



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



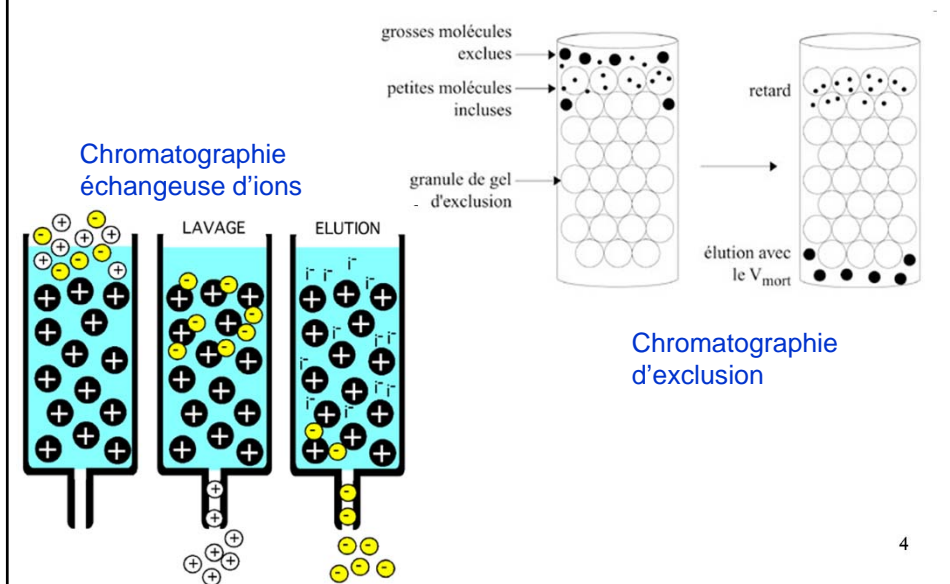
2

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



Chromatographies d'adsorption

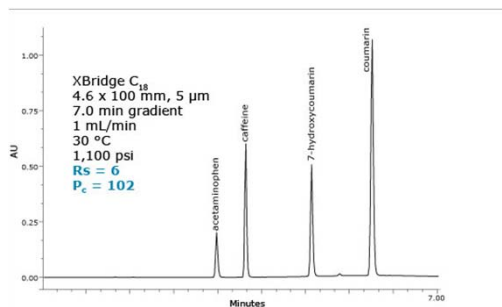
Phase mobile	Nom
Gaz	Chromatographie en phase vapeur (CPV) ou en phase gazeuse (GC)
Liquide	Chromatographie couche mince (CCM ou TLC) ou éclair
Liquide	Chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou HPLC)

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

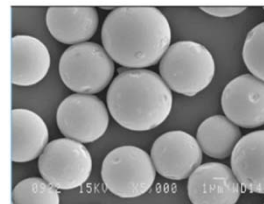
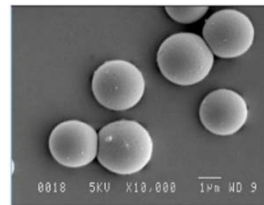
Les adsorbants sont sous forme de granules calibrés. La séparation est meilleure, mais plus lente si les grains sont fins.

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



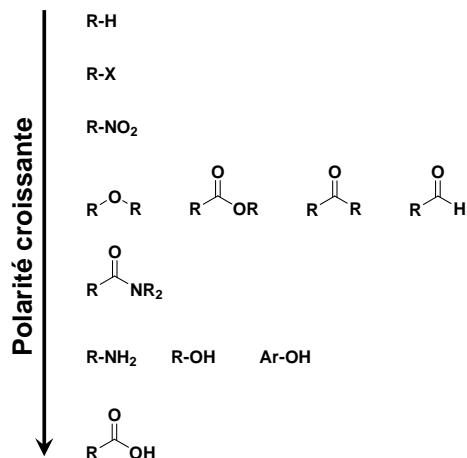
8

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.

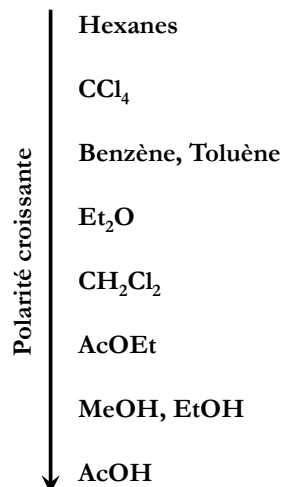
9

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**

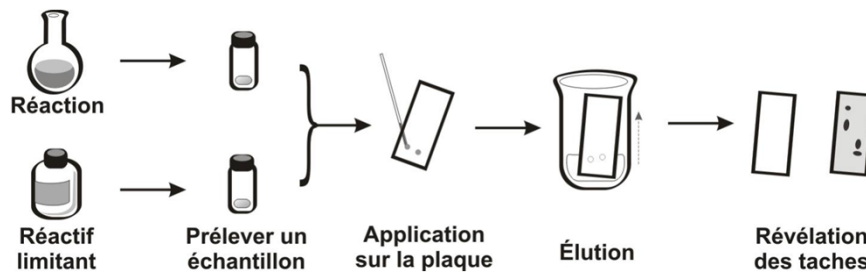
11

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.

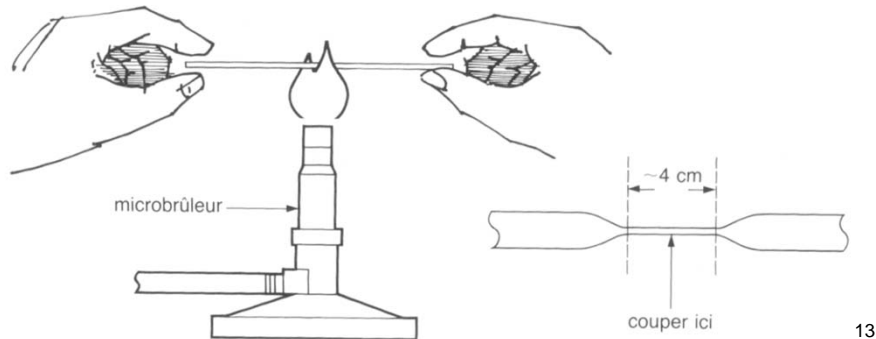


12

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)

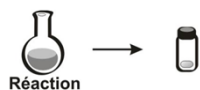
- Purification de petites quantités de produit (jusqu'à ~100 mg sur une plaque de 20 x 20 cm). La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant.

14

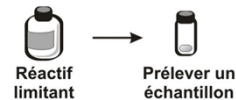
Préparation de la CCM



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

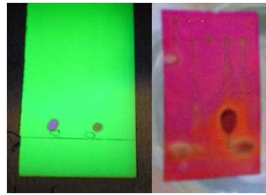
- Bécher de 250 mL avec un papier absorbant à l'intérieur
- Verre de montre

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...



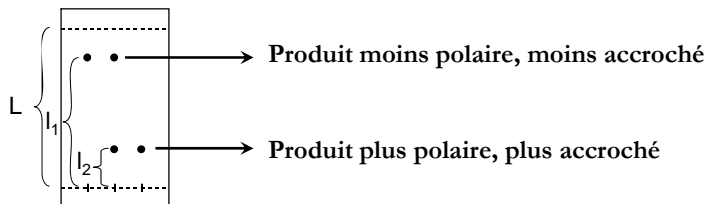
UV

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.



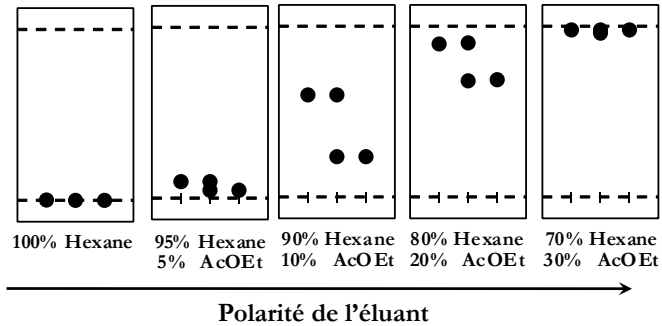
$$R_f = \frac{\text{Hauteur de migration}}{\text{Hauteur du front de solvant}} = \text{valeur entre 0 et 1}$$

18

Influence de l'éluant

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

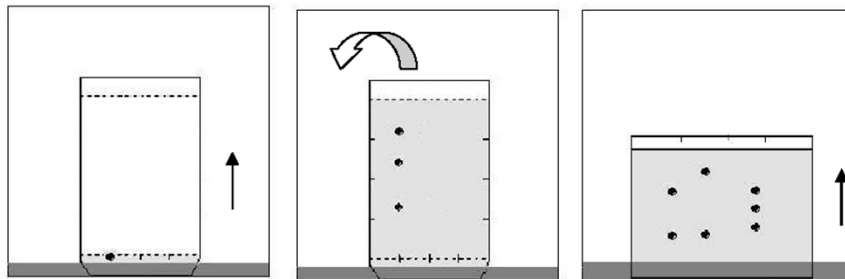
Pour faire une séparation de deux produits par chromatographie, on cherche un éluant qui donne le plus grand ΔR_f possible, avec un R_f pour le produit le moins polaire autour de 0,3.



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.



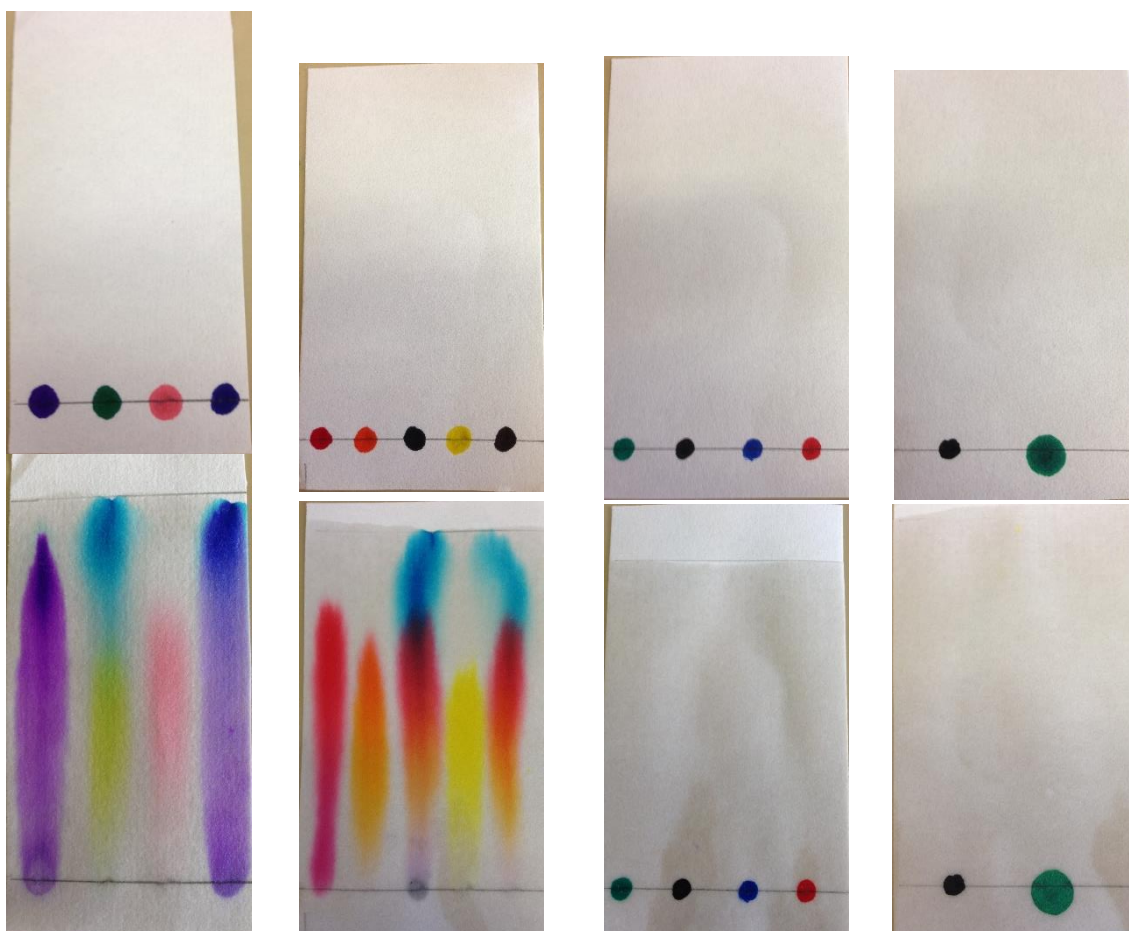
Si élué dans un autre solvant

20

Compétences travaillées	Indicateurs de réussite	Niveau
S'APPROPRIER	Comprendre la problématique de ce TP.	2
REALISER	Déterminer des rapports frontaux.	3
ANALYSER	Observer des chromatogrammes.	3
VALIDER	Trouver le « meilleur éluant » lors d'une chromatographie sur papier.	3
	Identifier les molécules polaires et apolaires.	3
	Faire le lien entre molécules (a)polaires et solvants (a)polaires.	3
	Comparer la chromatographie sur papier et la CCM.	3
ETRE AUTONOME	Travailler sans l'aide de mon professeur.	Non évalué

Chromatographie sur papier

- On observe un étalement des tâches pour les feutres de dessin : certaines tâches migrent plus que d'autres ce qui laisse apparaître pour certains feutres plusieurs couleurs. Par exemple, on remarque que le feutre de couleur violette est composé de rose et de bleu...
En revanche, on observe que les tâches des feutres de tableau ne migrent pas du tout.
- Pourquoi les composés ne migrent pas tous à la même hauteur ? Cela dépend-il du support, de l'éluant, de la nature de l'espèce chimique ?

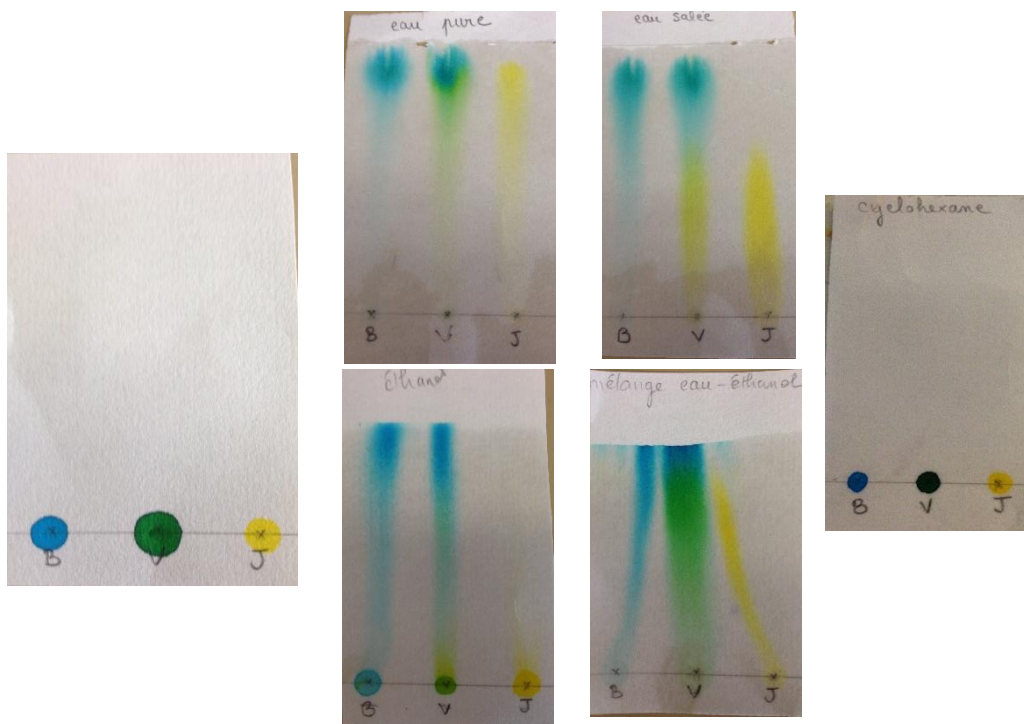


- (E₁) : De l'eau pure : toutes les tâches se sont déplacées, le vert s'est un peu décomposé.
(E₂) : De l'éthanol : le jaune a peu migré ; une grande partie des taches ne s'est pas déplacée.

(E₃) : Un mélange 50/50 eau-éthanol : on observe des traînées pour tous les dépôts.

(E₄) : De l'eau salée : le bleu s'est bien séparé du jaune ; les tâches migrent à des hauteurs différentes.

(E₅) : Du cyclohexane : aucune espèce n'a migré.

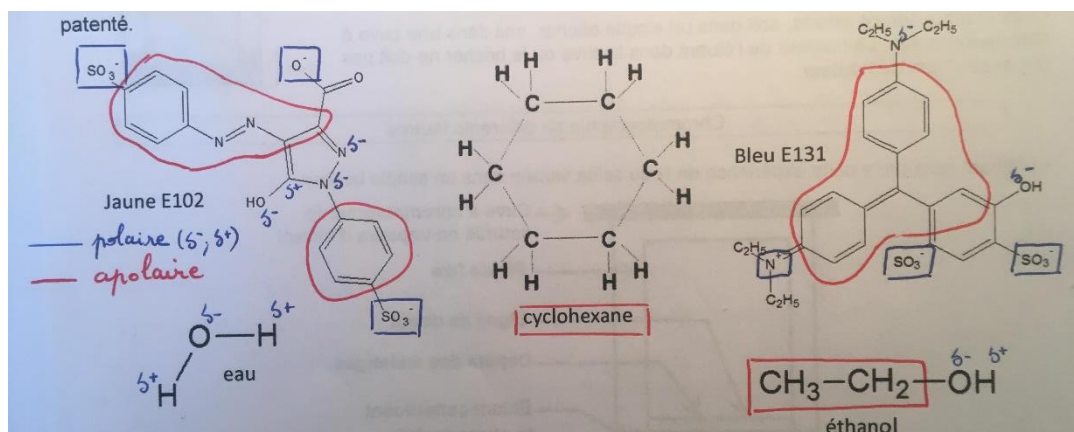


4. On peut dire que le colorant vert est composé de bleu et de jaune.
5. Le colorant vert n'a pas de code : c'est un mélange de jaune E102 et bleu patente E131.
6. $R_f = \frac{h}{H}$ avec h : distance parcourue par l'espèce chimique
H : distance parcourue par l'éluant

Seuls les chromatogrammes avec les éluants eau et eau salée sont exploitables.

	Bleu	jaune
Eau pure	R _f = 0,9	R _f = 0,9
Eau salée	R _f = 0,9	R _f = 0,6

7. On remarque que le rapport frontal n'est pas le même pour le jaune lorsque l'éluant est l'eau pure ou l'eau salée. Donc le coefficient R_f dépend de l'éluant utilisé.
8. **Conclusion** : le meilleur éluant est l'eau salée car le bleu et le jaune migrant avec l'éluant et leur rapport frontal est très différent : l'eau salée a un bon pouvoir séparateur. Le bleu a plus d'affinité avec l'eau salée que le jaune car il est plus soluble dans l'eau salée.
- 9.



On remarque qu'une espèce chimique polaire a plus d'affinité avec un éluant polaire et inversement.
10. On remarque que le jaune est très peu soluble dans l'éthanol, ce qui explique la non migration de ce colorant lorsque l'éthanol et l'éluant.

Conclusion : La migration d'une espèce chimique dépend de sa solubilité et de son affinité (polaire ou apolaire) avec l'éluant.

Chromatographie sur couche mince CCM

11. On observe que le jaune a migré davantage que le bleu, les deux colorants se sont tout de même séparés.

12. La phase fixe a une influence : plus l'espèce chimique a une affinité avec le support, moins elle va parcourir de distance. On en conclut que le bleu a plus d'affinité avec la silice et le jaune a plus d'affinité avec le papier.



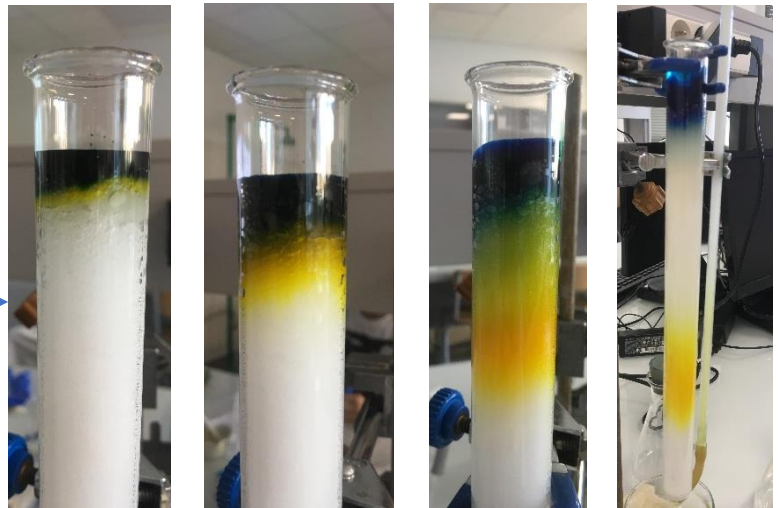
Chromatographie sur colonne

On observe que la séparation entre les deux colorants se fait difficilement.

L'éthanol n'est pas le bon éluant.

On observe que le bleu se sépare très lentement du jaune, le jaune migre en premier.

Les observations avec une plaque CCM nous indiquent que le jaune a plus d'affinité avec la silice que le bleu. On remarque la même chose.



CONCLUSION

13. La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges ; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successives sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase.

L'éluant, autrement appelé phase mobile, solubilise et entraîne le long du support (ou phase fixe) les colorants. Chaque espèce chimique composant ces colorants sera plus ou moins bien solubilisée par la phase mobile et plus ou moins bien retenus par la phase fixe lors de la migration. Cette différence de migration dépend de la nature même des espèces chimiques (assimilées aux couleurs ici).

Il existe donc une compétition entre les 2 effets des phases :

- entraînement de la part de la phase mobile
- rétention de la part de la phase fixe

Cette compétition, selon l'espèce chimique élue, la fera migrer à une hauteur précise et définie

La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants. On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par

capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f) : hauteur de la tache R_f / hauteur du front du solvant.

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_f avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques ; même R_f).