

O. R. S. T. O. M.

TRAVAUX PRATIQUES DE PHYSIOLOGIE VEGETALE

dirigés par Melle D. SCHEIDECKER
assistée de Madame B. HARDY

*

* *

NOTIONS GENERALES ELEMENTAIRES

SUR LES

METHODES CHROMATOGRAPHIQUES.

I - INTRODUCTION

II - HISTORIQUE

III - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PAPIER

A - Principe de la chromatographie de partage

- Notion de Rf
- Rapport entre la constitution chimique et la chromatographie de partage

B - Technique Opératoire

- Choix du papier
- Choix des solvants
- Cuves à chromatographie
- Procédé ascendant
- Procédé descendant
- Chromatographie circulaire
- Révélation

C - Mécanisme général et préparation

- Mécanisme général
- Préparation d'un chromatogramme
- Mesure du Rf

D - Extension de la méthode à l'analyse quantitative

- Elution

- CHROMATOGRAPHIE A PHASES ENVERTIES

- UTILISATION DES RESINES ECHANGEUSES D'IONS EN CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PAPIER.

VI - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES

- Principe de la chromatographie par adsorption
- Nature de la substance adsorbante
- Solvants et agents d'élution
- Procédés permettant d'isoler ou de recueillir les fractions séparées sur les colonnes d'adsorbant.
- Rapport entre la constitution chimique et la chromatographie par adsorption.

Chromatographie de partage sur colonnes

V - APPLICATIONS DE L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

- L'analyse chromatographique en chimie organique
- Applications en chimie minérale

Chromatographie des substances radioactives

Techniques particulières

VI - TECHNIQUES ANNEXES

- Utilisations des échangeurs d'ions
 - a) Principe - Phénomènes mis en jeu
 - b) Résines courantes du commerce
 - c) Exemple d'utilisation d'une résine
- L'Electrophorèse

CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE GAZ LIQUIDE

BIBLIOGRAPHIE

I - INTRODUCTION

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes analytiques permettant, par le jeu d'une phase mobile, liquide ou gazeuse, la séparation par entraînement sélectif, des constituants d'un mélange déposé sur un support poreux ou finement divisé (papier, alumine, etc.). Ce support est ou non imprégné, suivant les techniques, d'une seconde phase liquide (celle-ci étant alors inerte et non plus mobile comme la première). D'une manière générale, cette séparation se manifeste par une migration plus ou moins rapide des constituants du mélange, qui se localisent en des régions différentes du support. Elle fait intervenir des phénomènes physico-chimiques très divers, complexes et souvent mal connus.

Nous examinerons successivement les méthodes actuellement utilisées :

- La chromatographie de partage (sur papier ou sur colonne) qui fait intervenir les différences de solubilité des substances étudiées dans une phase mobile et une phase inerte.

- La chromatographie sur colonne où le mélange à analyser et un entraîneur (qui peut être un gaz) passent à travers une colonne remplie d'une substance adsorbante. Les constituants du mélange se répartissent le long de la colonne en fonction de la qualité de l'adsorbant et de la façon dont ils sont adsorbés. Divers moyens permettent de les séparer.

- La chromatographie par échange d'ions, réservée aux substances hydrosolubles et ionisées.

- La chromatographie en phase gazeuse.

Ces distinctions entre les méthodes, nécessaires à la clarté de l'exposé, sont, dans une certaine mesure, arbitraires. Ainsi, les phénomènes d'adsorption entrent aussi en ligne de compte dans la chromatographie de partage, sur papier ou sur colonne, ou dans la chromatographie sur échangeurs d'ions, etc ...

II - HISTORIQUE

"Il semble que la chromatographie soit née de pratiques empiriques utilisées dans l'industrie de la teinture.

Les teinturiers contrôlaient l'intensité et la qualité d'un bain de teinture en déposant une goutte de liquide sur du papier ou des tissus et observaient les cercles concentriques correspondant aux différents constituants du colorant qui se formaient autour de la goutte" (Z. MOLOSTEV).

F.F. RUNGE a été le premier à étudier ce phénomène (1850-1855).

F. GOPPELSROEDER (1888) a étudié des mélanges de colorants sur des bandes de papier filtre et a introduit la notion connue aujourd'hui sous le nom de Rf.

DAY (1897) a montré que le pétrole brut pouvait être purifié par passage à travers la chaux pulvérisée.

ENGLER et ALBERT (1907) utilisent une colonne spéciale contenant du charbon de bois et recueillent séparément chaque fraction du filtrat.

C'est M. TSWETT, botaniste russe, qui a eu le premier l'idée, en 1903, de filtrer sur une colonne d'adsorbant, un extrait de pigments dans l'éther de pétrole, obtenant ainsi une série de zones diversement colorées.

Cette méthode fut essayée, critiquée puis abandonnée. Les utilisateurs s'étaient servis d'adsorbants qui, au lieu de séparer simplement les pigments, les avaient plus ou moins détruits.

En 1931, KUHN et LEDERER reprenaient ces travaux, séparant deux fractions (carotènes et xanthophylles) par passage sur une colonne d'alumine, à partir du "carotène", que l'on considérait alors comme une substance homogène.

Les premières opérations ont donc été réalisées avec des substances colorées. Mais apparemment, rien ne s'opposait à ce que des substances incolores soient séparées de la même manière.

A partir de ces données nouvelles, REICHSTEIN (1938) puis TISELIUS (1940-1943) ont mis au point de nouvelles méthodes d'analyse.

En 1941, MARTIN et SYNGE ont utilisé les premiers la chromatographie de partage sur gel de silice. Ils ont d'abord séparé des acides aminés acétylés, à l'état d'acétates dissous dans du butanol, sur une colonne de silice additionnée de 55 % de son poids en eau, en présence de méthylorange. Les acétylaminoacides forment des zones roses sur une colonne jaune.

Il y a eu partage entre le Butanol saturé et la phase aqueuse stationnaire.

CONSDEN, GORDON et MARTIN ont introduit, en 1944, la chromatographie de partage sur papier, véritable technique microanalytique.

Au départ, quelques grammes de matériel étaient nécessaires à l'exécution d'une analyse, puis quelques milligrammes avaient suffi. Maintenant on peut opérer sur quelques gammes seulement.

Enfin en 1952, JAMES et MARTIN ont introduit la chromatographie de partage gaz-liquide.

Aujourd'hui de nombreuses catégories de substances sont susceptibles d'être séparées par des moyens chromatographiques.

- éléments minéraux
 - gaz
 - constituants organiques simples
 - protéines
 - virus.
-

III - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PAPIER -

CONSDEN, GORDON et MARTIN ont été les premiers à séparer des quantités infimes d'acides aminés par chromatographie sur papier filtre (1944).

Relativement simples à appliquer, les méthodes chromatographiques connaissent aujourd'hui une très grande faveur et sont très largement utilisées dans les domaines les plus variés, comme nous l'avons vu plus haut. Leurs grands avantages sont de rendre possible, à partir de quantités infimes de substances, des analyses quantitatives très fines et très rapides.

Cette rapidité est intéressante, surtout là où les méthodes précédemment utilisées exigeaient des manipulations extrêmement longues et délicates (protéines par exemple). Ce sont souvent les seules méthodes utilisables.

La finesse de ces nouveaux procédés est telle, qu'elle a permis de reconsidérer le cas de certains corps obtenus à l'état cristallisé, soit disant purs, et qui ne sont en réalité que des mélanges (hétérosides du catalpa par exemple).

Il faut noter cependant, que si ces techniques donnent d'excellents résultats pour la séparation des constituants d'un mélange, elles ne suffisent pas toujours à les identifier avec certitude. Des tests complémentaires sont nécessaires. Il n'est pas inutile d'insister sur ce point qui a souvent été négligé.

Extrêmement précises pour ce qui est de l'analyse qualitative, les méthodes chromatographiques, malgré de nombreux travaux, n'amènent pas encore à des résultats vraiment satisfaisants en matière d'analyse quantitative.

Certains laboratoires disposent d'installations conçues pour des travaux chromatographiques faits en séries, mais beaucoup de techniques chromatographiques se prêtent mal à l'emploi à grande échelle.

A - Principe de la Chromatographie de partage.

La Chromatographie de partage, mise au point par MARTIN et SYNGE en 1941, met en jeu des phases liquides : une phase aqueuse stationnaire et une phase mobile (solvant organique en général).

- Notion de Rf.

Chaque substance séparée par chromatographie de partage est caractérisée, pour un système solvant donné, par son Rf.

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par la substance (d)}}{\text{distance parcourue par le solvant (D)}}$$

On constate que le Rf est indépendant de D et aussi presque totalement indépendant de la concentration de la substance mise en oeuvre. De nombreux facteurs peuvent faire varier le Rf d'une substance dans un même solvant : température, nature du papier, pureté des solvants, etc ...

- Rapports entre la constitution chimique et la chromatographie de partage.

Tout changement de structure faisant varier la solubilité relative dans les deux solvants utilisés fait varier la position du corps dans le chromatogramme.

Il y a un rapport direct entre la constitution chimique des corps et leur coefficient de partage α .

$$\alpha = \frac{\text{concentration dans la solution A (eau)}}{\text{concentration dans la solution B (phase organique)}}$$

quand A et B ne sont pas miscibles.

Dans l'adsorption vraie, ce sont la nature et la position des groupements de la molécule qui interviennent. Par contre, le coefficient de partage d'un corps dépend surtout de la nature de ces groupements.

En conséquence, les isomères pourraient être séparés par adsorption et les séries homologues (acides gras, acides aminés) par chromatographie de partage.

Ce rapport, entre la structure chimique et le coefficient de partage, se traduit par certaines dispositions en séries régulières des taches.

B - Technique Opératoire :

- Choix du papier

La qualité du papier a une très grande importance. Le plus couramment utilisé est le papier Whatman.

On peut aussi recommander le papier Arches, Schleicher et Schüll.

Chacune de ces marques a une numérotation particulière indiquant la qualité de son papier.

Par exemple le papier Whatman N° 1 est normal

N° 2 est lent

N° 4 est rapide

Il est indispensable de conserver ces papiers dans un endroit sec (le papier humide n'a plus les mêmes caractéristiques que le papier parfaitement sec).

Pour la chromatographie de mélanges insolubles dans l'eau, on peut se servir de papier caoutchouté, siliconé, etc.

On peut aussi être amené à "laver" le papier avant de l'utiliser, pour éliminer les impuretés acides ou réductrices qui peuvent être gênantes et occasionner des traînées sur le chromatogramme (SHERWOOD et HANES).

- Choix des solvants :

Ce sont généralement des produits organiques particulièrement miscibles à l'eau. Ils peuvent être parfois entièrement miscibles à l'eau.

Les solvants les plus courants sont :

- Le Phénol
- Le N Butanol
- Le mélange N Butanol - Acide Acétique
- La Pyridine

Ces produits doivent, pour la plupart, être redistillés avant leur utilisation.

Dans certains cas, on peut éviter l'emploi de solvants organiques. On peut utiliser par exemple, des solutions aqueuses d'électrolytes (A. RESPLANDY). Ces solutions ont certains avantages sur les solvants organiques, notamment :

- la reproductibilité des Rf sur un lot de papier homogène.
- les variations de température n'influencent pratiquement pas la valeur de ces Rf.

- Cuves à chromatographie

Les cuves en verre sont les meilleures. Elles doivent être parfaitement étanches. Le couvercle doit être lui aussi en verre ou en matière plastique. (Il faut cependant se rappeler que la plupart des solvants attaquent presque toutes les matières plastiques courantes).

L'étanchéité de la cuve est assurée par un joint de caoutchouc ou une couche de vaseline.

Les cuves doivent être placées dans une pièce à température constante ou à peu près constante ($\pm 1^\circ$), à l'abri du soleil et même de la lumière. Si l'on ne peut disposer d'une pièce dont la température peut être réglée, on peut placer les cuves dans des armoires (genre étuve) où la température peut être contrôlée et réglée.

La dimension des cuves varie suivant la technique utilisée.

- Procédé ascendant

Les feuilles de papier ont en général, 50 à 60 cm de long, et 45 à 50 cm de large. On utilise pour ce procédé, les feuilles sur toute leur longueur, mais en général, sur une partie seulement de la largeur. La feuille enroulée, en cylindre - les deux bords ne se touchant pas - plonge dans le solvant par son extrémité inférieure. Le solvant monte et entraîne les substances placées à 5 cm environ du bord inférieur du papier. Un récipient contenant l'eau saturée de solvant est placé à côté du solvant (fig. 1). La cuve peut être ronde ou rectangulaire et de petite dimension.

- Procédé descendant

Les cuves peuvent être aussi plus ou moins grandes suivant qu'on veut utiliser les feuilles sur toute leur largeur, seulement en bande, ou en vue d'une chromatographie à deux dimensions.

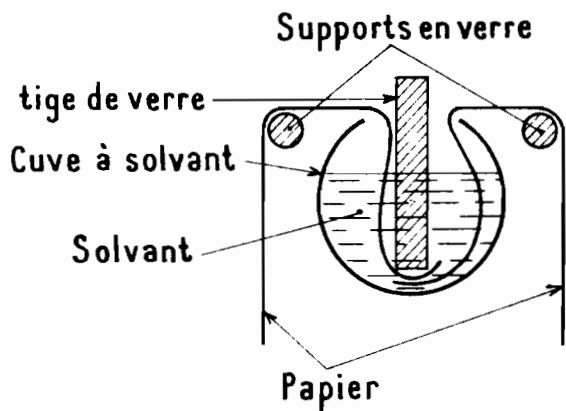
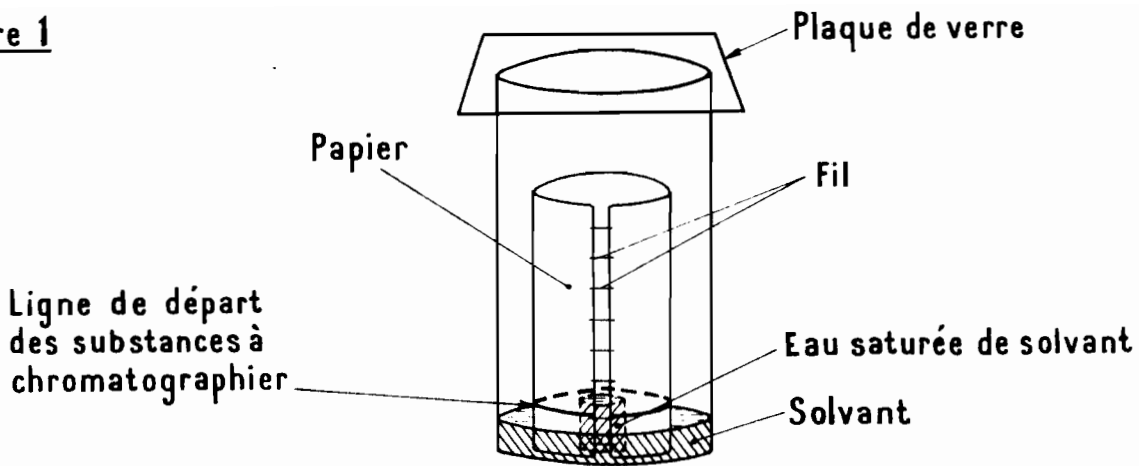
Les grandes cuves rectangulaires ont environ cm de hauteur, et cm de largeur. L'épaisseur varie avec le nombre de chromatogrammes qu'on peut faire simultanément.

A l'intérieur et en haut de ces cuves, on fixe des tubes de verre, ouverts sur un côté, destinés à recevoir le solvant (fig. 2).

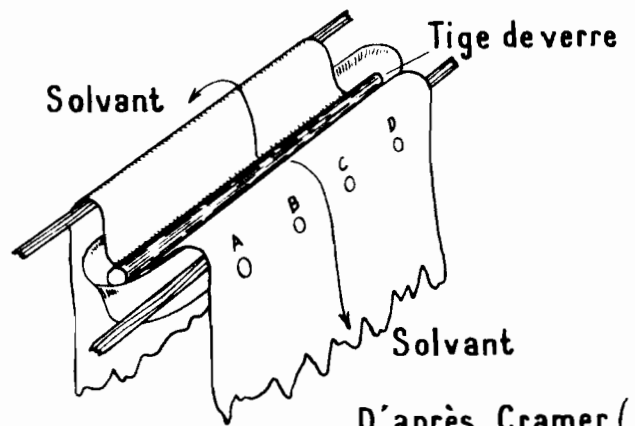
Dans le fond, on dispose des récipients contenant l'eau saturée de solvant. Les cuves pour chromatographie à 2 dimensions doivent obligatoirement être de grand format.

Le papier plonge dans le tube contenant le solvant. Celui-ci descend le long de la feuille, entraînant les substances à séparer.

Figure 1



D'après Boulanger et Biserte (1949)



D'après Cramer (1954)

Figure 2

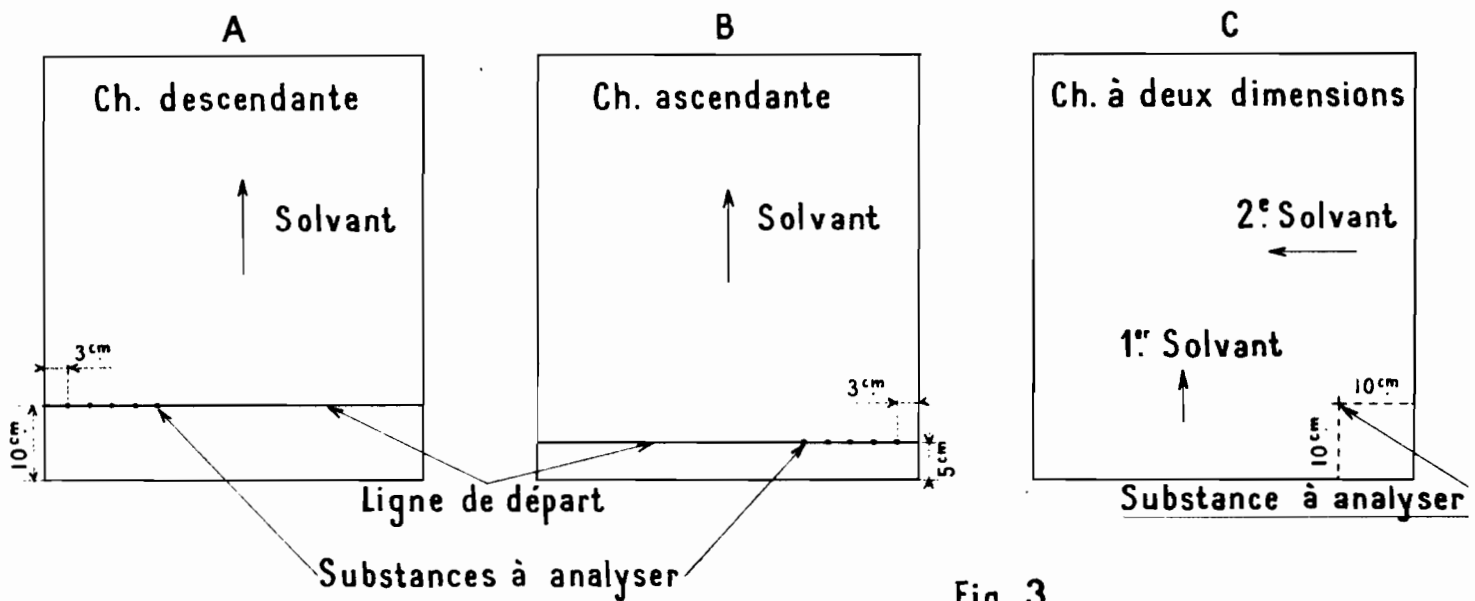


Fig. 3

Si le chromatogramme doit être utilisé pour une séparation dans les deux sens, le papier est sorti de la cuve au moment choisi, séché à l'air ou à l'étuve suivant le cas, et remis dans une cuve contenant un autre solvant.

Il est préférable d'avoir une cuve pour chaque solvant.

Dépôt des gouttes des substances à séparer.

On se sert de micropipettes de 10 mm³, divisées en 2 ou 5 mm³. La tache faite par le liquide déposé doit être régulière. La surface de papier mouillé ne doit pas être très étendue. On met en général 4 ou 5 mm³ de liquide. Si la quantité de substance mise en oeuvre dans une seule goutte n'est pas suffisante, on peut remettre 4 ou 5 mm³ de solution sur la première tache, mais seulement quand celle-ci est sèche, afin d'éviter la diffusion du liquide sur une trop large surface du papier (on utilise couramment pour sécher les gouttes déposées un séchoir à cheveux à main).

La place des gouttes sur la feuille varie avec la forme du chromatogramme (fig. 3).

- A : chromatographie descendante à 1 dimension
- B : " " " " à 2 dimensions
- C : " " ascendante

- Chromatographie circulaire

On peut aussi utiliser des feuilles de papier de forme circulaire.

Certains auteurs pensent qu'on arrive ainsi à obtenir des séparations plus fines dans un temps plus court.

La substance est déposée soit en tache au centre du papier, soit en ligne à 1 ou 2 cm de rayon du centre (fig. 4).

Dans le cas où la tache est faite au centre du papier, on ne peut pas mettre de substances témoins sur la même feuille.

Le solvant arrive au chromatogramme par une bande découpée dans la feuille même - la tache est alors faite sur cette bande, à quelques millimètres du centre -, ou par un fil de coton assez gros, partant du centre du papier et plongeant dans le solvant, ou encore par un capillaire de verre arrivant juste à la surface du chromatogramme. Le matériel utilisé est très simple : un cristalliseur et un couvercle de verre suffisent (fig. 5).

Le solvant sépare les substances en cercles concentriques. Le dépôt de la substance sous forme de trait donne de meilleures séparations que les gouttes.

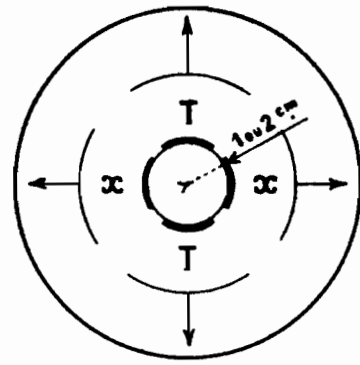
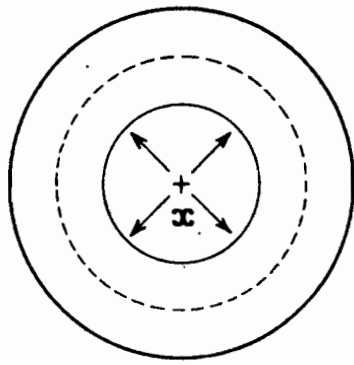


Fig. 4

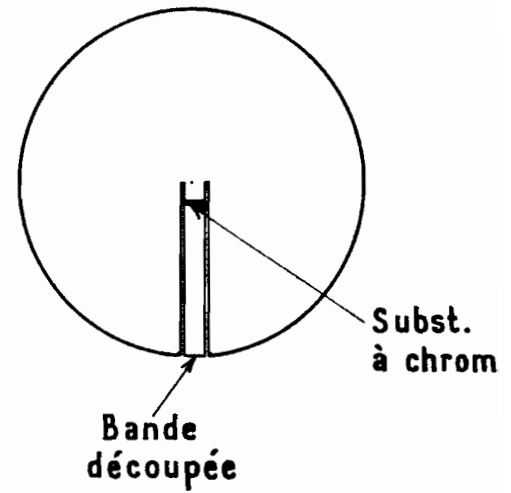
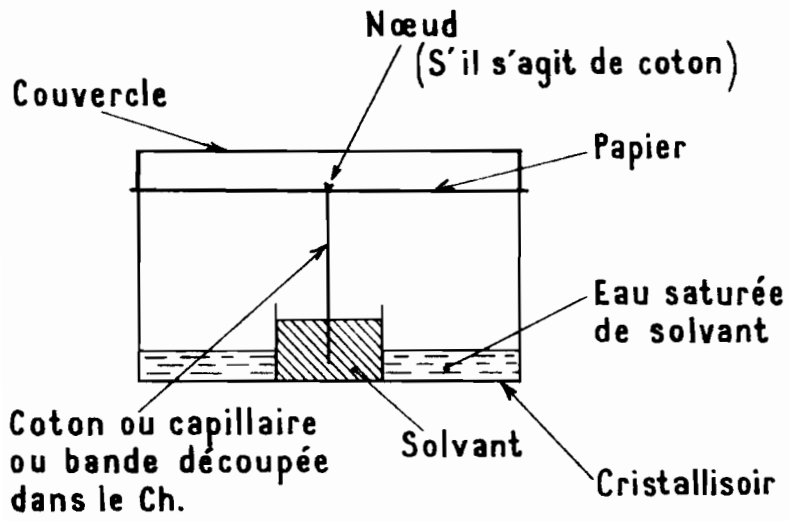
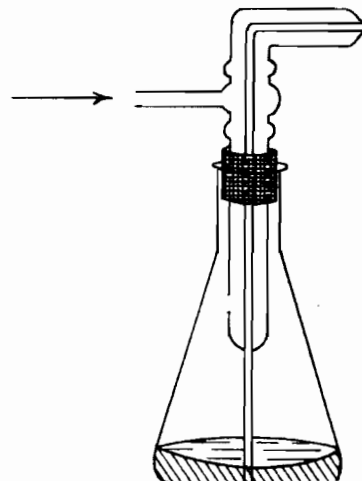


Fig. 5

Fig. 6



- Révélation

Le papier, séché à la sortie de la cuve, est ensuite vaporisé avec un ou plusieurs réactifs donnant des colorations plus ou moins spécifiques avec les substances à étudier. (Ces réactions seront étudiées de façon plus détaillée dans les fascicules consacrés aux "glucides" et aux "différentes formes de l'azote").

La plupart des réactions mises en jeu exigent une température élevée. On met donc les feuilles dans une étuve, à la température convenable, après vaporisation du révélateur. Le temps de chauffage varie avec les substances à révéler.

Le révélateur peut être vaporisé à la bouche, avec une poire, ou mieux, avec un petit compresseur.

(Compresseur d'air à membranes, fonctionnant sans huile, fabriqué pour les appareils générateurs d'Aérosols par les Etablissements Jouan, 113 Bd St-Germain, Paris).

Le vaporisateur peut être un tube capillaire en verre ou métallique, adapté sur un erlenmeyer (fig. 6).

C - Mécanisme général et préparation d'un Chromatogramme.

- Mécanisme général

- La phase organique est saturée d'eau
- De l'eau libre est liée chimiquement à la cellulose
- De l'eau libre est adsorbée.

On peut considérer ces deux dernières phases comme un complexe cellulose-eau ; dans une atmosphère saturée d'eau le papier adsorbe environ 20 % d'eau.

Le papier et le solvant sont placés dans une enceinte parfaitement étanche, saturée des vapeurs de l'eau et du solvant utilisé. Le papier sert de support à la phase aqueuse.

- Préparation d'un chromatogramme

Les gouttes de substances à étudier sont déposées sur une même ligne de départ, à l'extrémité de la feuille de papier convenablement choisie. Cette feuille est alors plongée par ce bord dans le solvant. Le liquide progresse par capillarité, de bas en haut, ou inversement, suivant la méthode utilisée.

Un cristallisateur contenant de l'eau saturée du solvant organique, placé au voisinage de la feuille de papier, assure la saturation en eau.

Le solvant, qui chemine sur le papier, déplace les substances déposées, suivant leur coefficient de partage. Les corps les moins hydrosolubles migrent en tête, les plus hydrosolubles restent en arrière.

Il y a partage continu entre l'eau stationnaire et le solvant organique.

Lorsque le cheminement du solvant est considéré comme suffisant, l'opération est arrêtée.

On utilise le procédé descendant ou ascendant, ou circulaire.

La plupart des substances séparées par chromatographie sur papier étant incolores (sucres, acides aminés, alcaloïdes etc ...), il faut, après séparation, les faire apparaître à l'aide d'un réactif approprié qui donne avec ces substances des couleurs bien déterminées.

- ninhydrine pour les acides aminés.
- phtalate d'aniline pour les glucides
- Réactif de Dragendorff pour les alcaloïdes

Les acides aminés, les hétérosides, peuvent aussi être mis en évidence par leur fluorescence en lumière de Wood.

Les éléments marqués par les traceurs radioactifs peuvent être repérés soit par autoradiographie, soit en déroulant la bande de papier le long d'un compteur intégrateur.

- Mesure du Rf

Après révélation, on peut calculer le Rf pour chaque corps isolé, ce calcul n'étant valable que pour un solvant donné, dans des conditions bien déterminées et toujours respectées (papier, température, etc...) La pureté des solvants est aussi très importante.

Certaines substances ayant le même Rf avec un système de solvant on est parfois obligé de faire une deuxième séparation sur la même feuille de papier, avec un autre solvant et dans l'autre sens de la feuille : chromatographie à deux dimensions.

Les distances parcourues par les substances entraînées sont mesurées de la ligne d'origine au milieu de la tache révélée. Pour mesurer le Rf, il faut toujours arrêter l'écoulement du solvant avant que le front n'atteigne le bas ou le haut de la feuille, afin de connaître aussi la distance parcourue par le solvant.

Le Rf varie avec :

- la teneur en eau du solvant
- la température ambiante
- la qualité du papier
- la présence d'impuretés dans les solvants ou le papier
- la concentration des produits à séparer
- la saturation plus ou moins bonne de l'atmosphère de la cuve en eau.

Il est donc indispensable de toujours travailler en présence de substances témoins placées sur la même feuille de papier que les substances inconnues que l'on cherche à identifier.

Le Rf peut aussi varier légèrement suivant que les gouttes ont été déposées en bordure ou au milieu de la feuille.

PARTRIDGE pense que pour obtenir des chiffres plus constants, il est bon de mesurer, à chaque chromatographie le Rf d'un corps standard x et d'en calculer le coefficient A^t

$$A^t = \frac{\text{Rf du corps } x \text{ à } 20^\circ}{\text{Rf du corps } x \text{ à } t^\circ}$$

Toutes les valeurs de Rf trouvées dans l'expérience à t° sont multipliées par ce coefficient.

D - Extension de la méthode à l'analyse quantitative

Différentes méthodes, plus ou moins au point, sont utilisées afin d'avoir une idée de la concentration des corps identifiés.

- a) Elution des substances après révélation des témoins et dosages des très petites quantités éluées, en général, par colorimétrie
- b) Mesure de la surface d'une tache (la surface est proportionnelle au log. de la concentration de la substance). L'erreur est de ± 10 à 20% .
- c) Photométrie de la tache avec un densitomètre.

- Elution

L'étude - qualitative ou quantitative - plus complète d'une substance isolée par chromatographie exige qu'elle soit séparée du substrat, c'est à dire "éluée".

Différents procédés peuvent être utilisés. Si la substance est assez concentrée, l'éluion d'une tache (obtenue après chromatographie du mélange déposé sous forme d'une ou plusieurs gouttes superposées) suffit. Si, par contre, la concentration est insuffisante, il faut déposer sur le papier une quantité beaucoup plus importante de solution à étudier, en l'étalant en ligne continue. On effectue alors l'éluion sur toute une bande de papier (fig. 7).

A : éluion d'une tache

B : éluion d'une bande

Les substances x (solution de composition inconnue) et T (témoins) sont déposées en quantité connue sur la ligne de départ. Les feuilles sont placées dans les cuves avec un solvant convenable et pendant un temps déterminé. Le papier est séché, les bandes des corps témoins sont découpées et révélées. Le chromatogramme est reconstitué. Le carré de papier ou la bande correspondant à la substance T est découpé et élué.

L'éluion peut se faire à chaud ou à froid.

L'éluion à chaud se fait dans un ballon surmonté d'un réfrigérant. Le papier ne doit pas tremper dans le solvant (fig. 8).

L'éluion à froid peut se faire dans un récipient clos (fig. 9).

La nature de l'éluant à employer dépend des substances à recueillir. L'éluat est concentré sous vide à basse température et repris par un très petit volume d'eau (en général connu).

CHROMATOGRAPHIE A PHASES INVERSEES

Dans le cas des composés très peu solubles ou insolubles dans l'eau (acides gras supérieurs) BOLDINGH a mis au point une technique à "phases inverties".

Le papier qui sert de support est caoutchouté par trempage dans un latex. Le partage se fait entre une phase apolaire-immobile-(benzène) et une phase polaire-mobile-(méthanol).

On s'est aussi servi de papier imprégné de silicones, avec du chloroforme comme phase fixe et de l'éthanol comme phase mobile.

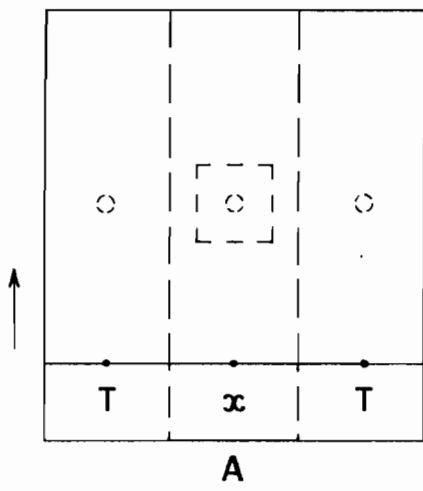
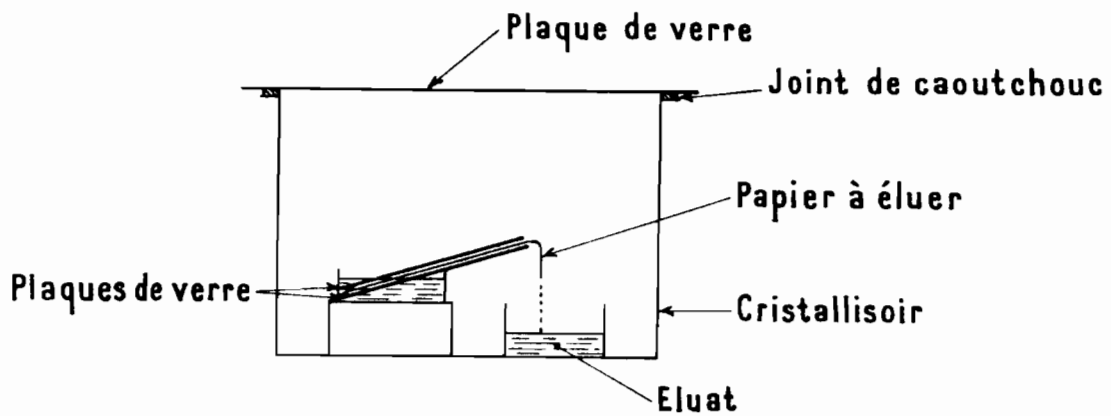
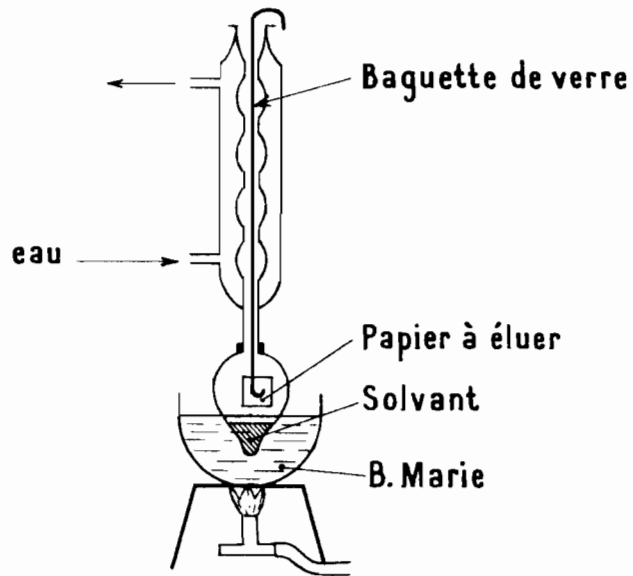
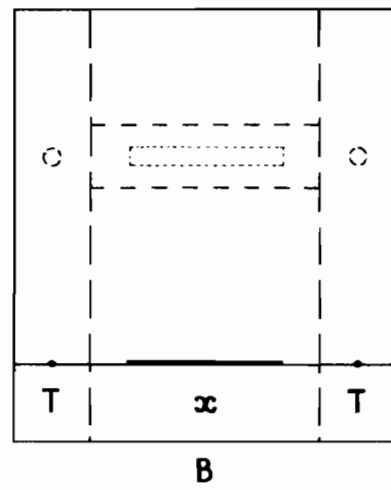


Fig. 7



UTILISATION DES RESINES ECHANGEUSES D'IONS EN CHROMATOGRAPHIE DE
PARTAGE SUR PAPIER

Quand on a à faire à des milieux complexes, comme le sont souvent les extraits végétaux, on s'adresse aux échangeurs d'ions afin d'éliminer les sels gênants pour la suite des opérations et séparer au départ les principaux groupes de constituants chimiques (acides aminés, glucides, etc ...).

On peut donc utiliser successivement différentes résines pour un même échantillon.

Ainsi, pour désalifier un extrait végétal, on peut le faire passer sur de l'Amberlite MB3. L'éluat obtenu peut alors être passé sur Amberlite IR 120. Les acides aminés restent sur la résine, les glucides et acides organiques passent dans la solution. On élue les acides aminés avec une solution ammoniacale. La solution aqueuse précédemment récupérée est passée sur Amberlite IR4B. L'éluat contient les glucides. Les acides organiques sont entraînés avec de l'acide formique.

La combinaison de la chromatographie de partage sur papier, avec celle sur échangeurs d'ions, avec l'électrophorèse (voir fascicule particulier rédigé par A. RESPLANDY) et avec l'électrodialyse a été très fructueuse.

IV - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES -

Cette méthode nécessite un matériel d'analyse plus important que la méthode décrite précédemment.

La chromatographie sur papier est surtout utilisée comme micro-méthode d'analyse qualitative, et la chromatographie sur colonne pour séparer des substances déjà identifiées.

- Principe de la Chromatographie par adsorption :

Un colonne de verre est remplie d'un adsorbant. La substance à étudier et le solvant entraîneur se déplaçant le long de cette colonne. Les différents constituants à séparer se répartissent suivant leur degré d'adsorption.

La chromatographie par adsorption est donc un phénomène qui a lieu à l'inter-face d'une phase solide (adsorbant ou papier) et d'une phase liquide ou gazeuse qui l'entoure.

Restés longtemps obscurs, les phénomènes d'adsorption sont apparus comme l'effet des charges électriques des atomes de l'adsorbant qui déterminent la captation des substances polaires en solution. L'importance de cette fixation est en relation directe avec la concentration.

- Nature de la substance adsorbante :

Les premières méthodes étaient fondées sur l'adsorption par un milieu solide constitué par des colonnes de matières pulvérulentes, comme le carbonate de sodium, l'Alumine, le gel de silice, la Magnésie, le sucre, le charbon, etc

Le plus couramment utilisé de ces adsorbants est l'Alumine Al_2O_3 , qui subit une préparation tout à fait spéciale pour cet usage. On peut l'employer, soit sous forme naturelle, soit sous la forme "alumine-acide" qui se comporte comme un échangeur d'ions (adsorption des acides aminés dicarboxyliques). L'alumine contenant des ions Na^+ peut servir d'échangeur de cations. Elle est utilisée aussi sous forme de bauxite $Al_2O(OH)$ ou de silicate d'Aluminium.

On se sert aussi souvent de Magnésie (MgO), de chaux ($Ca(OH)_2$), ou du mélange des deux, de carbonate de calcium, de gel de silice imbibé d'eau, d'amidon, de talc, de poudre de cellulose.

Il existe aussi des adsorbants dont l'emploi est plus limité :

- Urée pour les acides gras.
- Histone pour les acides desoxyribonucléiques.

- Solvants et agents d'élu-tion.

La pureté des solvants et agents d'élu-tion est très importante en chromatographie. Certaines impuretés peuvent influencer fortement la marche de l'opération.

Il y a compétition continuelle entre le solvant éluant et la substance adsorbée. L'entraîneur déplace cette substance de la place qu'elle occupe sur la surface de l'adsorbant.

JACQUES et MATHIEU ont constaté que le pouvoir d'élu-tion des solvants est proportionnel à leur constante diélectrique ϵ . Mais il semble, après de nombreuses recherches, que le pouvoir éluant des solvants n'a de sens que pour un système donné et dans des conditions très précises.

Le volume de chaque éluant doit être environ le double du poids de l'adsorbant.

La Chromatographie sur colonne peut aussi être, suivant les adsorbants et les solvants, une chromatographie de partage.

Procédés permettant d'isoler ou de recueillir les fractions séparées sur les colonnes d'adsorbant :

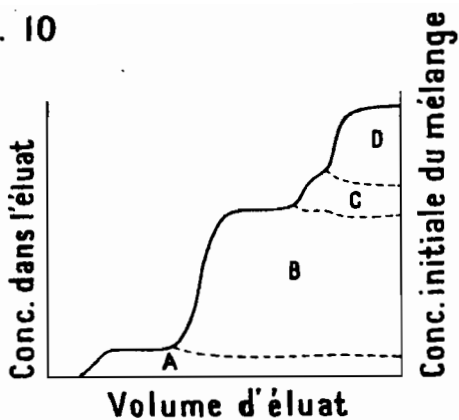
La séparation des substances est indispensable pour une identification sûre des fractions.

Quand on travaille sur des substances bien distinctes par leur coloration comme les pigments, il suffit de découper la colonne suivant le tracé des zones colorées. Cette méthode ne peut pas être appliquée à la séparation des substances incolores.

Certains auteurs font passer successivement sur la colonne une série de solvants ou de mélanges de plus en plus éluants et recueillent séparément les différentes fractions.

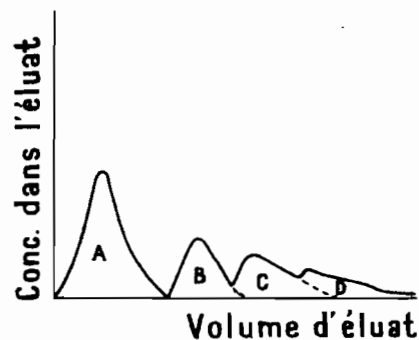
TISELIUS, CLAESSON et leurs collaborateurs, dans le procédé qu'ils ont appelé "analyse frontale", font percoler la solution à étudier à travers la colonne d'une façon continue. Un dispositif optique mesure les changements d'indice de réfraction (fig. 10). Chaque palier de la courbe indique la présence d'une substance dans le mélange. Pour obtenir une séparation de A, B, C, D, il faudrait laver la colonne avec un solvant pur. C'est alors le "développement par élu-tion".

Fig. 10



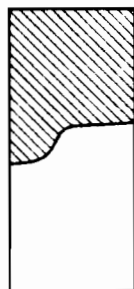
Analyse frontale (Tiselius)

Fig. 11



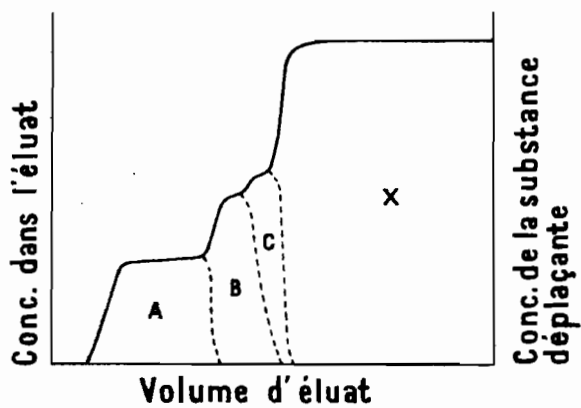
Séparation par élution (Tiselius)

Fig. 13

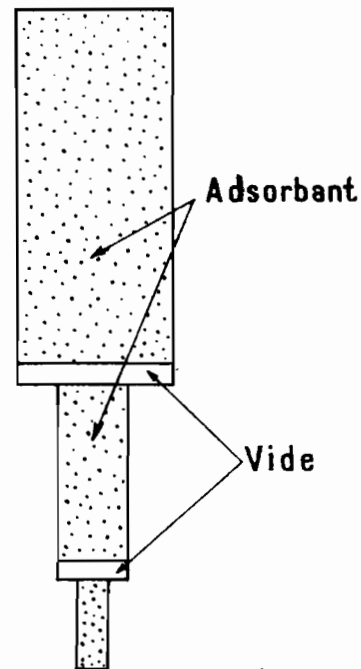


Front irrégulier dans une colonne trop large (Claesson)

Fig. 12



Développement par déplacement d'un mélange A+B+C avec une substance déplaçante X.



Colonne à plusieurs Sections (Claesson)

Fig. 14

En partant d'un mélange de 4 substances : A+B+C+D, on peut obtenir le corps A seul en faisant passer un solvant pur sur la colonne . Il est beaucoup plus difficile de séparer B, C et D. - B ne sort que lorsque l'élution de A est terminée, mais C s'écoule avant que B ne soit entièrement entraîné et ainsi de suite (fig. 11). L'élution quantitative est donc très difficile. Les substances "traînent" de plus en plus sur la colonne.

Par la suite, TISELIUS a montré que l'on pouvait développer un chromatogramme par une substance fortement adsorbée : "développement par développement".

Une substance X très adsorbée déplace devant elle des substances moins adsorbées qu'elle, A, B, C. C déplaçant B, si C est plus adsorbé que B, etc ... (fig. 12). A est donc recueilli en premier, B ensuite, etc ... A, B, C atteignent rapidement une concentration stationnaire, marquée sur la courbe par un palier. La longueur de ce palier est fonction de la quantité des substances éluées, la concentration stationnaire représentée par le niveau de ces paliers permet de les caractériser. Les zones éluées ne peuvent plus "traîner", puisqu'elles sont continuellement déplacées par la suivante.

Ce procédé est cependant difficilement applicable à des quantités de substances supérieures à quelques milligrammes. D'autre part, les colonnes homogènes sont difficiles à réaliser et les zones deviennent très irrégulières (fig. 13). CLAESSON a essayé de corriger ce défaut en se servant d'une succession de colonnes de diamètre de plus en plus petit. Elles ont chacune à leur partie inférieure un compartiment sans adsorbant (fig. 14). Dans cette partie de la colonne, il y a dilution de la substance. Or les substances plus diluées descendent moins rapidement que celles qui sont plus concentrées. Dans la seconde colonne, la zone de substance plus concentrée rejoindra rapidement la substance plus diluée et plus adsorbée. (Il y a régularisation de l'écoulement).

Du point de vue pratique, il existe maintenant de nombreux modèles de "collecteurs de fractions". Ces appareils ont toujours une partie mobile - en général un plateau tournant - amenant à la sortie de la colonne des récipients permettant de recueillir des fractions successives. Le plateau est mis en marche et la vitesse est réglée par un dispositif mécanique simple, de façon à ce que les tubes se succèdent sous la colonne à intervalles de temps égaux. On peut aussi régler l'appareil de manière à recueillir dans chaque tube un volume ou un nombre de gouttes données de liquide.

- Rapport entre la constitution chimique et la chromatographie par adsorption :

Les rapports entre la constitution chimique d'une substance et son comportement au cours de la chromatographie sont très différents, suivant qu'il s'agit d'une adsorption vraie, d'un échange d'ions, ou d'un partage entre deux solvants.

Plus une substance a de double liaisons et de groupements -OH, plus elle est adsorbée.

On peut établir un ordre approximatif des substances de moins en moins adsorbées.

acides-bases
alcools-thiols
aldéhydes-cétones
substances halogénées-esters
hydrocarbures insaturés
hydrocarbures saturés

KOFLER a constaté que les groupements méthyle au voisinage de de l'hydroxyle de la vitamine B diminuent le degré de rétention.

Pour certaines substances fortement polaires, (acides gras), la présence d'une ou de plusieurs doubles liaisons n'augmente pas obligatoirement cette force de rétention.

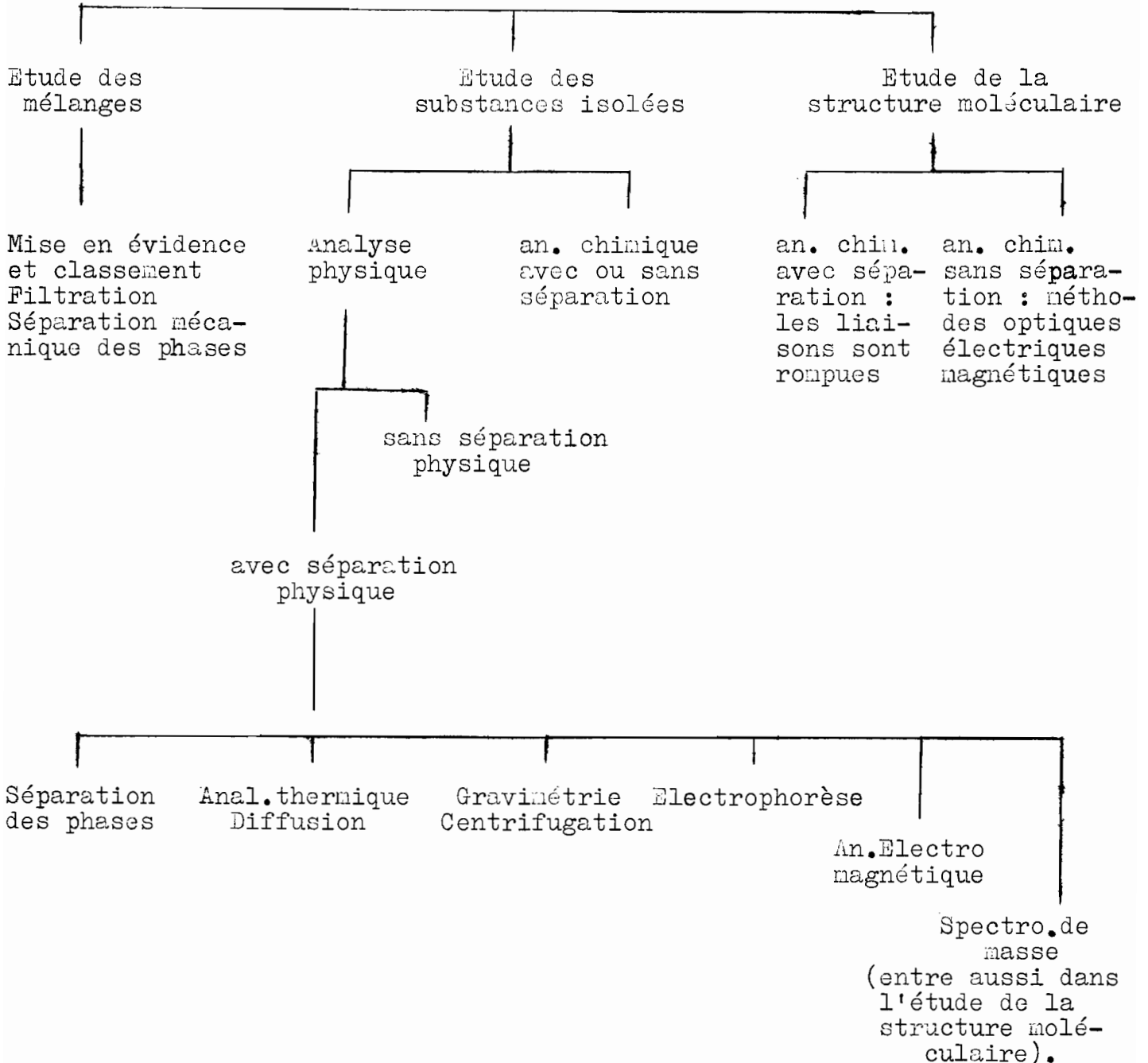
Chromatographie de partage sur colonnes

Les supports convenables pour chromatographie de partage sur colonne sont très difficile à préparer, notamment le gel de silice. On se sert surtout maintenant d'acide silicique, de KIBSELGUHR et de poudre de cellulose.

L'emploi de colonnes remplies d'un support tamponné, permet la séparation de substances ionisables, ayant des coefficients de partage similaires, mais des pK différents, à un pH approprié, grâce à leurs différentes forces d'ionisation.

V - APPLICATIONS DE L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE :

Pour apprécier l'utilité de l'analyse chromatographique, il est bon de la situer dans le champ analytique général.



- L'analyse chromatographique en chimie organique

La chromatographie permet :

- l'extraction d'une substance déterminée à partir d'un mélange naturel (souvent très complexe) où elle se trouve en très petite quantité),
- l'élimination d'impuretés après une séparation grossière,
- la mise en évidence de substances inconnues dans de nombreux milieux, etc ...

Il y a une relation apparente entre la structure moléculaire d'un corps et son comportement chromatographique. Il est donc possible d'utiliser cette méthode pour classer des substances suivant les fonctions mises en évidence.

Ainsi, on a pu obtenir des séparations comme celles des composés acycliques et aromatiques, différentes catégories d'isomères, isolement d'homologues, isolement et caractérisation des corps purs d'un mélange de composés de la même famille.

POLSON a montré que les monoaminoacides aliphatiques se situent sur une courbe, les bases hexoniques sur une autre, et que les acides aminés dicarboxyliques se rangent eux aussi avec régularité (fig. 15).

L'utilisation de la chromatographie en Chimie végétale a permis des progrès rapides dans l'étude des glucides, acides aminés, alcaloïdes, acides organiques, lipides.

MOORE et STEIN, par exemple, ont pu isoler et doser jusqu'à 18 constituants habituels des protides d'un mélange.

Le fractionnement chromatographique peut être utilisé à l'échelle industrielle : extraction de colorants des feuilles de Luzerne (SHEARSON et GEE).

- Applications en Chimie minérale :

Il s'agit ici d'un problème de séparation d'ions. Ce qui est le plus souvent secondaire en chimie organique.

On peut cependant revenir au cas de la chimie organique en complétant les ions (dissimulation du caractère ionique).

La chromatographie par adsorption peut alors être appliquée à ces corps, sans modifications notables.

La chromatographie de partage sur papier peut s'adapter à l'analyse du mélange d'ions minéraux.

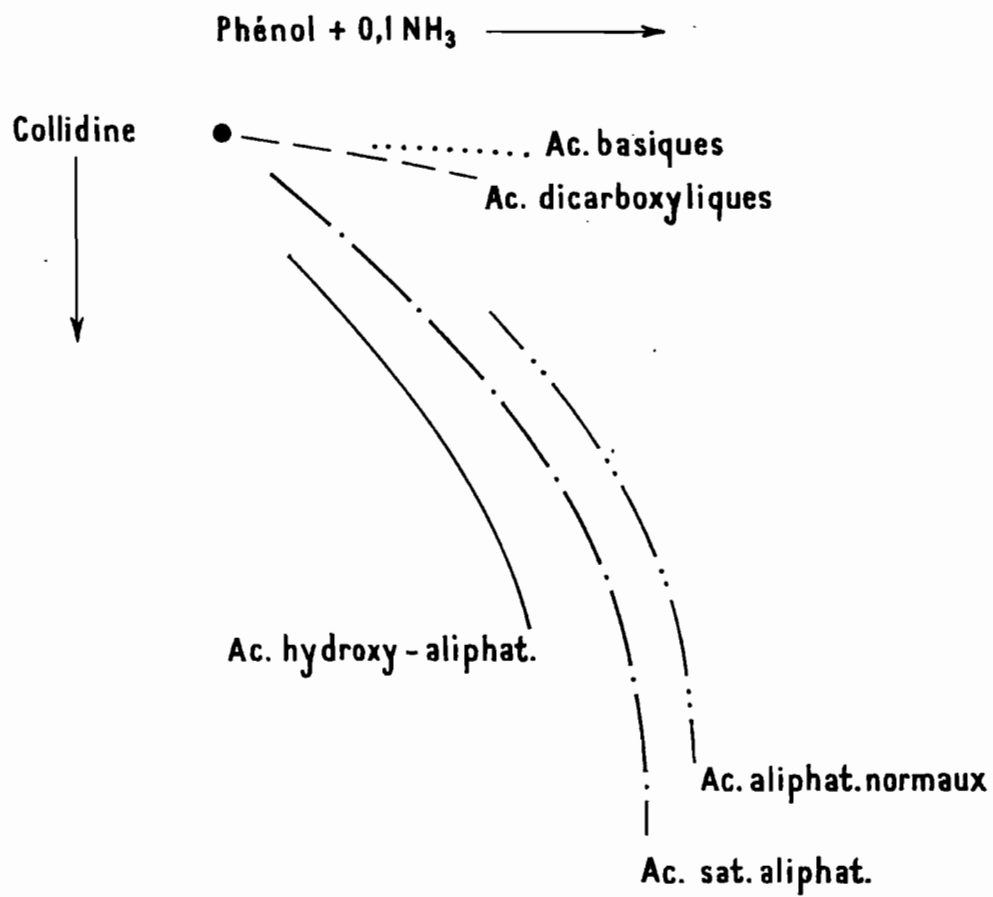


Fig. 15

D'après Polson

Il est plus difficile de trouver une bonne technique de chromatographie de partage sur colonne, si on considère la faible solubilité des ions dans la plupart des solvants organiques.

La chromatographie en phase gazeuse semble difficile à mettre au point, les composés ioniques étant très peu volatils.

Chromatographie des substances radioactives

L'application de la chromatographie à l'étude des substances radioactives pose certains problèmes d'ordre pratique.

On utilise cette méthode pour séparer et isoler les isotopes radioactifs. Une grosse difficulté surgit, si on est en présence de radioéléments à vie courte.

Techniques particulières

Certains laboratoires ont essayé de mettre au point des méthodes originales.

- J. DIXMIER, DUPUIS et N. NORTZ ont enregistré cinématographiquement le développement de chromatogrammes sur papier d'anthocyanes d'organes végétaux, fruits, jus de fruits et vins. Ils ont ainsi mis en relief certaines des difficultés qui rendent le problème très complexe. Ils ont pu s'assurer que le mouvement du solvant n'était pas régulier. Ils ont remarqué aussi que le solvant contournait la tache et entraînait les bords même avant de la pénétrer.

- R.N. GREENSHIELDS, au lieu d'opérer une extraction par l'alcool, travaille directement sur le végétal frais.

Chaque section de la plante est placée sur un endroit déterminé de la ligne de départ du papier. Le jus est extrait par pression à la main entre deux plaques de verre (l'une placée sur la plante, l'autre sous le papier). La tache est rapidement séchée à l'air chaud.

VI - TECHNIQUES ANNEXES -

- Utilisation des échangeurs d'ions.

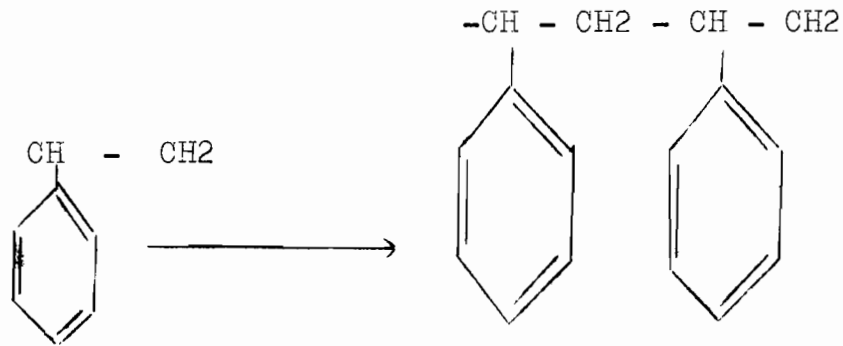
a) Principe - Phénomènes mis en jeu

Les méthodes mettant en jeu les phénomènes d'échange d'ions conviennent à la séparation de substances hydrosolubles et ionisées.

L'utilisation des échangeurs d'ions est cependant limitée. Ils ne sont stables que dans des limites étroites de pH. Ils sont dissous en solutions acides et peptisés en solutions alcalines. De plus, il est extrêmement difficile, voire impossible, d'obtenir une élution quantitative.

Les propriétés des résines sont dues aux groupements actifs qu'elles contiennent et aussi au degré de "liaisons croisées".

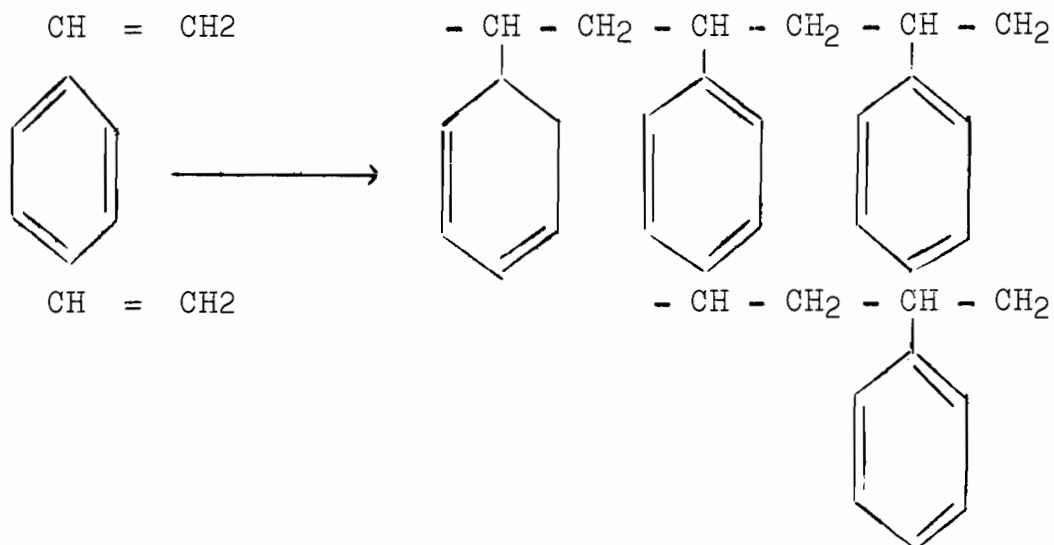
La polymérisation conduit à de longues chaînes non ramifiées (styrène).



Ces chaînes n'ont pas beaucoup de résistance mécanique et gonflent en solution aqueuse.

On effectue la polymérisation de ce corps en présence de divinyl benzène.

Chaque molécule introduit une liaison croisée entre deux chaînes de polystyrène.



On introduit ensuite des groupements actifs

- par sulfonation
- par introduction d'échangeurs d'anions

La fixation des substances organiques dépend en principe de leur constante de dissociation. Il s'ajoute aussi des effets d'adsorption.

La fixation est fonction :

- du degré d'ionisation
- des charges électriques
- des forces d'adsorption.

Les acides forts sont plus fortement adsorbés que les faibles.

Les acides forts déplacent les faibles. Il en est de même pour les bases.

Les substances à poids moléculaires élevés demandent des résines ayant moins de 4 % de réseaux croisés au lieu de 8 % pour les corps moins lourds.

L'élévation de température accroît la séparation des substances.

Les polymères ne sont pas adsorbés.

Les échanges ioniques s'effectuent grâce à la fixation ultérieure dans la molécule de résine constituée de radicaux acides ou basiques.

Si la solution expérimentale contient plusieurs ions, l'échangeur manifeste une action préférentielle pour l'un d'eux. Cette propriété est propre à un échangeur déterminé. On la désigne sous le nom de "sélectivité".

Les échangeurs de cations sont fortement acides quand les groupements actifs sont des groupements sulfonyles, faiblement acides quand les groupements actifs sont des carboxyles. Les échangeurs d'anions sont fortement basiques s'ils portent des groupements aminés quaternaires et faiblement basiques si les groupements sont tertiaires, secondaires ou primaires.

La séparation de certaines substances moins ionisées sur des résines synthétiques (glycocolle, alanine, acide α amino-butyrrique) n'est pas due à des différences de charges électriques (presqu'inexistantes), mais plutôt à l'affinité plus grande de la résine pour des longues chaînes aliphatiques donnant des effets d'adsorption (MOORE et STEIN).

On en revient alors à une chromatographie par adsorption.

Des réactions secondaires se produisent sur des échangeurs d'ions. Les résines acides ou basiques très fortes provoquent souvent des dégradations de sucres, l'hydrolyse partielle de l'ATP en ADP.

On utilise le plus souvent des résines synthétiques provenant de la condensation de polyphénols ou de formol avec une substance du type polystyrène.

b) Résines courantes du commerce.

Les bases sont retenues par les échangeurs de cations, les acides par les échangeurs d'anions.

1) Echangeurs de cations :

acide fort - SO_3H : Dowex 50
Permutite 50
acide faible - COOH Amberlite IRC 50

2) Echangeurs d'anions :

basique fort $\text{R}_4 - \text{N} - \text{CH}$: Dowex 1
Dowex 2
Amberlite IR4B

basique faible $\text{R}_3 - \text{N}$
 $\text{R}_2 - \text{N}$
 $\text{R} - \text{NH}_2$ Amberlite IR4B

3) Echangeurs doubles

anion + Cation Amberlite MB3
Utilisé pour la désalification

Dowex 50 : constitué par une chaîne d'hydrocarbures aromatiques à structure tridimensionnelle et comprenant comme seul groupement cationique actif des acides sulfoniques nucléaires.

Amberlite IRC 50 : son activité provient des groupements acides dicarboxyliques. Adaptés surtout à l'isolement et à la séparation des bases organiques.

Amberlite IRA 400 : se comporte comme un caustique solide dont seuls les ions hydroxydes seraient solubles.

L'emploi combiné d'échangeurs d'anions et de cations permet d'obtenir des solutions exemptes d'ions minéraux.

c) Exemple d'utilisation d'une résine.

Une résine de type sulfonique et sous la forme H^+ échange les ions H^+ pour des cations contenus dans une solution qui passe à travers une colonne de cette résine. Un lavage de la colonne à l'eau entraîne l'acide libre formé.

Par passage sur une résine fortement basique, une solution alcaline contenant un sel alcalin donne un hydroxyde correspondant.

L'Electrophorèse

Voir fascicule spécial de A. RESPLANDY (2ème thèse Fac. des Sciences de Paris, 1958).

C'est une technique qui, jointe à l'utilisation de la chromatographie de partage sur papier, peut être d'une grande utilité et d'une grande précision.

Chaque laboratoire apporte des modifications, des simplifications à l'application des techniques chromatographiques. C'est la nature du matériel à analyser qui doit guider le chercheur dans le choix des méthodes et sur la façon de les mettre en pratique.

De nombreux ouvrages ont été écrits sur l'analyse chromatographique.

Une importante bibliographie a été faite sur ce sujet, notamment dans le dernier volume "Chromatography" de MM. E et M. LEDERER publié en 1957 où ils donnent plus de 3500 références.

CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE GAZ-LIQUIDE -

Cette méthode a été mise au point par JAMES et MARTIN qui ont repris la théorie de la chromatographie en phase liquide de MARTIN et SYRIGE. Ils ont transposé les hypothèses émises dans ce dernier cas à la chromatographie de partage en phase gazeuse.

Ils ont admis :

- que le coefficient de partage d'un composé entre la phase liquide et la phase vapeur est une constante.

- que la diffusion à l'intérieur d'une phase dans la colonne est négligeable.

- que le calcul doit tenir compte de la compressibilité de la phase mobile.

C'est une méthode applicable seulement aux substances volatiles et qui peut être utilisée dans le même but que la distillation sous ses diverses formes.

JAMES et MARTIN ont essayé de séparer des acides gras volatils (1952) par le système gaz-liquide. Il est plus facile de détecter de petites quantités de vapeurs dans un gaz, que de petites quantités d'un corps dissous dans un solvant.

Ce nouveau système consiste à utiliser un gaz comme phase mobile.

L'appareillage est composé d'une colonne, maintenue à température convenable par une enveloppe de vapeur, remplie d'un support inerte - KIESELGUHR par exemple - à la surface duquel est répartie une phase liquide stationnaire, à point d'ébullition élevée et à bonne stabilité thermique.

Le mélange des corps à séparer est introduit, sous forme gazeuse, en tête de la colonne, et est entraîné le long de cette colonne par un gaz inerte (souvent de l'azote). Les divers constituants se séparent et sortent de la colonne suivant leur volatilité relative. Un dispositif convenable, placé à la sortie de cette colonne, les détecte, enregistre leur masse ou leur concentration au passage.

(Le support inerte peut être remplacé par un adsorbant. On a alors une adsorption gaz-solide au lieu d'un partage gaz-liquide (CLAEISSON 1946)).

BIBLIOGRAPHIE

- BOULANGER (P.) - Quelques exemples d'application de la chromatographie de partage en chimie biologique (Ch. An. 37, N° 7, Juil. 1955, p. 227).
- BOULANGER (P.) et BISERTE (G.) - La chromatographie de partage (Exposés annuels de Biochimie médicale, 11^o Série, 1950, Masson, Paris).
- BRAUNITZER (G.) - Die Chromatographische Analyse in Säulen (dans vol. I, K. PAECH, M.V. TRACEY ; Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, p. 95, Springer, Berlin, 1954).
- BRIMLEY (R.C.) et BARRETT (F.C.) - Practical Chromatography (Chapman et Hall Ltd London, 1954).
- CARLES (J.) - Nouvelles techniques de chromatographie circulaire. (Bull. Soc. Chim. Biol. 37, N° 4, 1955, p. 521).
- CASSIDY (H.G.) - Fundamentals of Chromatography (Technique of organic chemistry, vol. X - Interscience Publishers, Ltd London ou INC New York, 1957).
- CHOUIN (P.) - La chromatographie en phase gazeuse (Bull. Soc. Ch. de Fr. Fév. 1957, p. 83).
- GONSDEN, GORDON, MARTIN - Qualitative analysis of proteins : a partition chromatography method using paper (Biochem. J. 1944, 38, N° 3, p. 224).
- CRAMER (F.) - Papier chromatographie (Verlag Chemie GMBH, Weinheim, 1954).
- HELLMANN Von H.) - Papierchromatographie (dans vol. I K. PAECH, M.V. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse p. 127, Springer, Berlin 1954).
- JAMES (A.T.) - Chromatographie à gaz et liquide (Endeavour, Avr. 1956, p. 73).

- JAMES (A.T.) et MARTIN (A.J.P.) - Chromatographie gaz-liquide
Une technique pour l'analyse et l'identification des
matières volatiles
(Chimie Anal. 37, N° 10, Oct. 1955, p. 321).
- MACHEBOEUF (M.), MUNIER (R.) et ALLOUF (R.) - Chromatographie sur papier
(Technique de Laboratoire
J. LOISELEUR 2° Edition p. 344, Masson et Cie 1954).
- LEDERER (E.) - Acquisitions récentes en chromatographie
(Mises au point de Chimie analytique et d'Analyse Bromatologique, 1955, 3° série p. 43).
- LEDERER (E.) et LEDERER (M.) - Chromatography
A review of principles and applications 2è ed. Elsevier
Publishing Company London, 1957).
- MOLOSTER (Z.) - Contribution à l'identification des colorants par
chromatographie sur papier. Différentes applications.
(Thèse, Fac. Sc. Paris, 1957).
- MOLOSTER (Z.) - La chromatographie en phase vapeur
(2ème Thèse, Fac. Sc. Paris, 1957).
- PARTRIDGE (S.M.) - Application of the paper Partition Chromatogram to
the Quantitative Analysis of Réducing sugars (Nature
158, N° 4008, p. 270; 1946).
- PEYRON (L.) - Chromatographie à développement radial
(Bull. Soc. Chim. de Fr. Juin 1958, p. 889).
- RESPLANDY (A.) - Contribution à l'analyse chromatographique des
alcaloïdes ; application à l'étude des alcaloïdes du
Burasaia Madagascariensis
(Thèse Fac. des Sc. Paris, 1958).
- RESPLANDY (A.) - Procédés électrochimiques d'identification, de sépa-
ration et de dosage des amines naturelles.
(2ème Thèse, Fac. des Sc. de Paris, 1958).
- SAMUELSON (O.) - Utilisation des échangeurs d'ions en chimie analytique.
(Ch. An. 37, N° 6, Juin 1955, p. 91).

SAVIDAN (L.) - La chromatographie
(Dunod, Paris, 1958).

STOLL (S.) - Les méthodes chromatographiques au service de la chimie
des Aliments.
(Mises au point de Chimie analytique et l'Analyse
Bromatologique, 1954, 2è Série, p. 89).

TURBA (F.) - Chromatographische methoden in der proteinchemie
(Berlin, 1954, Springer-Verlag).
