée et est maintenue entre les deux membranes F1 et F2. Au-dessus de la membrane supérieure F2, il est, dans ce cas comme dans celui qui est illustré par la figure 1, prévu un bouchon S. L'ajutage D, par lequel est recueillie la fraction séparée du lit de matière adsorbante, est en communication avec le piston C. A la partie inférieure du piston C, il est ici encore prévu un joint torique O comme élément d'étanchéité. Le dispositif dont il vient d'être question peut être utilisé lorsqu'aucun fractionnement n'est nécessaire, l'opération ne comportant qu'un seul cycle et un seul éluant étant utilisé.

Dans le cas de la forme de réalisation du dispositif proposé selon la présente invention qui est illustrée par la figure 3 des dessins ci-annexés, le tube à essai se présente exactement comme celui qui est représenté sur la figure 2, c'est-à-dire qu'il

n'est pas muni de valve à la partie inférieure. Le piston C présente encore le canal longitudinal dans lequel la matière adsorbante P est placée et est maintenue par les deux membranes F1 et F2. Au-dessus de la membrane supérieure F2, il est, ici encore, 5 prévu un bouchon S, qui est percé d'un passage D par lequel est recueillie la fraction séparée du lit de matière adsorbante. A la partie inférieure du piston C, il est encore prévu un joint torique O comme élément d'étanchéité.

Dans le cas de la forme de réalisation du dispositif qui est illustrée par la figure 4 des dessins ci-annexés, le dispositif 10 se présente sous sa forme la plus simple; il ne comporte toujours pas de valve à la partie inférieure du tube à essai R et il ne porte pas de bouchon S à la partie supérieure du piston C. Une quantité limitée d'éluant choisi E est introduite dans le tube à essai R dès le début de l'opération. Le piston C présente toujours 15 le canal longitudinal dans lequel la matière adsorbante P est placée et est maintenue entre les deux barrières F1 et F2 - membranes ou filtres. Le joint torique O est prévu à la partie inférieure du piston C et a pour rôle d'assurer l'étanchéité; il est monté, 20 ici encore, de façon qu'il puisse glisser à la face interne de la paroi du tube à essai R. Avec le canal longitudinal qui contient la matière adsorbante P communique un ajutage D, par lequel la fraction séparée est recueillie.

La figure 5 des dessins ci-annexés illustre le cas du procédé selon lequel on utilise une cartouche, désignée par les lettres de 25 référence CA, contenant la matière adsorbante voulue P, cartouche

que l'on introduit dans le canal longitudinal, désigné par la lettre de référence I, que présente le piston C. L'éluant peut être recueilli par un passage, comme dans le cas des formes de réalisation que l'on a décrites plus haut en se référant aux 5 figures précédentes. Le joint torique O, destiné à assurer l'étanchéité, est prévu à la partie inférieure du piston C.

Le mode de travail est très simple, comme on pourra s'en rendre compte en se référant à la description qui sera donnée ci-après avec référence à la figure 1 des dessins ci-annexés. Le piston 10 C est abaissé dans le tube à essai R, qui est rempli de l'éluant choisi E. De cette manière, l'éluant est chassé à travers la membrane inférieure F1, puis à travers la matière adsorbante P que contient le canal longitudinal du piston C, et il s'écoule enfin goutte à goutte par l'ajutage D (voir figure 4). Lorsque 15 le dispositif est rempli d'une matière de support convenable P, il agit comme une colonne de chromatographie. Le remplissage du tube à essai R est effectué simplement; il suffit d'ouvrir la sortie du tube à essai et d'introduire une quantité d'éluant par la valve LV (voir figure 1).

20 La figure 6 des dessins ci-annexés illustre une forme de réalisation de la colonne dynamique dans le cas de laquelle le piston C de la colonne se déplace vers le haut pour pénétrer dans le tube à essai R et dans le cas de laquelle la sortie de l'éluant a lieu par un étroit canal vertical X, qui se trouve dans le 25 prolongement direct de la matière de support chromatographique de la colonne. La figure 7 illustre une variante de réalisation

de la colonne dynamique qui est représentée sur la figure 6, variante selon laquelle un réservoir de solvant en colonne est relié à la colonne dynamique.

La figure 8 des dessins ci-annexés illustre une forme de réalisation du dispositif qui fait l'objet de la présente invention selon laquelle le piston C de la colonne dynamique est formé de deux ou de plusieurs sous-unités qui peuvent contenir chacune la même matière adsorbante ou une matière adsorbante différente P, avec possibilité de recueillir l'éluant obtenu de chacune des sous-unités.

La figure 9 des dessins ci-annexés illustre une autre forme de réalisation encore du dispositif proposé pour l'application du procédé faisant l'objet de la présente invention et elle permet de se rendre compte de la souplesse d'application de la chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC), dont l'utilité peut, dans ce cas, être plus étendue; selon cette autre forme de réalisation, l'éluant sortant est transporté vers une autre colonne, qui peut contenir la même matière adsorbante P que celle qui est contenue dans la première ou une matière adsorbante différente P, transport qui a lieu par le conduit Y.

Les figures 10 à 12 des dessins ci-annexés représentent par des diagrammes les résultats de la séparation de divers mélanges, telle qu'elle est décrite dans les exemples 4, 5 et 6 donnés plus loin. Quant à la figure 13, elle illustre par un diagramme le procédé de chromatographie par affinité pour l'isolement de IgG, tel qu'il est décrit dans l'exemple 9 donné plus loin.

En principe, il peut être envisagé d'utiliser la chromatographie

dynamique dans des échangeurs d'ions liquides également. Les échangeurs d'ions liquides sont définis comme des systèmes d'extraction liquide - liquide qui travaillent, au moins dans le principe, par échange d'ions à l'interface entre une solution aqueuse et un solvant non miscible, avec distribution négligeable de l'agent d'extraction dans la phase aqueuse. Des échangeurs d'anions liquides sont utilisés dans la chromatographie par extraction à phases inversées. Selon ce procédé, la matière de support (gel de silice, poudre de cellulose, etc.), imprégnée de l'échangeur d'anions liquide, est utilisée comme phase fixe et une solution d'un acide ou de l'un des sels de l'acide est utilisée comme éluant (phase mobile). Pour l'application de la présente invention, la membrane doit être choisie de telle sorte qu'elle ne soit perméable qu'à l'éluant, mais qu'elle ne puisse pas laisser passer l'échangeur d'ions liquide, lequel doit rester dans le canal longitudinal que présente le piston.

Le dispositif à utiliser pour l'application du procédé de chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC) qui fait l'objet de la présente invention peut être fait de toute matière inerte, telle que du verre, du polyéthylène ou toute autre matière plastique convenable, et il peut même être envisagé d'utiliser un dispositif fait de métal pour certains usages spéciaux.

On expliquera encore l'invention de façon plus concrète à l'aide des exemples d'application de celle-ci qui seront donnés plus loin, mais il est bien entendu que la portée de l'invention n'est nullement limitée à ces exemples, ni aux formes de réali-

sation qui sont décrites dans la présente spécification. Il est au contraire prévu que soient couvertes ici toutes variantes, modifications et équivalents pouvant entrer dans le cadre de la présente invention tel qu'il sera défini dans les revendications 5 qui seront formulées en fin de ce mémoire.

Exemple 1: Séparation d'un mélange de ferrocène et d'aldéhyde de ferrocène.

(a) Procédé de remplissage

1,0 g de silice (Merck, Kieselgel H (gel de silice), type 60) 10 est mis en dispersion dans 5 ml d'une solution dégazée de dichlorométhane/hexane 1:1 dans le tube à essai fermé, en vue de l'obtention d'une boue. Le piston, muni du bouchon et de la membrane supérieure, est introduit dans le tube à essai de telle façon qu'il soit obtenu un ferme contact entre le joint torique et le 15 tube à essai.

L'ensemble de l'unité ainsi formée est retourné de manière à occuper une position verticale, le bouchon se trouvant à la base et l'air est éliminé de cette unité par la sortie que présente le tube à essai. La sortie du tube à essai est ensuite fermée et le 20 remplissage est effectué par abaissement du tube à essai sur le piston fixe, à une vitesse d'écoulement d'environ 1 ml/min. Lorsque le lit de silice s'est complètement déposé, la sortie du tube à essai est ouverte et le tube à essai est retiré du piston. La membrane inférieure est alors mise en place, et la colonne est 25 ainsi prête à recevoir l'échantillon.

(b) Mise en place de l'échantillon

Un mélange de ferrocène et d'aldéhyde de ferrocène est dissous

dans 0,2 - 0,4 ml de dichlorométhane et la solution est mise en place sur la membrane inférieure de la colonne, qui occupe la position verticale. La solution traverse la membrane et les composants sont adsorbés par la silice. La marche de ce procédé peut 5 être accélérée si l'on applique une certaine pression d'air, en utilisant le tube à essai fermé.

(c) Elution

Le piston rempli est introduit dans le tube à essai, qui contient 5 ml de l'éluant choisi. L'air est éliminé comme lors du remplis- 10 sage de la colonne et l'élution est effectuée par descente du piston dans le tube à essai rempli, à une vitesse d'écoulement d'environ 1 ml/min.

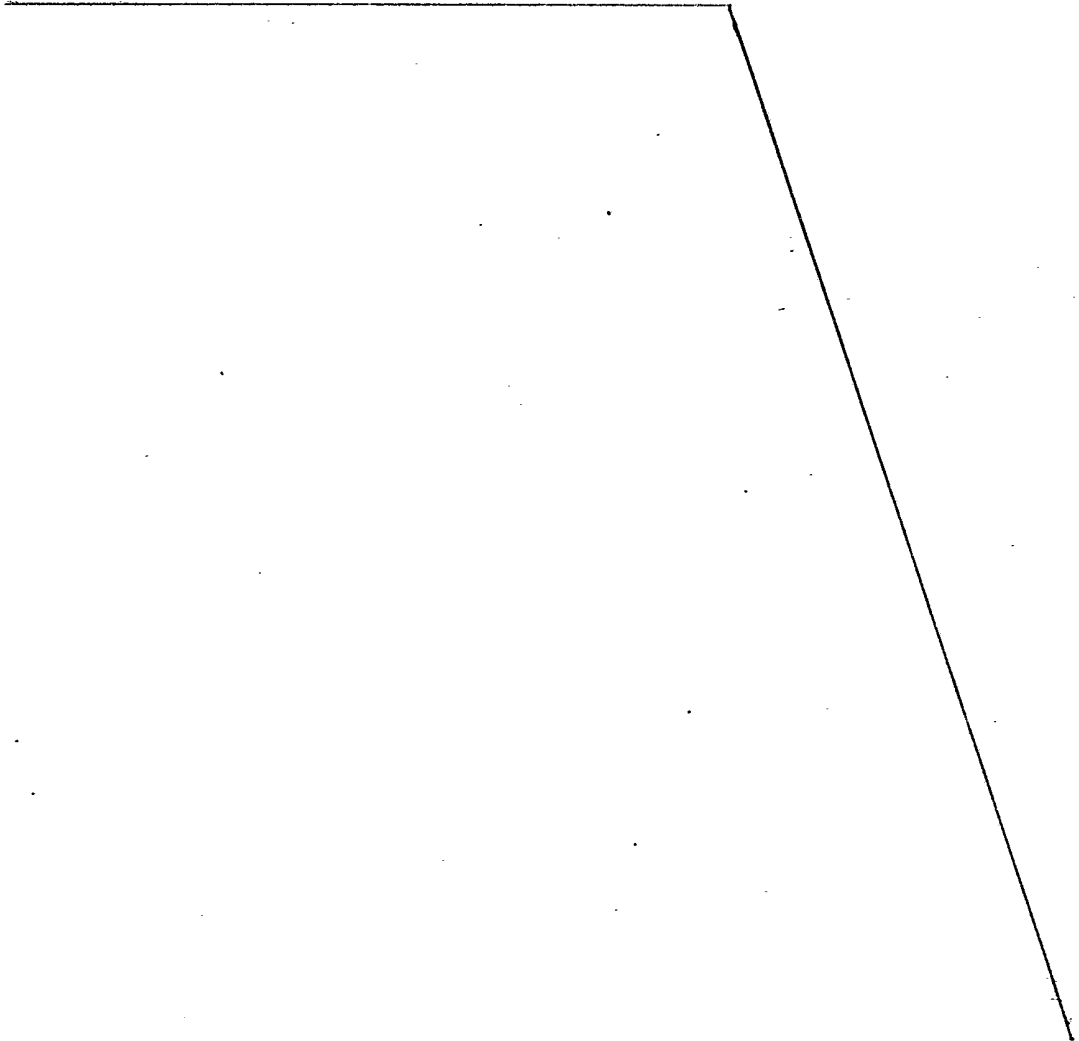


TABLEAU I

I) Séparation d'un mélange type contenant du ferrocène (13 mg)  
et de l'aldéhyde de ferrocène (19 mg)

N° de fract.	Volume d'éluant	Eluant	Poids de résidu	Caractéristique
5	0	1 ml hexane	0	-
	1	" "	11,4 mg	ferrocène
	2	" "	0,79	ferrocène
	3	" "	0,31	ferrocène
10	4	" dichloro- méthane	traces	-
	5	" "	1,79	aldéhyde
	6	" "	13,36	aldéhyde
	7	" "	4,59	aldéhyde
15	8	" "	1,69	aldéhyde
	9	" "	traces	-

II) Séparation d'un mélange type contenant du ferrocène (25,3 mg)  
et de l'aldéhyde de ferrocène (15,6 mg)

N° de fract.	Volume d'éluant	Eluant	Poids de résidu	Caractéristique
20	0	1 ml hexane	0,2 mg	ferrocène
	1	" "	19,0	ferrocène
	2	" "	1,7	ferrocène
	3	" "	0,3	ferrocène
25	4	" "	0	-
	5	" dichloro- méthane	0	-
	6	" "	0,2	aldéhyde
	7	" "	11,5	aldéhyde
30	8	" "	2,9	aldéhyde
	9	" "	0,7	aldéhyde
	10	" "	0	-

Exemple 2: Séparation de  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  de  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$   
par échange d'ions.

La matière adsorbante est constituée par du DOWEX 50 WX 8  
(dimension de maille 200 - 400). La matière adsorbante est tout  
5 d'abord lavée et, ensuite, laissée pendant un laps de temps de  
30 minutes environ dans de l'eau distillée acidifiée au moyen  
d'acide chlorhydrique (2N). L'acidité est alors éliminée par  
lavage à l'eau distillée, et la matière adsorbante neutre est  
introduite dans le canal qui présente le piston. Les deux mem-  
10 branes qui maintiennent le lit de matière adsorbante sont cons-  
tituées par deux disques de filtre de polyéthylène poreux.

L'échantillon de solution aqueuse est constitué par 359,3 mg de  
 $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  et par 369,7 mg de  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  dissous dans  
1 cc d'eau. L'échantillon est introduit dans la matière adsor-  
15 bante, la quantité d'échantillon prise pour l'analyse étant de  
100  $\mu\text{l}$ . Les ions sont séparés de la colonne par lavage et séparés  
comme il est indiqué ci-après:

- les anions par eau distillée,
- les cations par une solution acide constituée par de  
20 l'acide chlorhydrique 2 N.

Les parties sont recueillies dans des tubes à essai. La fin du la-  
vage est déterminée d'après la couleur de la solution de sortie.  
Les échantillons sont ensuite analysés quantitativement par sé-  
chage des différentes parties à 110° C et par pesée du résidu sec.

25 On a effectué une expérience pour le résidu en introduisant 100  
 $\mu\text{l}$  de l'échantillon dans un tube à essai et en séchant à la tem-  
pérature de 110° C. Le résidu solide pesait 68,5 mg.

Les résultats relatifs aux différentes fractions séchées pesées

sont donnés dans le tableau 2 qui suit. Pour l'expérience 2, la colonne, après l'expérience 1, a été lavée au neutre et neutralisée.

**TABLEAU 2:** Séparation par échange d'ions par la chromatographie dynamique

5					
N° de l'exp.	N° de la fract.	la Eluant utilisé	Poids de la fract. séchée mg	Poids total mg	Remarques
	1	H <sub>2</sub> O	43,0		
10	2	"	0,2		
	3	"	0	43,2	*
	4	HCl(2N)	0,5		
	5	"	15,2		
	6	"	27,5		
15	7	"	3,2		
	8	"	1,3	47,7	*
* fraction sans couleur					
	2	H <sub>2</sub> O	44,2		
20	2	"	1,1		
	3	"	0,1	45,3	*
	4	HCl(2N)	0,4		
	5	"	2,3		
	6	"	34,0		
25	7	"	5,7		
	8	"	0,8	43,2	*

\* fraction sans couleur

Il ressort des résultats qui sont donnés ci-dessus qu'après la filtration de 8 fractions à travers la matière adsorbante, pratiquement tous les composés avaient été enlevés et séparés.

Afin de mettre en évidence l'efficacité du procédé de chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC) qui fait l'objet de la présente invention, on a effectué un essai comparatif en utilisant la chromatographie classique et usuelle, par écoulement gravitationnel, à l'aide de la même quantité de 100  $\mu$ l d'échantillon et de la même matière adsorbante. Les résultats de cet essai sont donnés dans le tableau 3 qui suit.

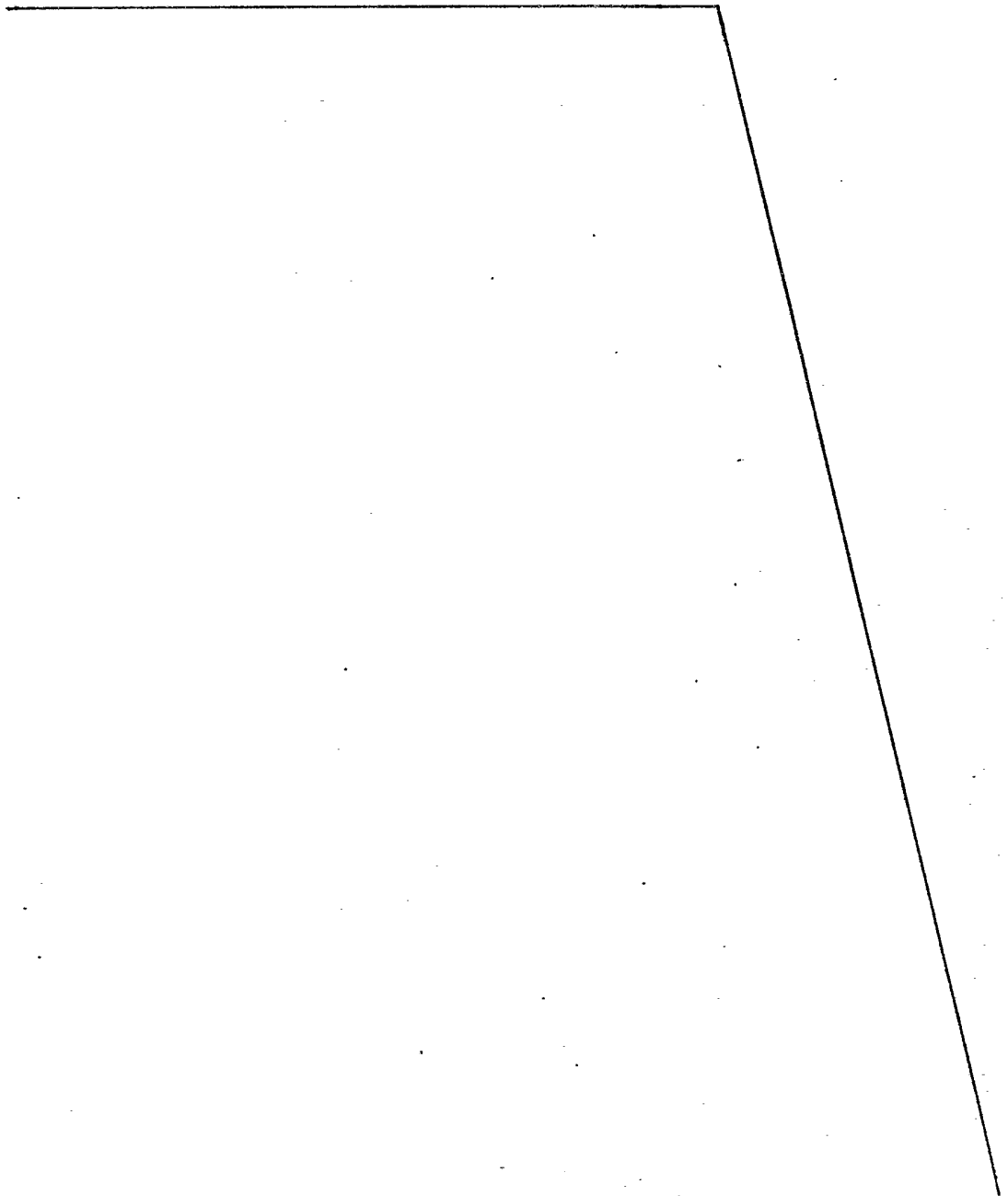


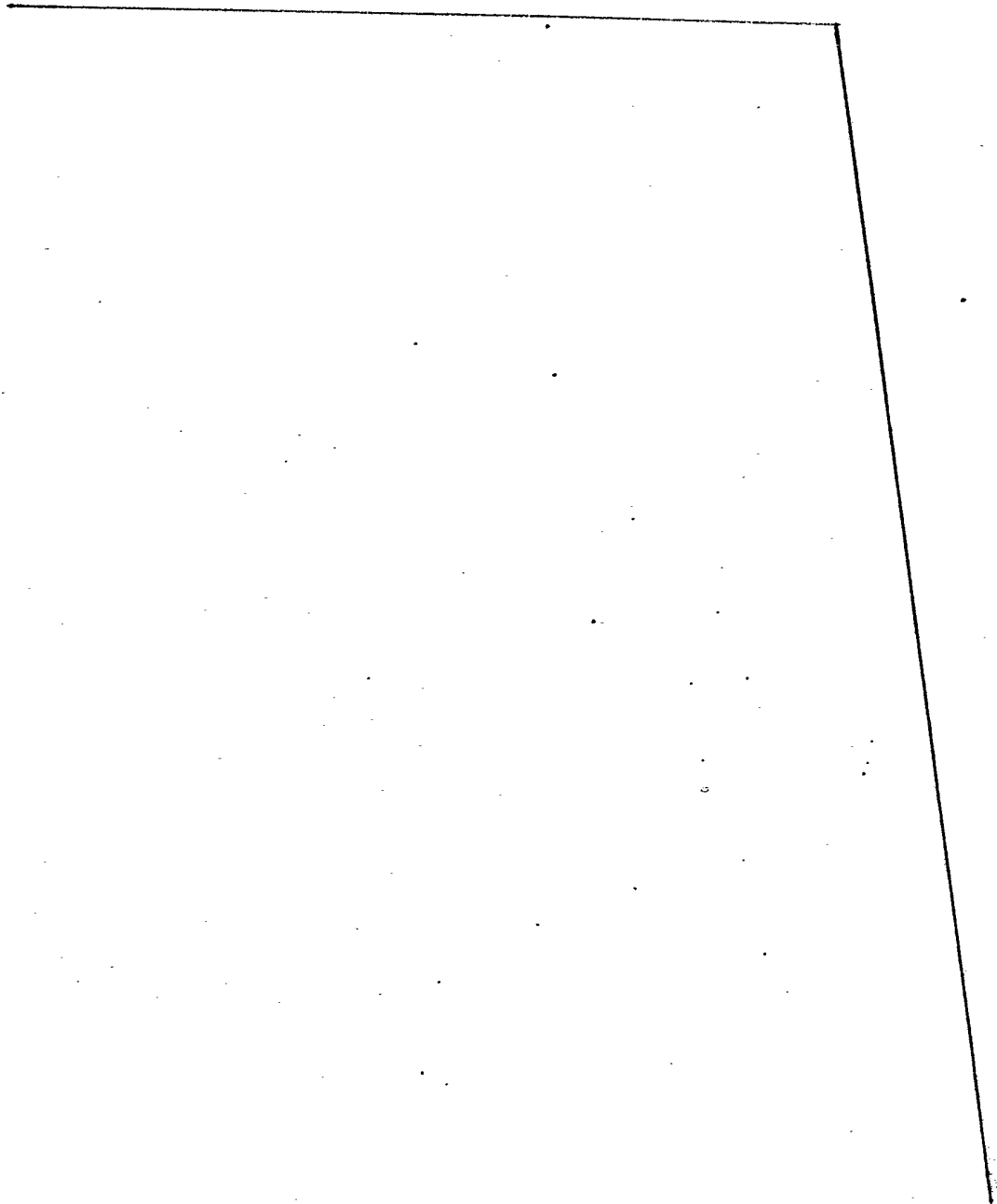
TABLEAU 3: Séparation par échange d'ions au moyen d'une colonne  
de chromatographie de genre classique

	N° de la fraction	Eluant utilisé	Poids de la fraction séchée mg	Poids total mg	Remarques	
5	1	H <sub>2</sub> O	0,8			
	2	"	50,3			
	3	"	1,3			
	4	"	0,5			
	10	5	"	0,2		
		6	"	0,3		
		7	"	0,4		
		8	"	0,1		
		9	"	0,3		
	15	10	"	0,4		
		11	"	0,1		
		12	"	0,3		
		13	"	0,1	54,9	fraction sans couleur
20	14	HCl(2N)	0,0			
	15	"	2,3			
	16	"	23,0			
	17	"	12,7			
	18	"	3,3			
	19	"	1,4			
	20	"	1,4	44,1	fraction sans couleur	

Exemple 3

Au cours de cette expérience, on a séparé une solution de 100  $\mu$ l de  $\beta$ -hCG contenant 30 - 35 % d'iodine marquée ( $^*I_2$ ) par le procédé de chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique 5 (DCLC), en utilisant comme matière adsorbante du Sephadex G-10. On a effectué l'élution à l'aide de 10 ml de tampon au pH d'environ 8. Chaque fraction était d'environ 0,4 ml.

Les résultats de cette expérience sont donnés dans le tableau 4 qui suit.



**TABIEAU 4:** Séparation de  $\beta$ -hCG contenant de l'iode marqué  
 $^{125}\text{I}_2$  sur du Sephadex G-10, avec élution à l'aide d'un  
tampon pH environ 8

	N° de la fraction	En blanc	c p m déterminé	Total
5	1	29,0	0	
	2	9348,0	9578,0	
	3	1946,0	1962,8	
	4	292,0	267,7	
10	5	130,0	104,8	
	6	114,0	84,5	
	7	108,0	82,0	
	8	78,0	48,2	12125 cpm
15	9	79,0	49,6	
	10	98,0	67,7	
	11	134,0	102,9	
	12	182,0	152,5	
	13	414,0	389,3	
20	14	485,0	464,4	
	15	766,0	757,5	
	16	854,0	834,7	
	17	635,0	615,5	
	18	450,0	424,6	
25	19	504,0	486,4	
	20	378,0	348,5	
	21	284,0	256,8	
	22	158,0	127,7	
30	23	131,0	99,8	5169 cpm
	<b>Total</b>	<b>20534,0</b>	<b>20594,4</b>	<b>17294</b>

Il ressort du tableau qui précède que la récupération est d'environ 85 %. Cette séparation, lorsqu'elle est effectuée par le procédé de chromatographie classique et usuel, exige l'utilisation d'une quantité beaucoup plus importante d'éluant et elle prend également un temps plus long.

#### Exemple 4

Au cours de cette expérience, une solution d'un mélange de colorants se composant de 35 % de rouge Cérés 7B, de bleu Nitro rapide 2B à raison de 28 %, de violet Nitro rapide FBL à raison de 25 % et de jaune Cérés R à raison de 12 % (pourcentage en volume pour chacun des colorants) a été séparée par le procédé de chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC). Le mélange de colorants avait été procuré par Merck (numéro du catalogue 9354).

Une quantité de 30  $\mu$ l du mélange de colorants dans du dichlorométhane a été injectée dans une DCLC contenant du LICHROPREP Si-60 (marque de Merck, numéro du catalogue 9336), matière adsorbante à base de silice comportant des particules de silice d'une dimension de l'ordre de 15 à 25  $\mu$ m. Les dimensions de la colonne étaient les suivantes: longueur 10,6 cm et diamètre interne 10 mm. La vitesse d'écoulement fut de 2 ml/min et l'éluant était du dichlorométhane.

Les résultats de la séparation sont rendus par le diagramme que représente la figure 10 des dessins annexés à ce mémoire, diagramme dans lequel on a porté en ordonnée la densité optique (O.D.) à 254 nm et en abscisse les fractions. Comme on peut

s'en rendre compte en se référant à ce diagramme, il a été obtenu une séparation rapide et nette.

#### Exemple 5

Au cours de cette expérience, un mélange d'aromatiques polycycliques se composant de benzène à raison de 50 %, de naphthalène à raison de 30 % et d'anthracène à raison de 20 % (pourcentages en volume) dans une solution de n-heptane a été séparé par le procédé de chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC).

10 L'échantillon injecté était de 50  $\mu$ l et l'on a utilisé une colonne présentant les mêmes dimensions que celle qui a été utilisée dans le cas de l'expérience décrite dans l'exemple 4, la colonne contenant la même matière adsorbante que dans le cas de cette expérience. La vitesse d'écoulement fut aussi de  
15 2 ml/min., le volume de chaque fraction étant de 1 ml. L'éluant était du n-heptane.

Les résultats de la séparation sont rendus par le diagramme que représente la figure 11 des dessins annexés à ce mémoire, diagramme dans lequel on a porté en ordonnée la densité optique (O.D.) à 254 nm et en abscisse les fractions. Comme on  
20 peut s'en rendre compte en se référant à ce diagramme, les composants ont été séparés en trois pointes aiguës.

#### Exemple 6

Au cours de cette expérience, un mélange d'alkylphtalates a  
25 été séparé par le procédé de chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC) et l'on a utilisé une colonne semblable à celle qui a été utilisée dans le cas de l'expérience décrite dans l'exemple 4, la colonne contenant la même

matière adsorbante que dans le cas de cette expérience.

Le mélange d'alkylphtalates était un mélange de dibutylphtalate, de diéthylphtalate et de diméthylphtalate dans du n-heptane / acétate d'éthyle (90/10 parties par volume). L'éluant 5 était un mélange de n-heptane / acétate d'éthyle (90/10 parties par volume). La vitesse d'écoulement fut de 3 ml/min, le volume de chaque fraction étant de 1 ml. Les résultats de la séparation sont rendus par le diagramme que représente la figure 12 des 10 dessins annexés à ce mémoire, diagramme dans lequel on a porté en ordonnée la densité optique (O.D.) à 254 nm et en abscisse les fractions.

Comme on peut s'en rendre compte en se référant à ce diagramme, une séparation nette a été obtenue.

#### Exemple 7

##### 15 Epuration d'anti-hCG

L'épuration de l'anti-hCG a été effectuée par le procédé de chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC) et l'on a utilisé deux sources différentes de ce composé: a) SERONO et b) MILES, la seconde étant connue pour être moins concentrée que 20 la première.

##### a) Epuration de l'anti-hCG (SERONO)

Une ampoule d'anti-hCG a été reconstituée au moyen de 1 ml de tampon de phosphate (pH = 6,3). La solution a été appliquée sur une colonne de 10,6 cm de longueur et de 10 mm de diamètre interne, qui contenait comme matière adsorbante 3 grammes de cellulose 25 (DEAE DE-52, marque de Whatman). La colonne a été éluee au moyen

de tampon de phosphate (pH = 6,3) à une vitesse d'écoulement de 2,5 ml/min. Une très haute pointe de protéines fut immédiatement visible dans les premières fractions (4 à 8). La colonne était reliée à une cellule d'écoulement avec enregistreur pour la dé-  
5 tection immédiate. Un changement de tampon, pH = 7,1, a déterminé une apparition quasi immédiate de protéines. Deux autres pointes majeures de protéines ont été éluées.

La détermination a été effectuée par lecture d'adsorbance à la densité optique (O.D.) 280 nm pour chaque fraction. On a établi  
10 l'activité immunologique de chacune des fractions de hCG par le procédé RIA (essai radio-immunologique), en utilisant les solutions qui sont indiquées ci-après: 100 µl de <sup>125</sup>I - hCG, 100 µl de sérum exempt de hCG et 100 µl de chacune des fractions. L'incubation eut une durée de 3 heures et eut lieu à la température  
15 ambiante. On a effectué la séparation en utilisant un polyéthylène glycol / double anticorps (20/1 parties en volume).

Les résultats qui ont été obtenus par cette expérience sont indiqués dans le tableau 5 qui suit.

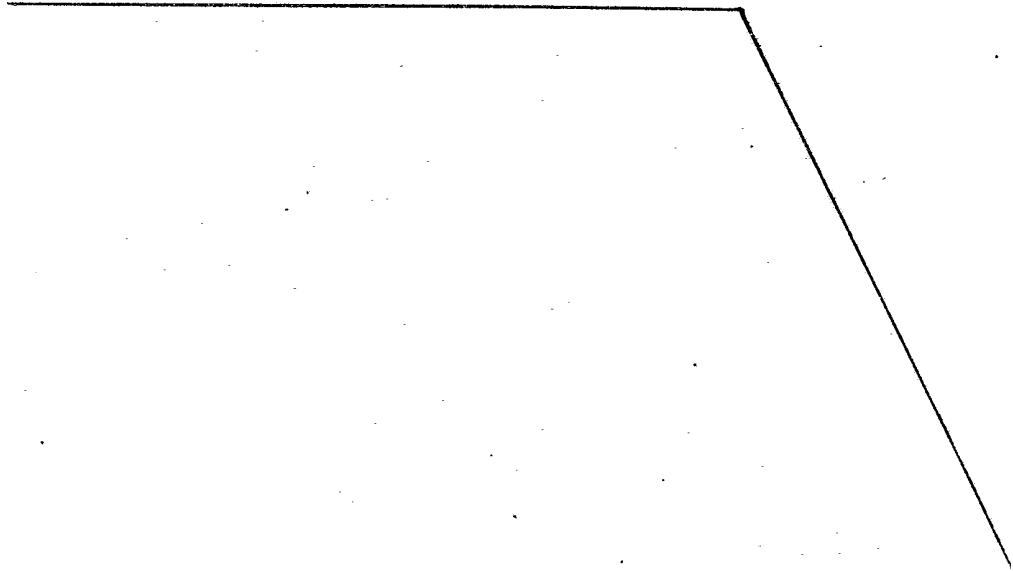


Tableau 5

## Séparation d'anti-hCG SERONO sur du DEAE DE-52

N° de la fraction		Densité optique O.D.	Essai radio-immuno- logique RIA % liaison
5	1	0,004	0,1 %
	2	0,002	0,1 %
	3	0,004	14,1 %
	4	0,006	2,1 %
	5	0,63	22,8 %
10	6	0,879	12,3 %
	7	0,097	2,8 %
	8	0,01	0,1 %
	9	0,008	0,1 %
	10	0,003	0,1 %
15	11	-	0,1 %
	12	0,002	0,1 %
	13	0,002	0,1 %
	14	0,003	0,1 %
	15	0,01	0,1 %
20	16	0,013	19 %
	17	0,039	16,4 %
	18	0,03	5,0 %
	19	0,012	3,0 %
	20	0,019	6,4 %
25	21	0,044	10,3 %
	22	0,029	4,5 %
	23	0,018	4,0 %
	24	0,015	3,0 %
	25	0,008	2,6 %
30	26	0,002	2,4 %
	27	0,002	0,1 %
	28	0,01	0,1 %
	29	-	0,1 %

Comme l'indiquent les résultats qui sont repris dans le tableau 35 5 qui précède, trois crêtes majeures ont été obtenues; l'activité immunologique est restée extrêmement élevée en comparaison de la concentration en protéines.

b) Epuration de l'anti-hCG (MILES)

70  $\mu$ l d'anticorps (tel que du sérum de lapin) ont été appliqués à la colonne de DEAE DE-52, comme dans le cas décrit précédemment et l'on a tout d'abord procédé à l'élution au moyen d'un tampon de phosphate (pH = 6,3). De même que dans le cas décrit précédemment aussi, une crête de protéines rapide a été éluée en fractions 3 et 4; par une diminution de la densité optique (O.D.) et un changement de tampon - pH = 7,1 - on a recueilli trois autres crêtes majeures.

10 Les résultats qui ont été obtenus par cette expérience sont indiqués dans le tableau 6 qui suit.

Tableau 6

Séparation d'anti-hCG MILES sur du DEAD-DE-52

	N° de la fraction	Densité optique O.D.	Essai radio-immunologique RIA % liaison	Protéine A* % liaison
5	1	0,01	0,1 %	-
	2	0,102	0,1 %	-
	3	0,656	64,2 %	2,6 %
	4	0,416	45,6 %	-
10	5	0,091	0,1 %	-
	6	0,055	0,1 %	-
	7	0,044	0,1 %	-
	8	0,022	0,1 %	-
	9	0,016	0,1 %	-
15	10	0,007	0,1 %	-
	11	0,005	0,1 %	-
	12	0,003	0,1 %	-
	13	0,003	0,1 %	-
20	14	0,004	0,1 %	-
	15	0,001	0,1 %	-
	16	0,004	0,1 %	-
	17	0,011	0,1 %	-
	18	0,034	65,4 %	7,2 %
25	19	0,291	55,5 %	12,1 %
	20	0,247	61,4 %	11,6 %
	21	0,094	63,6 %	7,0 %
	22	0,042	64,8 %	7,2 %
	23	0,041	63,4 %	-
	24	0,07	1,0 %	-
30	25	0,518	60,3 %	5,9 %
	26	0,518	67,7 %	5,3 %
	27	0,299	55,5 %	4,5 %
	28	0,161	58,4 %	3,7 %
	29	0,120	66,0 %	2,5 %
35	30	0,112	54 %	1,8 %
	31	0,091	51,3 %	3,9 %
	32	0,074	59,7 %	2,4 %
	33	0,062	55,7 %	non connu
40	34	0,062	60,9 %	-
	35	0,043	59,5 %	1,9 %
	36	0,034		
	37	0,035		
	38	0,029		
	39	0,021		

Comme il ressort des résultats qui ont été repris dans le tableau 6 qui précède, l'anti-hCG séparé a été recueilli en trois crêtes ou pointes principales. Chacune de celles-ci présentait une activité immunologique, l'absorption à 280 nm et la détermination 5 protéine A\*. Toutes les crêtes ont été nettement séparées l'une de l'autre et recueillies.

#### Exemple 8

##### Séparation de sérum humain

On a effectué une séparation de sérum humain en utilisant le procédé 10 cédé de chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DGLC), suivant la même marche de traitement que celle qui est décrite dans le Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, Md. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Londres, 1973, 2ème éd.).

15 La chromatographie était basée sur l'échange d'ions sur une matière adsorbante de cellulose et un gradient d'éluion à l'aide d'un tampon de phosphate (0,02 M) de pH 5,7.

La colonne, d'un diamètre interne de 10 mm, a été chargée de 3 g de DEAD DE-52 (marque de Whatman) et elle a été lavée à 20 l'aide du tampon de phosphate (pH = 8), à la vitesse d'écoulement de 2,5 ml/min. Le gradient a été produit à l'aide d'un système à deux chambres, avec utilisation de 40 ml de tampon de phosphate de pH 8 et de 60 ml de tampon de phosphate de pH 5,7. Une quantité de 3 ml de sérum humain a été séparée, des 25 fractions de 1,5 ml chacune ont été recueillies et leur teneur en protéines a été déterminée par densité optique (O.D.) à 280 nm.

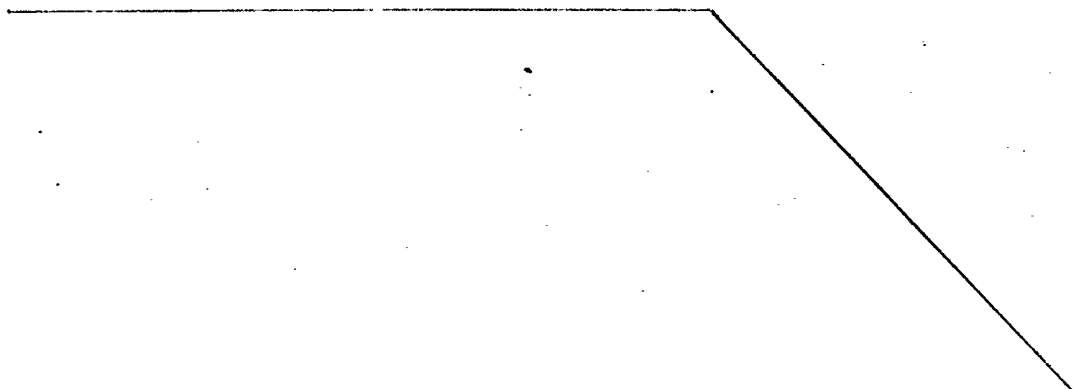
Les résultats de cette expérience sont indiqués dans le tableau 7 qui suit.

Tableau 7

Séparation de sérum humain (densité optique O.D. à 280 nm)

	<u>N° de la fraction</u>	<u>Densité optique O.D.</u>	<u>N° de la fraction</u>	<u>Densité optique O.D.</u>
5	1	0,0017	19	0,379
	2	1,3	20	0,361
	3	1,3	21	0,313
	4	1,3	22	0,233
	5	0,554	23	0,156
10	6	0,262	24	0,098
	7	0,135	25	0,06
	8	0,082	26	0,026
	9	0,067	27	0,008
	10	0,064	28	0,004
15	11	0,055	29	0,011
	12	0,052	30	0,003
	13	0,052	31	0,008
	14	0,061	32	0,015
	15	0,102	33	0,016
20	16		34	0,011
	17	0,187	35	0,005
	18	0,355	36	0,006

Comme il ressort des résultats qui sont repris dans le tableau 7 qui précède, la séparation effectuée par le procédé de chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC) donne le schéma traditionnel de la séparation de sérum humain à deux crêtes majeures (IgG, albumine). La séparation a été effectuée en un court laps de temps.



Exemple 9

Dans le cas de cet exemple, on a appliqué le procédé de chromatographie en phase liquide sur colonne dynamique (DCLC) à la chromatographie par affinité, en vue de l'isolement de IgG de lapin, en utilisant comme ligand du SEPHAROSE-4B (marque de la Pharmacia) - anticorps (anticorps = double anticorps IgG).

SEPHAROSE-4B - anticorps: l'anticorps a été couplé à la matière adsorbante SEPHAROSE-4B (marque de la Pharmacia), selon les directives données par Axel Porath et al. (Nature 214, 1967);  
10  
1 g de SEPHAROSE-4B  
30 mg de double anticorps IgG } liaison 50 %

Colonne DCLC: colonne de verre de 6 mm de diamètre interne, chargée de SEPHAROSE-4B - anticorps;  
15

Détection: a été effectuée directement à partir de la colonne, avec cellule d'écoulement; par UV à 280 nm adsorption;

Tampon:  
20  
1. tampon de phosphate / NaCl, pH 7,8;  
2. glycine / HCl (0,1 M), pH 2,5.

La marche du traitement comportait les opérations qui sont indiquées ci-après:

1. couplage du SEPHAROSE-4B au sérum de lapin double anticorps IgG;
2. remplissage de la colonne DCLC au moyen de 3 ml de gel SEPHAROSE-4B - anticorps, fermeture aux deux côtés au moyen de filtres système VYON (marque), approximativement 40 µm;
- 25  
3. lavage de la colonne chargée à l'aide de 6 ml du tampon 1;

4. charge de la colonne au moyen de 0,5 ml de N.R.S. (sérum de lapin normal;
  5. incubation d'une durée de 2 h à la température de 37° C;
  6. élution à l'aide du tampon 1 et recueillement de fractions jusqu'à ce que la densité optique au photomètre soit devenue inférieure à 0,1;
  7. élution à l'aide du tampon 2 de pH 2,5 et recueillement de fractions jusqu'à ce que la densité optique soit devenue inférieure à 0,1.
- 10 Un diagramme de la chromatographie par affinité de cet exemple est représenté sur la figure 13 des dessins qui sont annexés à ce mémoire.

LEGENDES DE LA FIGURE 10

1. Rouge Cérès 7B
2. Bleu Nitro Rapide 2B
3. Violet Nitro Rapide FBL
4. Jaune Cérès R

LEGENDES DE LA FIGURE 11

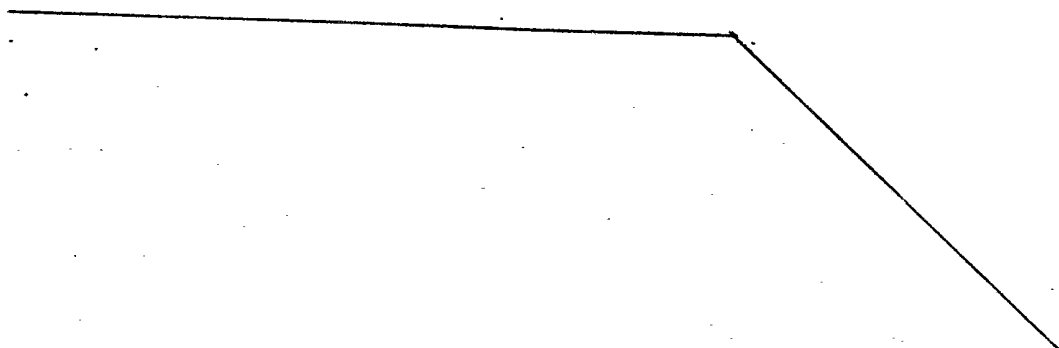
1. BENZENE
2. NAPHTALENE
3. ANTHRACENE

LEGENDES DE LA FIGURE 12

1. DIBUTYLPHTALATE
2. DIETHYLPHTALATE
3. DIMETHYLPHTALATE

LEGENDE DE LA FIGURE 13

↓ Sérum protéins



Revendications

1. Procédé pour un type nouveau de technique de chromatographie, appelé ci-après chromatographie en phase liquide à colonne dynamique, prévu pour la séparation d'un ou de plusieurs composés  
5 présents dans une solution, le procédé étant caractérisé en ce qu'il est utilisé un lit de matière adsorbante solide mobile et un dispositif comportant un piston qui est muni à la base d'un élément d'étanchéité et qui présente un canal longitudinal contenant une matière adsorbante qui est maintenue entre deux bar-  
10 rières, ainsi qu'un tube à essai qui est muni à la partie inférieure d'une valve à plusieurs voies, le piston précité s'ajustant étroitement dans le tube à essai, et en ce qu'en poussant le piston dans le tube à essai, on fait passer dans le canal l'éluant voulu, qui a tout d'abord été amené à traverser la val-  
15 ve précitée, les composés adsorbés à séparer se trouvant entre les barrières précitées étant ainsi déplacés et la solution obtenue sortant par un passage prévu à l'une des extrémités du piston.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que,  
20 lorsque la valve précitée se trouve en position de fermeture, le liquide pénètre sous pression intrinsèque dans le canal, les composés adsorbés à séparer se trouvant entre les barrières étant ainsi déplacés.

3. Procédé suivant les revendications 1 et 2, caractérisé en ce  
25 qu'une matière adsorbante convenable additionnelle, différente de la matière adsorbante utilisée dans la chromatographie en phase liquide à colonne dynamique, est incorporée afin que l'échantillon introduit soit soumis à une concentration préalable.

4. Procédé suivant les revendications 1 à 3, caractérisé en ce  
30 que le tube à essai est fermé à la partie inférieure, l'éluant étant introduit dans le tube à essai avant que le piston soit abaissé dans celui-ci.

5. Procédé suivant une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la chromatographie en phase liquide est réalisée sur du gel de silice, en phase liquide inversée, par affinité, par capillarité, par chromatofocalisation, par filtration sur gel ou par échange d'ions.
6. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la matière adsorbante, solide, est contenue dans une cartouche qui est placée dans le canal longitudinal que présente le piston.
- 10 7. Dispositif de chromatographie en phase liquide à colonne dynamique prévue pour la séparation d'un ou de plusieurs composés présents dans une solution, caractérisé en ce qu'il comporte un tube à essai qui est muni à la partie inférieure d'un élément de fermeture et d'une valve à plusieurs voies, 15 un piston qui s'ajuste étroitement dans le tube à essai, ce piston présentant un canal longitudinal contenant une matière adsorbante, tenue entre deux barrières, et un passage prévu à l'une des parties d'extrémité du piston.
8. Dispositif suivant la revendication 7, caractérisé en ce 20 que la sortie de l'éluant a lieu par un étroit canal vertical qui se trouve dans le prolongement direct de la colonne.
9. Dispositif suivant l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il est muni, à la partie inférieure du piston, d'un élément d'étanchéité monté de façon qu'il puisse 25 se glisser le long de la face interne de la paroi du tube à essai, l'élément étant de préférence en matière inerte, en particulier constitué par un joint torique en caoutchouc présentant un passage communiquant avec le canal longitudinal.
- 30 10. Dispositif suivant une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que le piston de la colonne dynamique est formé de deux ou de plusieurs sous-unités qui contiennent chacune la même matière adsorbante ou une matière adsorbante différente.

11. Dispositif suivant une des revendications 7 à 10, caracté-  
risé en ce que le passage est relié à la barrière supérieure  
du piston.
12. Dispositif suivant une des revendications 7 à 11, caracté-  
5 risé en ce qu'un bouchon est prévu à la partie supérieure du  
piston, le passage étant relié de préférence par un canal tra-  
versant le bouchon.
13. Dispositif suivant une des revendications 7 à 12, caracté-  
risé en ce que le tube à essai est fermé à la partie inférieure.
- 10 14. Dispositif suivant une des revendications 7 à 13, caracté-  
risé en ce que le piston est muni d'un dispositif qui sert à  
l'accumulation d'une poche de gaz.
- 15 15. Dispositif suivant la revendication 14, caractérisé en  
ce que le dispositif, qui sert à l'accumulation d'une poche  
de gaz, est constitué par des rainures horizontales, verti-  
cales ou hélicoïdales, formées dans le piston.

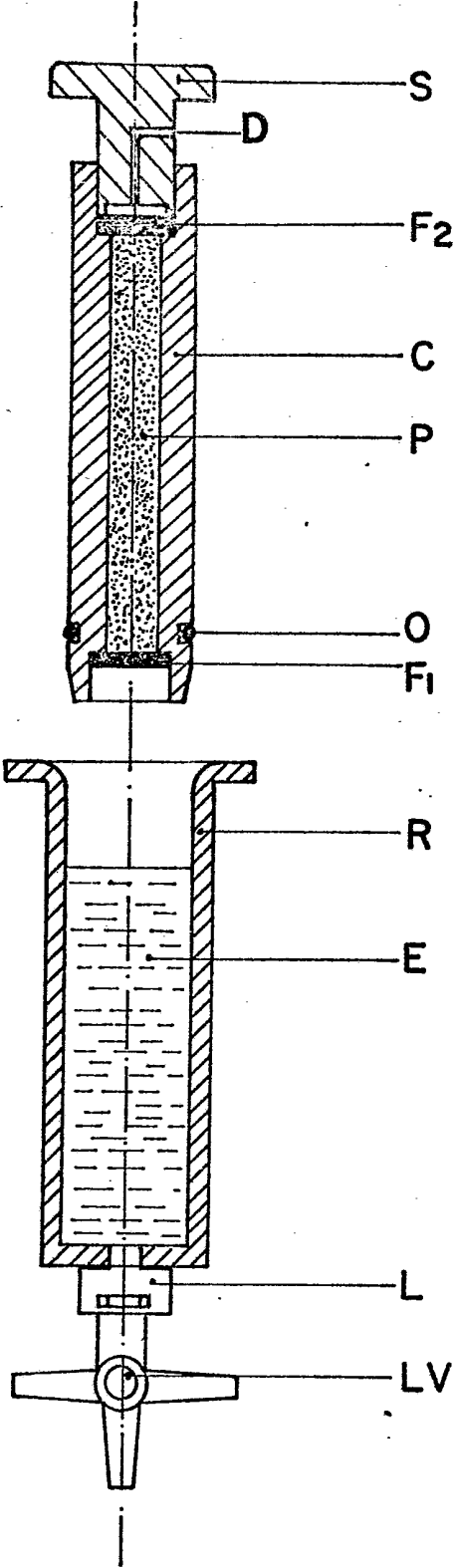


Fig. 1

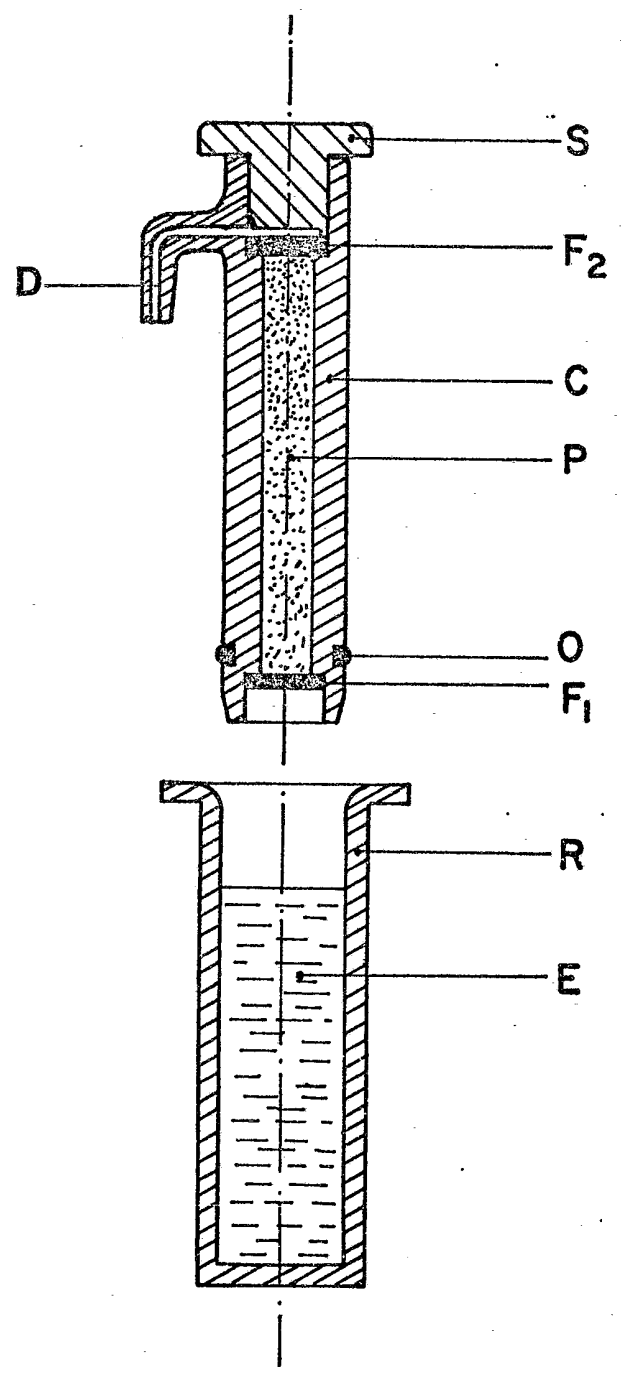


Fig. 2

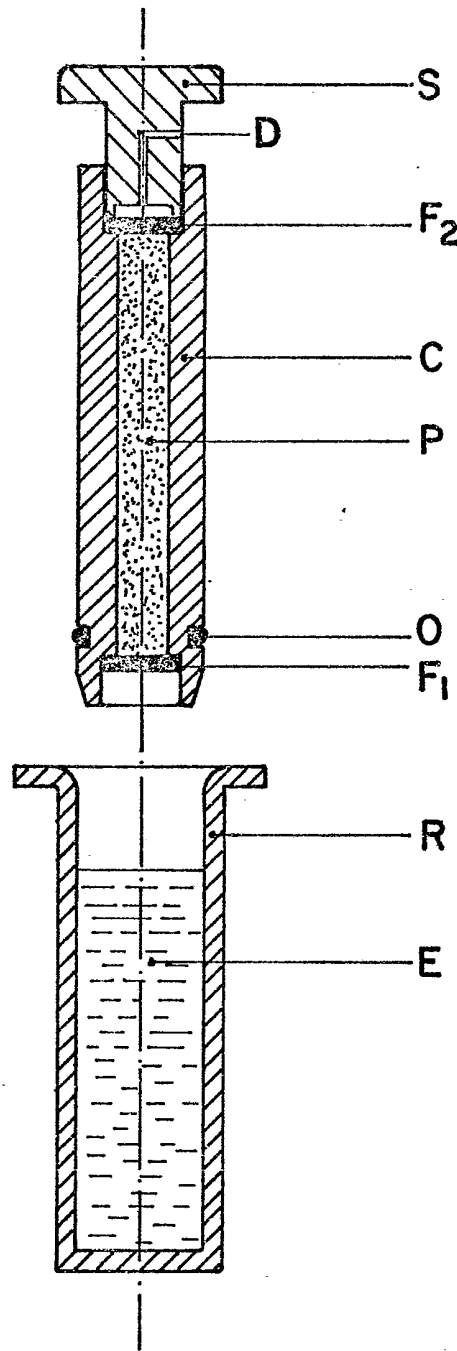


Fig. 3

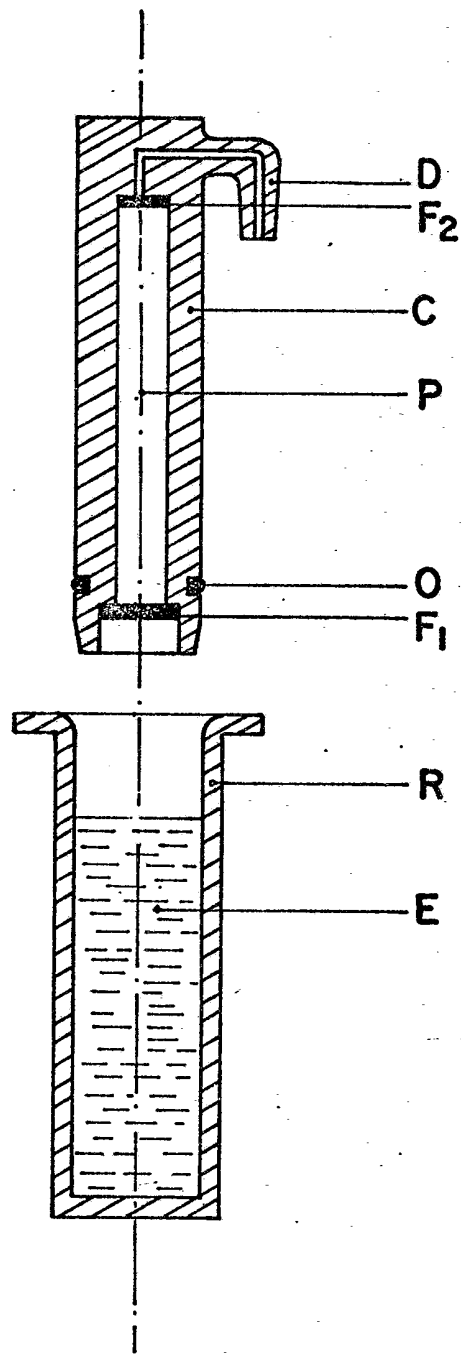


Fig. 4

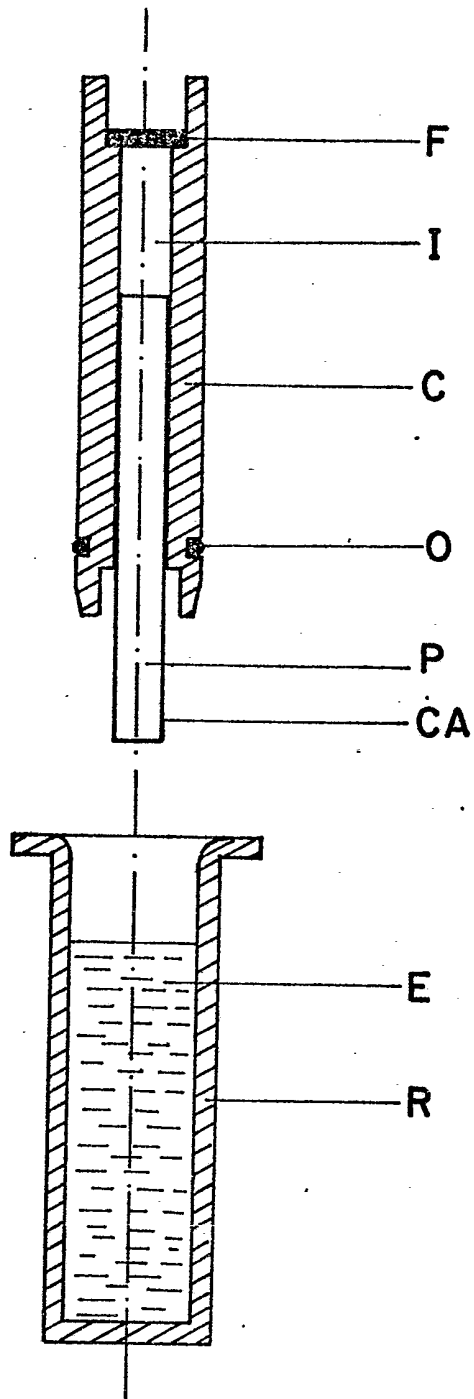


Fig.5

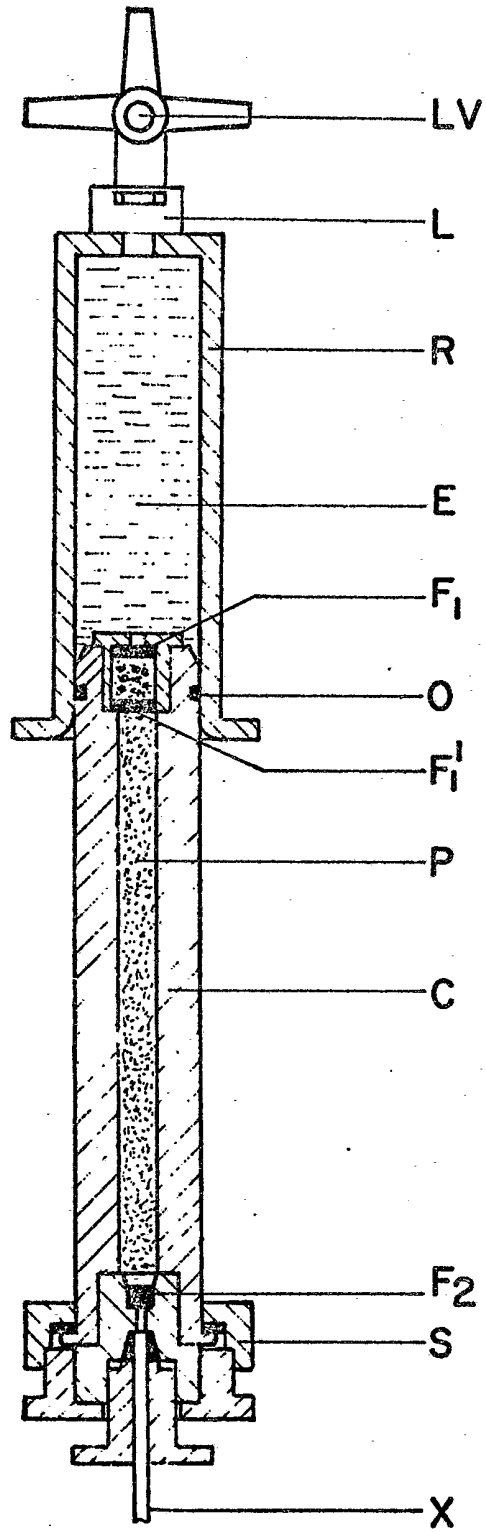


Fig. 6

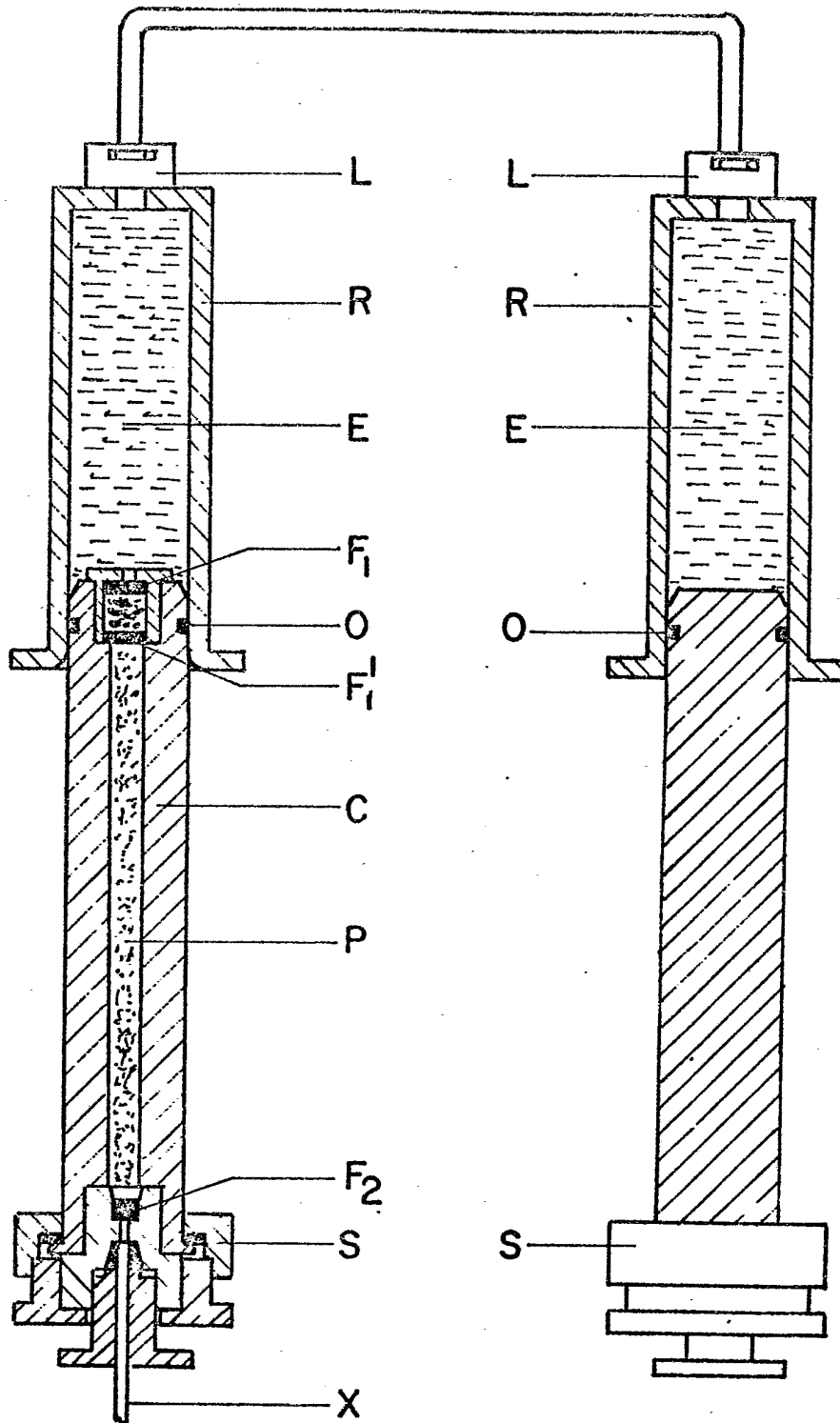


Fig. 7

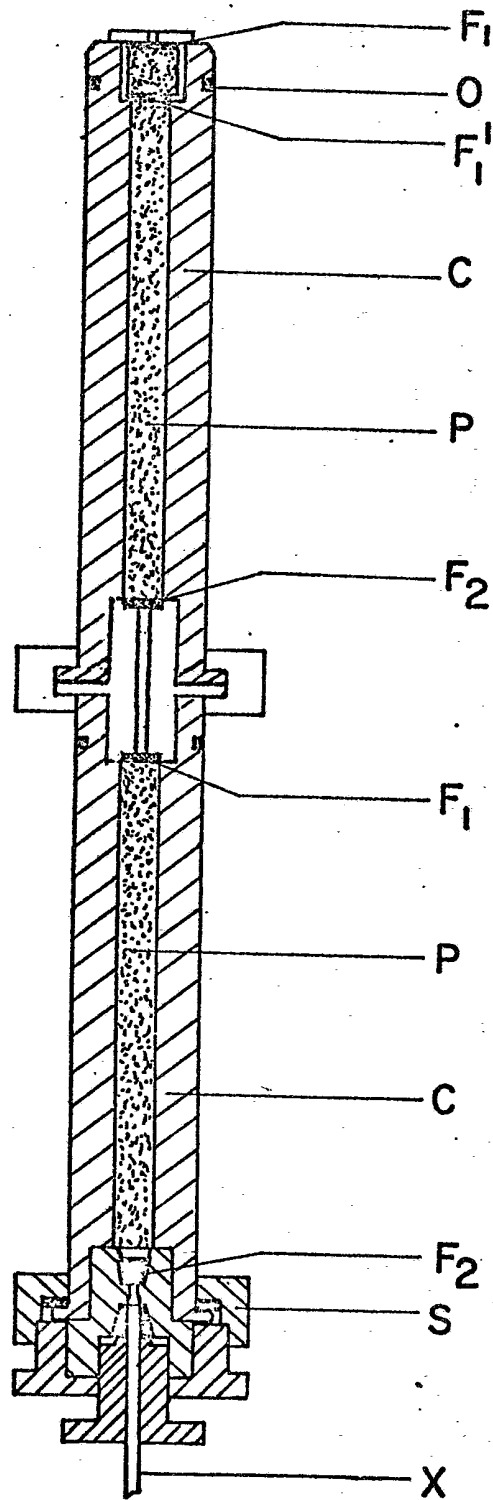


Fig. 8

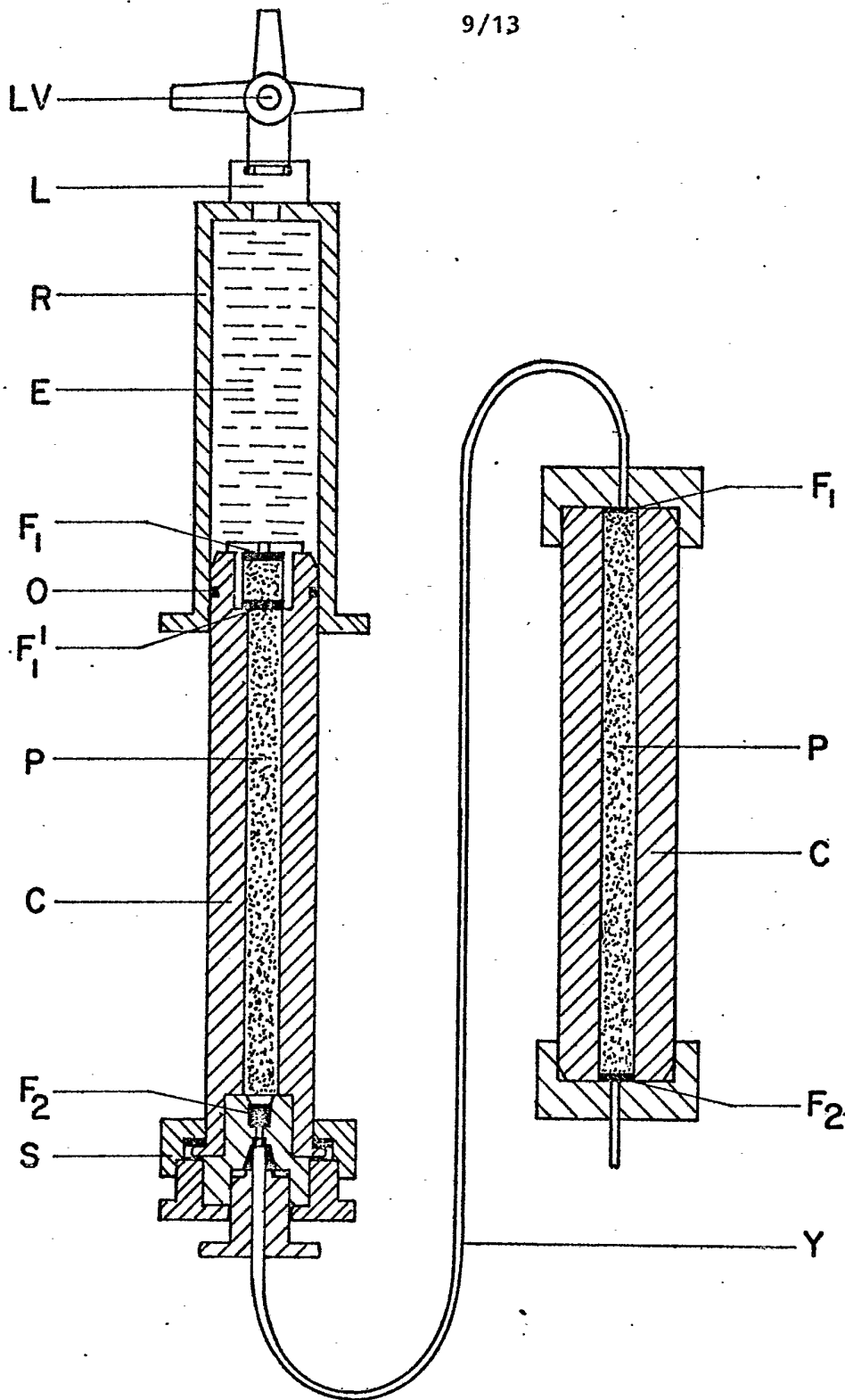


Fig. 9

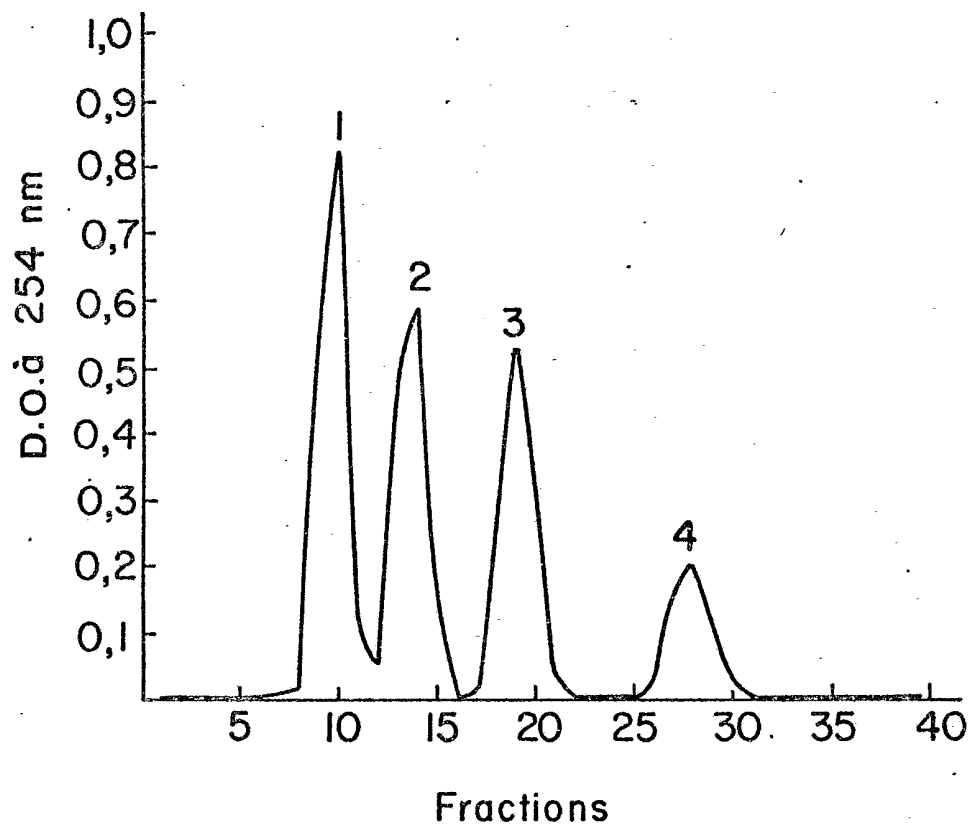


Fig. 10

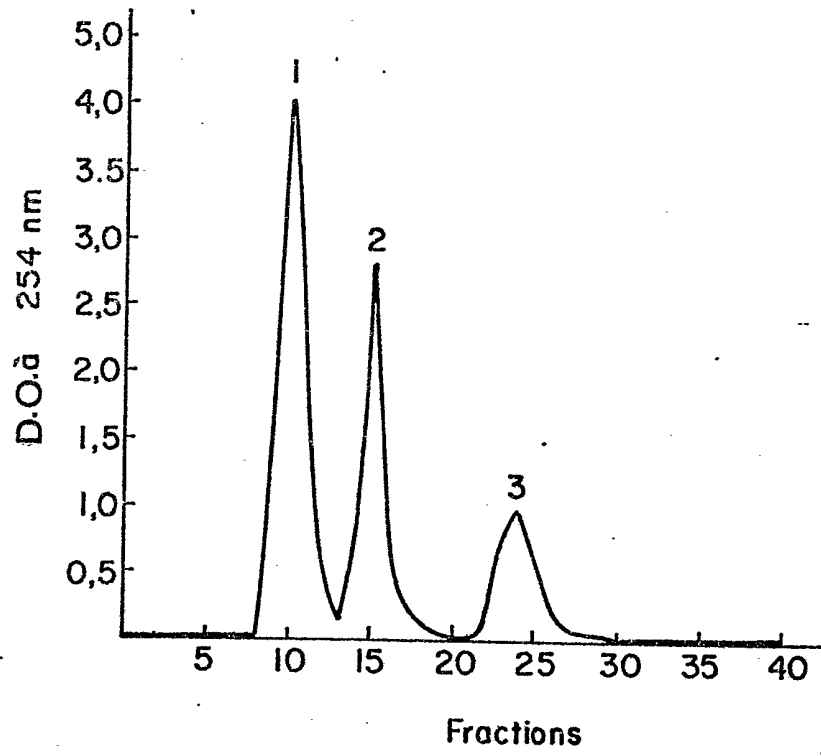


Fig. II

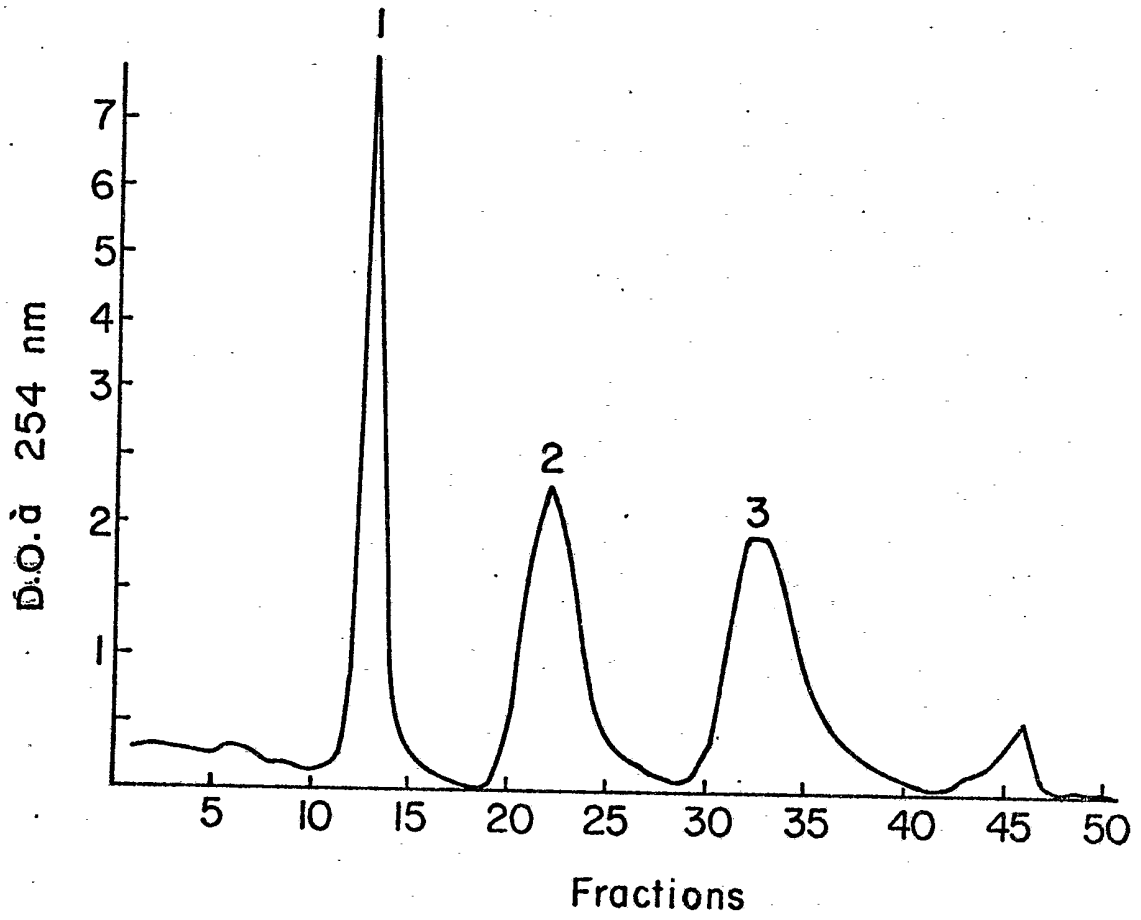


Fig. 12

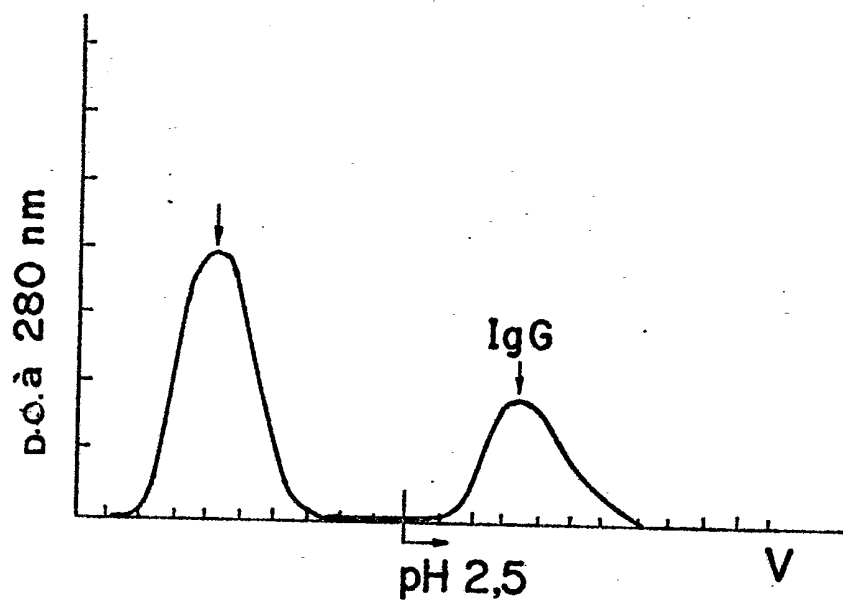


Fig. 13