



UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

TECHNIQUES: Principes de la chromatographie

1

Définition

La chromatographie est une **méthode physique de séparation** basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile).

L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide de différentes interactions. L'échantillon est **adsorbé** puis désorbé sur la **phase stationnaire**, ou est plus ou moins **soluble** dans la **phase mobile**.

Adsorption versus Absorption



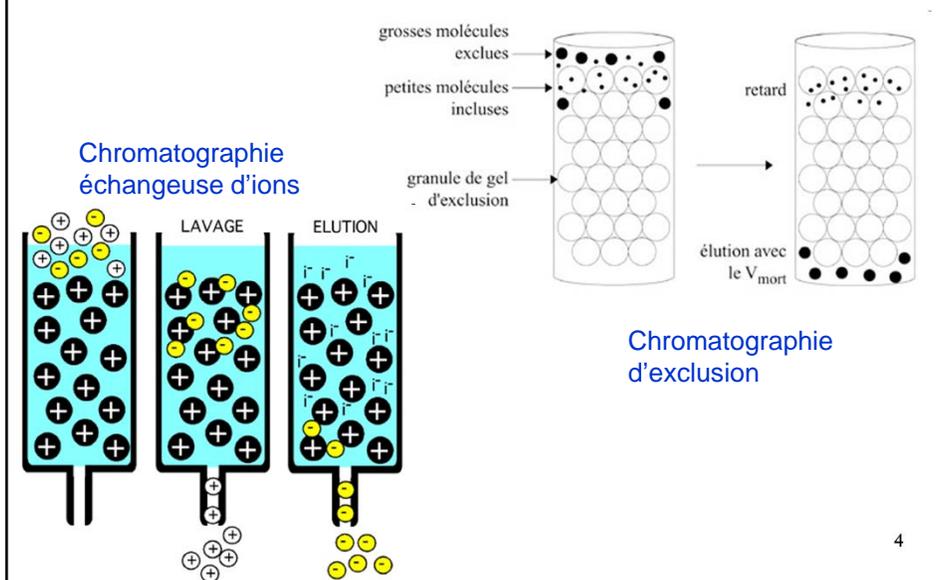
2

Types de chromatographies

| Type | Critère de séparation |
|-------------------|-------------------------|
| Adsorption | Polarité |
| Partage | Solubilité |
| Exclusion | Taille des molécules |
| Échangeuse d'ions | Charge ionique |
| Affinité | Structure des protéines |

Il est rare de pouvoir associer une méthode chromatographique à un seul phénomène.³

Types de chromatographies



4

Chromatographies d'adsorption

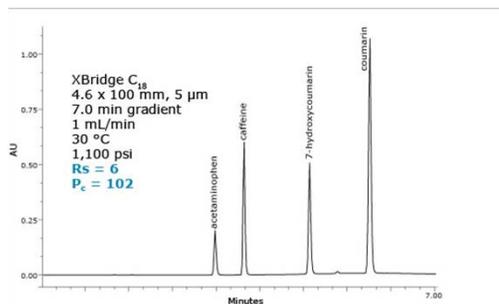
| Phase mobile | Nom |
|--------------|---|
| Gaz | Chromatographie en phase vapeur (CPV) ou en phase gazeuse (GC) |
| Liquide | Chromatographie couche mince (CCM ou TLC) ou éclair |
| Liquide | Chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou HPLC) |

5

Utilité de la chromatographie

Selon la quantité de produit appliqué en chromatographie, on s'en sert pour:

- **Analyser** < 1 mg de produit par CCM, HPLC ou CPV
- **Séparer ou purifier** les produits d'une réaction par chromatographie éclair ou HPLC (50 mg à 15 g)
- **Doser** des produits. L'analyse quantitative se fait avec un étalon interne ou après préparation d'une courbe de calibration.



6

Chromatographie d'adsorption: principe

La chromatographie d'adsorption est basée sur le partage des solutés entre l'**adsorbant solide fixe** et la **phase mobile**. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

Les séparations sont basées sur le principe de **polarité**, c'est-à-dire l'existence de dipôles dans une structure moléculaire.

Adsorbants possibles (du moins polaire au plus polaire):

Papier, cellulose, amidon, carbonate de sodium, **gel de silice**, **alumine**, charbon activé.

7

Adsorbants

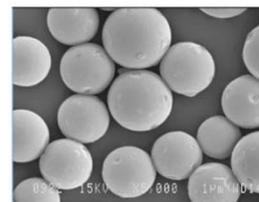
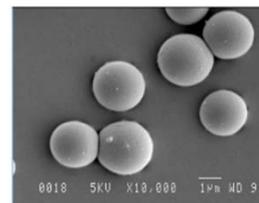
Les adsorbants sont sous forme de granules calibrés. La séparation est meilleure, mais plus lente si les grains sont fins.

Plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires. La séparation se fait par ordre croissant de leurs forces d'interaction avec les composés polaires.

\$530 per drum (25 kg) SiliaFlash
P60, 60 Å, 40-63 µm. (R12030B)



SiliaSphere™
MONODISPERSE SPHERICAL SILICA GELS



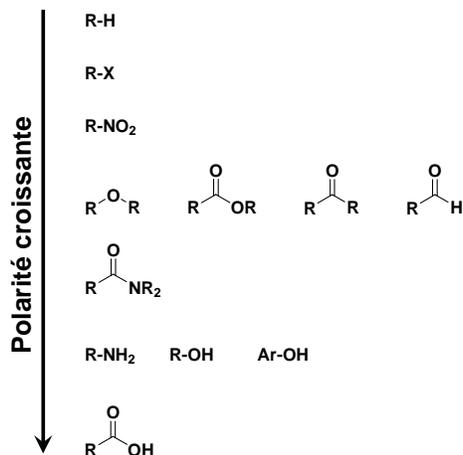
8

Polarité des groupements fonctionnels neutres

Le gel de silice est polaire, il a par conséquent une plus grande affinité pour les composés polaires:

Un composé peu polaire est peu adsorbé.

Un composé polaire est très adsorbé.



Les molécules chargées ne migreront habituellement pas sur gel de silice, elles sont trop polaires.

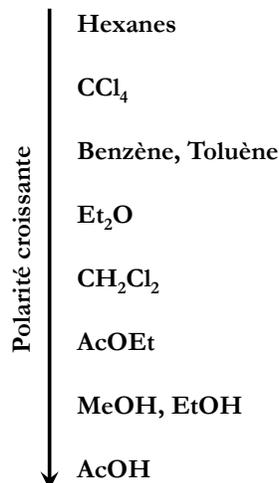
9

Phase mobile

Une phase mobile liquide est appelée **éluant**. C'est elle qui fait migrer les composés, son choix est donc important.

Il faut que le soluté soit **soluble** dans l'éluant.

Il est possible de faire des mélanges de solvants pour changer sa **polarité**.



10

Choix de l'éluant

Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'**éluant** et le **soluté** (mélange de composés à séparer):

- **la solubilité**: on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.

- **la polarité** de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre.

Moins un composé est polaire, moins il s'accroche à l'adsorbant, plus il migre avec l'éluant. \longrightarrow **Choix d'un éluant peu polaire**

Plus un composé est polaire, plus il s'accroche à l'adsorbant, moins il migre avec l'éluant. \longrightarrow **Choix d'un éluant polaire**

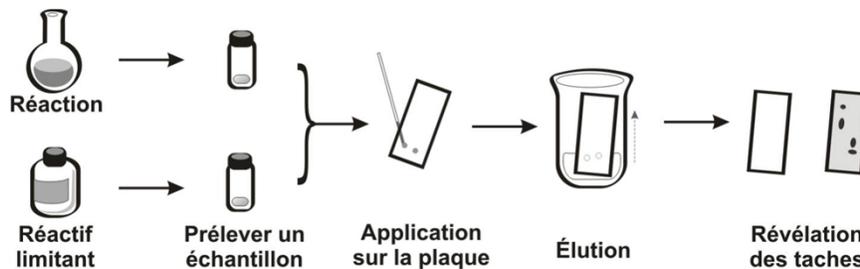
11

Chromatographie sur couche mince

L'adsorbant (silice, 250 μm d'épaisseur) est fixé sur une plaque (Al, verre) commercialement disponible.

Le produit/mélange de produits est déposé sur la plaque à l'aide d'un capillaire.

Les produits sont révélés après élution.

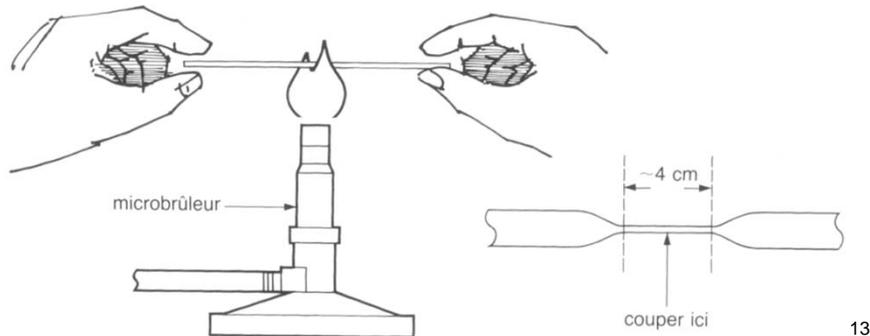


12

Préparation d'un capillaire

Au laboratoire, les capillaires sont préparés au départ de pipettes Pasteur:

- Chauffer la partie centrale de la pipette dans la flamme d'une torche au propane en tournant le tube jusqu'à ce qu'il soit mou.
- Retirer de la flamme et étirer la pipette.
- Laisser refroidir et couper la partie fine du milieu.



13

Utilité des CCM

1. **CCM analytiques** (250 μm , 2.5 x 7.5 cm)

- Vérifier la pureté d'un produit, quelques microgrammes suffisent
- Suivre l'avancement d'une réaction
- Vérifier l'efficacité d'une extraction liquide-liquide
- Déterminer l'éluant pour la chromatographie éclair sur gel de silice

2. **CCM préparatives** (1000 μm , 20 x 20 cm)

- Purification de petites quantités de produit (jusqu'à ~100 mg sur une plaque de 20 x 20 cm). La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant.

14

Préparation de la CCM



1. On trace un trait à ~1 cm du bord inférieur de la plaque.
On marque les futur dépôts, espacés d'environ 0.5 cm.
On identifie chaque produit qu'on fera éluer.



2. Le produit/mélange doit *toujours* être dilué dans un solvant (Et_2O , CH_2Cl_2 , AcOEt ...) **assez volatil**.



Dans un vial, déposer 1 goutte ou 2-3 cristaux de produit + ~0.5 mL solvant.

15

Élution de la CCM



3. On utilise un capillaire pour déposer le produit sur la plaque puis on laisse évaporer le solvant. On peut spotter 2-3 fois si l'échantillon est très dilué.



4. Élution: préparer une **cuve d'élution** avec

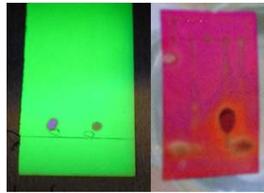
- Bécher de 250 mL avec un papier absorbant à l'intérieur
- Verre de montre

Y verser 10 mL d'éluant (ex. 8 mL Hex + 2 mL AcOEt)
Placer la CCM dans la cuve en veillant à ce que la ligne soit au-dessus du liquide.
Faire éluer jusqu'à ~5 mm du bord et tracer un trait pour marquer le front de solvant.

16

Révélation de la CCM

- **À l'œil nu:** si le produit est coloré
- **À la lampe UV:** les molécules qui absorbent les UV à 254 nm seront visibles (noyaux aromatiques par exemple).
- **Avec un révélateur chimique:** l'iode est le premier révélateur à tester, car il est non destructif. Il permet de révéler des doubles liaisons et les halogénures. L'iode est évaporé à chaud ou dans la hotte. De nombreux autres existent: KMnO_4 , acide phosphomolybdique, vanilline, ninhydrine...



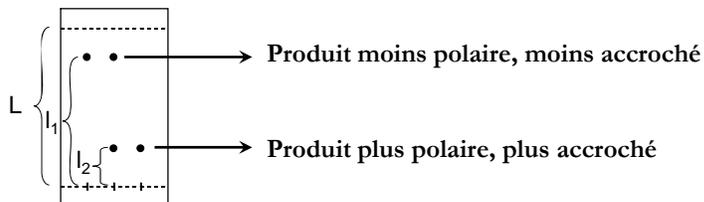
UV

KMnO_4

17

Mesure du R_f

Le R_f (rapport frontal ou rétention frontale) est caractéristique d'un produit dans un éluant donné et pour une phase stationnaire donnée.



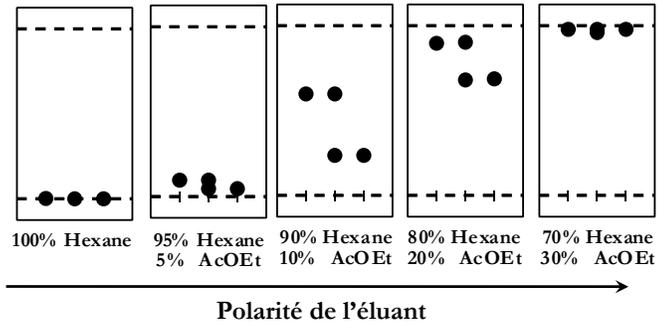
$$R_f = \frac{\text{Hauteur de migration}}{\text{Hauteur du front de solvant}} = \text{valeur entre 0 et 1}$$

18

Influence de l'éluant

Lorsque la polarité du solvant augmente, le R_f augmente. Le ΔR_f augmente, puis diminue.

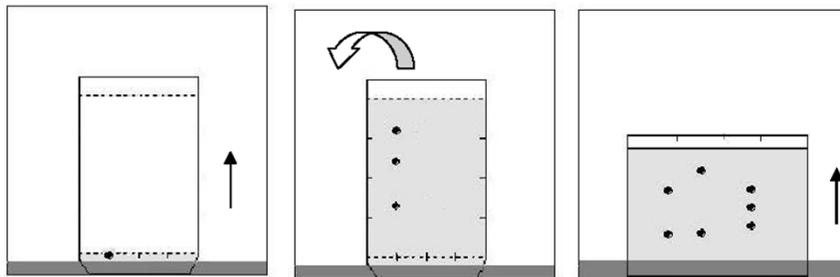
Pour faire une séparation de deux produits par chromatographie, on cherche un éluant qui donne le plus grand ΔR_f possible, avec un R_f pour le produit le moins polaire autour de 0,3.



19

CCM bidirectionnelles

C'est une expérience qui permet de prouver si un produit décompose sur la silice, ou si un "spot" de la CCM contient en fait deux produits.



Si élué dans un autre solvant

20