

Partie II : Analyse des Substance Naturelle

Chapitre 1: Chromatographie

1Chromatographie: aspects généraux

1.1 Définition:

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser 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 successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase. On peut classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation.

1.2.Nature des phases:

+ Phase fixe :

Solide ou liquide : Les solides, silice ou alumine traitées(permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes). Ils peuvent être employés comme **remplissage** d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC) ou **étalés** en Couche Mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (Chromatographie sur Couche Mince ou CCM)

liquide : le liquide imprégnant un support solide ou encore par une **chaîne carbonée** fixée sur un support (phase greffée). Ainsi en chromatographie sur papier, la phase fixe est formée par l'eau que les molécules de cellulose du papier adsorbent, alors qu'en chromatographie en phase gazeuse, elle est constituée d'un liquide peu volatil et thermiquement stable imprégnant un granulé poreux.

+Phase mobile:

gaz (ex: chromatographie en phase gazeuse): la phase mobile est appelée gaz vecteur ou gaz porteur.

liquide (ex: chromatographie sur papier, couche mince ou colonne): la phase mobile est appelée éluant.

1.3. Nature des phénomènes:

On distingue quatre types de phénomènes que nous allons étudier successivement:

- + Chromatographie d'adsorption
- + Chromatographie de partage
- + Chromatographie ionique
- + Chromatographie d'exclusion

✚ Chromatographie d'adsorption:

C'est une chromatographie **liquide-solide**. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire. Elle est illustrée par la séparation chromatographique classique, sur **colonne** remplie ou sur **couche mince**, des composés moléculaires.

L'adsorption est un phénomène d'interface à la différence de l'absorption (Figure 1)
« lorsqu'à la surface du gel de silice on greffe une monocouche d'hydrocarbure, les molécules, qui présentent une partie lipophile et l'autre hydrophile, s'orientent à l'interface comme en témoigne l'exemple de l'orangé d'acridine en phase aqueuse ».

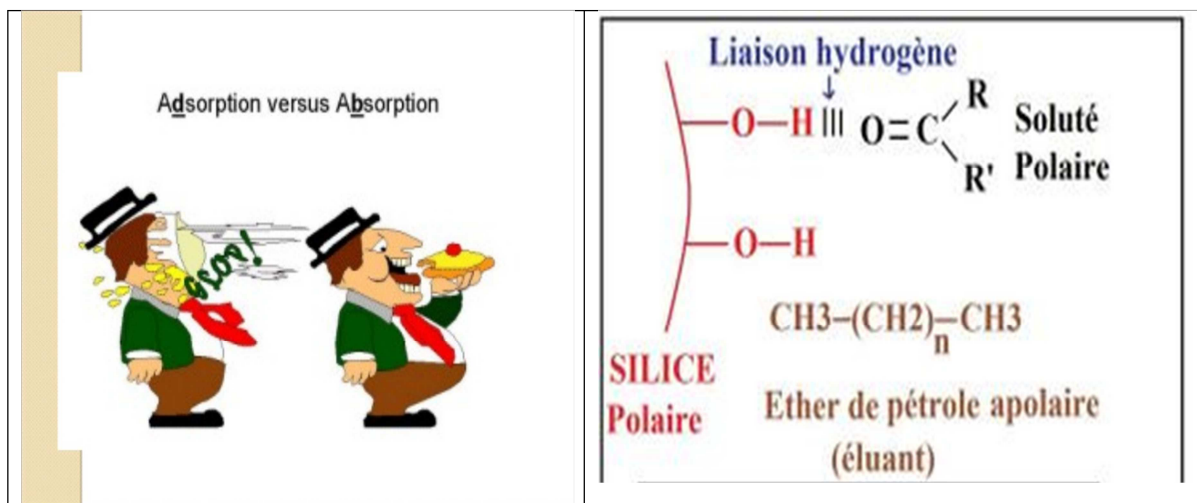


Figure 1 : Principe de l' adsorption

✚ Chromatographie de partage:

C'est une chromatographie **liquide-liquide**. La phase stationnaire est un **liquide** fixé sur un support inerte. Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le **partage** du soluté dans les **deux phases liquides**. Elle est fondée sur la différence de solubilité des substances à séparer dans deux fluides parfaitement miscibles. Elle est mise en pratique en chromatographie sur papier. Un des fluides est un liquide retenu sur un support inerte et constitue la phase stationnaire. **L'autre, liquide** ou **gaz** en déplacement, constitue **la phase mobile**. Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents. Les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que ceux qui le sont moins.

Un autre facteur qui intervient est la polarité de la phase: ainsi en HPLC on peut utiliser des phases stationnaires peu ou non polaires, la phase mobile étant polaire (eau ou mélange eau - méthanol): on parlera alors de chromatographie de partage à polarité de phase inversée.

⚡Chromatographie ionique:

Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire comporte **des groupements ionisés (+ ou -) fixes**; des ions mobiles de charge opposée assurent **l'électroneutralité**. Les ions retenus au voisinage des charges fixes sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile. La séparation est basée sur cette propriété d'échange d'ions et ne peut donc s'appliquer qu'à des **solutés ionisables**.

Les échangeurs d'ions : La phase stationnaire est constituée d'un support insoluble dans l'eau, sur lequel sont greffés des groupements fonctionnels ionisables. Les supports peuvent être :

- minéraux : silice
- organiques : résine polystyrénique, cellulose, dextrane

-Les groupements fonctionnels sont fixés par des liaisons covalentes sur la matrice; ils sont de deux types :

- les échangeurs de cations portent des groupements chargés (-)
- les échangeurs d'anions portent des groupements chargés (+)

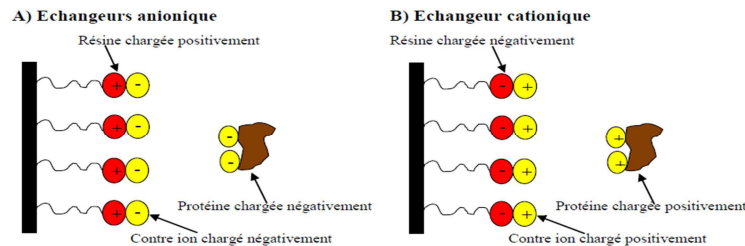


Figure 2 : les échanges ions (+ ou -)

⚡Chromatographie d'exclusion:

La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

La phase stationnaire est généralement un polymère poreux dont les pores ont des dimensions choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise une sorte de tamis à l'échelle moléculaire, dit à **perméation sélective**. Le coefficient de partition s'appelle dans ce cas le coefficient de diffusion. Cette technique est encore appelée **filtration sur gel** ou **perméation de gel** selon la nature de la phase mobile (aqueuse ou organique). Le diamètre des pores est une caractéristique de chaque type de gel.

Un mélange de solutés de masses molaires variables traverse une épaisseur donnée de gel: **les grosses molécules**, celles dont le **diamètre est supérieur** à celui des pores, sont **exclues** et éluées **les premières**; les **petites** et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car **incluses**, leur migration est **freinée** en diffusant dans le gel (Voir figure ci-dessous).

La séparation est donc réalisée par le fait que les solutés sont élués dans l'ordre inverse des masses molaires.

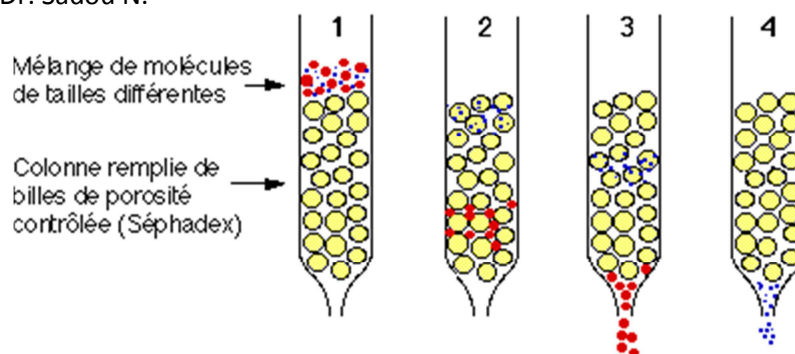


Figure 3: Filtration sur gel de Sephadex .

2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

2.1 Définition :

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont:

- ✓ **la cuve chromatographique** : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- ✓ **la phase stationnaire** : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.
- ✓ **l'échantillon** : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- ✓ **l'éluant** : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

2.2. Principe de la technique.

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, **l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité**. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

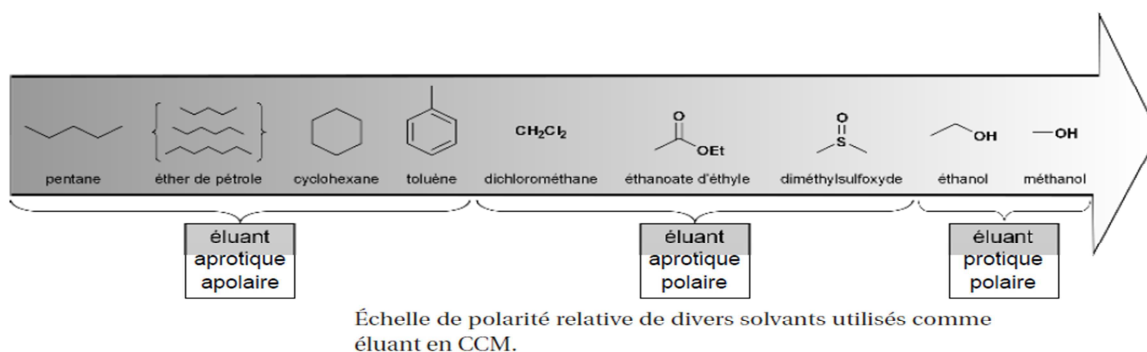
➤ **Adsorbants et plaques chromatographiques.**

Adsorbant :Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose

Les séparations sont basées sur le principe de polarité c'est à dire l'existence de dipôles. Le gel de silice et l'alumine sont les adsorbants les plus utilisés. En général, plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires. Il est cependant possible de traiter un adsorbant pour modifier ses capacités d'adsorption et ses propriétés: Plus la teneur en eau d'un adsorbant est faible (ce qui a pour conséquence la présence d'un plus grand nombre de sites d'adsorption pour le soluté), plus il est polaire ou actif.

➤ **Phase mobile:**

Le pouvoir éluant d'un liquide dépend de sa propre polarité. Les liquides classés ci-dessous le sont par polarité croissante.



2.3. Applications de la CCM.

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.

De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

La chromatographie sur couche mince est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne.

2.4. Réalisation d'une CCM

✚ Choix de l'éluant.

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est trop polaire; celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment (voir tableau ci-dessous).

Tableau 1 : Migration des composés

Migration des composés

Composé	Éluant	Le composé...
polaire	polaire	...migre car il est solubilisé (②) et « poussé » (③)
	apolaire	...ne migre pas (①)
apolaire	polaire	...migre car il est « poussé » (③)
	apolaire	...migre car il est solubilisé (②)

Conséquences de la polarité du composé et de l'éluant sur la migration. Chaque numéro fait référence à un des phénomènes en compétition.

Une méthode simple pour trouver l'éluant approprié consiste à préparer des solutions de l'échantillon dans différents solvants, en concentration d'environ 2 à 5% en volume. A l'aide d'une micropipette, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée d'environ 1 cm. Le meilleur éluant est celui qui, lorsqu'il a terminé sa migration, a entraîné le soluté à une distance d'environ la moitié de celle qu'il a parcourue.

Une autre méthode consiste à déposer une solution des substances à analyser en plusieurs points, séparés d'environ 2 cm. Après séchage, on applique au centre de chaque point une micropipette remplie de solvant; Après diffusion, l'éluant qui convient sépare les solutés.

Choix de l'éluant dans le cas d'analyses :

- ✓ d'hydrocarbures : hexane, éther de pétrole ou benzène.
- ✓ de groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique forment un éluant de polarité moyenne.
- ✓ de composés polaires : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol

✚ Préparation de la cuve

Une cuve de chromatographie se compose de la cuve en verre et d'un couvercle. Le couvercle sert d'une part à éviter l'évaporation du solvant mais surtout à réaliser la CCM en atmosphère saturée (pression de vapeur saturante du solvant). On remplit la cuve avec l'éluant de sorte à avoir un demi-centimètre de hauteur de liquide. et on ferme la cuve afin de la saturer en vapeur d'éluant (figure3)

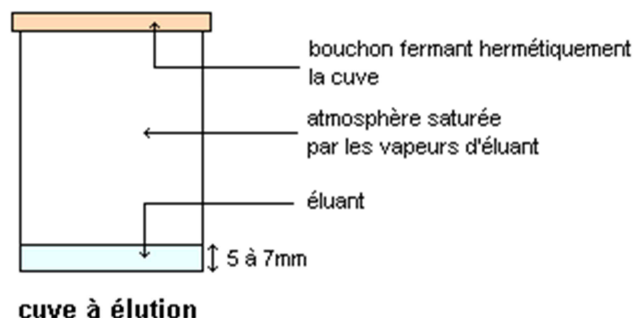


Figure 4: cuve à élution

✚ Préparation de la plaque

On découpe la plaque CCM selon la dimension choisie, puis tracer un trait (**ligne de dépôt**) au crayon à papier à environ 1 cm du bas, sur la face recouverte de silice, sans rayer la surface ; Sur ce trait tracer 4 petits points à 1 cm de distance où seront déposés les taches.

✚. Dépôt de l'échantillon.

L'échantillon est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : on emploie fréquemment le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution est déposée en un point de la plaque situé à environ 1 cm de la partie inférieure.

Il est important que le diamètre de la tache produite au moment du dépôt soit faible; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3 mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large.

L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité de la pipette sur la couche d'adsorbant en prenant soin de ne pas le détériorer. On peut aussi utiliser l'extrémité, un peu émoussée, d'un cure-dent.

On vérifie l'identité des composants présumés d'un échantillon, en procédant à un dépôt séparé d'une solution de chacun d'eux puis à celui de leur mélange. Ces solutions témoins permettent de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à analyser.

Développement de la plaque.

Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque. Dans les analyses usuelles de laboratoire, le principal type de développement est la chromatographie ascendante : la plaque est placée en position verticale dans une cuve et le solvant qui en recouvre le fond monte par capillarité.

Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve; on place souvent du papier filtre contre les parois de la cuve pour saturer plus rapidement la cuve en vapeurs d'éluant et éviter les effets de bords. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée.

Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir.

✚ Révélation.

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes (valable également pour la chromatographie sur papier) directement si les substances sont colorées à l'aide de révélateurs si elles sont incolores afin de les transformer en taches colorées; les produits sont souvent décelés

par leurs réactions fonctionnelles classiques: les acides aminés par la ninhydrine qui donne avec la plupart une couleur bleu-violet, les acides organiques par des indicateurs colorés, les sucres par le réactif de Molisch qui utilise le pouvoir réducteur des sucres. Quelques réactifs comme l'iode ou le permanganate donnent des colorations non spécifiques avec la plupart des composés organiques.

Toutes les substances ayant une absorption dans la région au-dessus de 230 nm sont étudiées sur des supports additionnés de corps fluorescents par irradiation de lumière UV à ondes courtes ($\lambda_{max} < 254 \text{ nm}$). L'emploi de couches non additionnées de produits fluorescents permet aussi la mise en évidence de beaucoup de substances dans l'UV à ondes courtes ($\lambda_{max} < 254 \text{ nm}$) ou à ondes longues ($\lambda_{max} > 366 \text{ nm}$) par suite de la fluorescence propre des composés.

Dans tous les cas, il faut noter les positions des taches colorées juste à la fin de la chromatographie en les cerclant car certains produits disparaissent avec le temps.

✚ Calcul de Rf (retarding factor ou rapport frontal)

h: distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache)

H: distance parcourue par le front du solvant

$$R_f = h/H$$

Pour un couple éluant et support déterminé, Rf est une caractéristique de chaque soluté à la température de l'expérience. Rf est toujours indépendant de la longueur de bande utilisée.

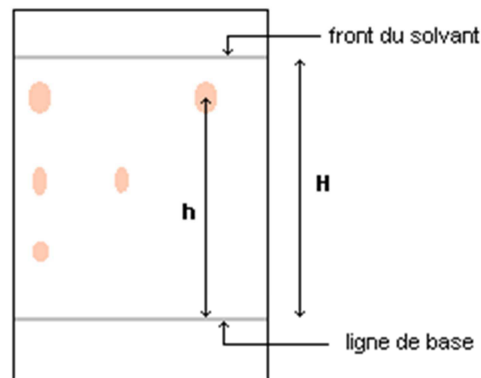


Figure 5: CCM après révélation

Chromatographie sur couche mince (CCM)

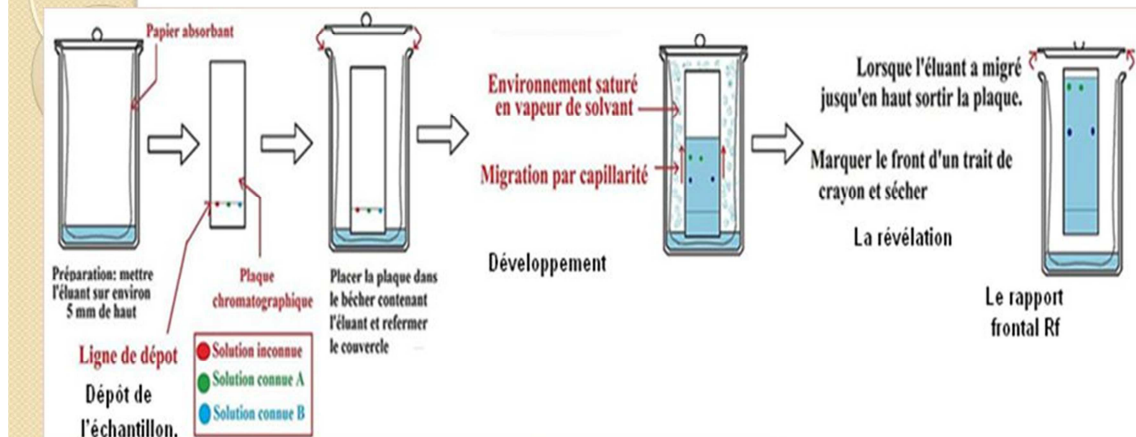


Figure 6: étapes de réalisation de CCM

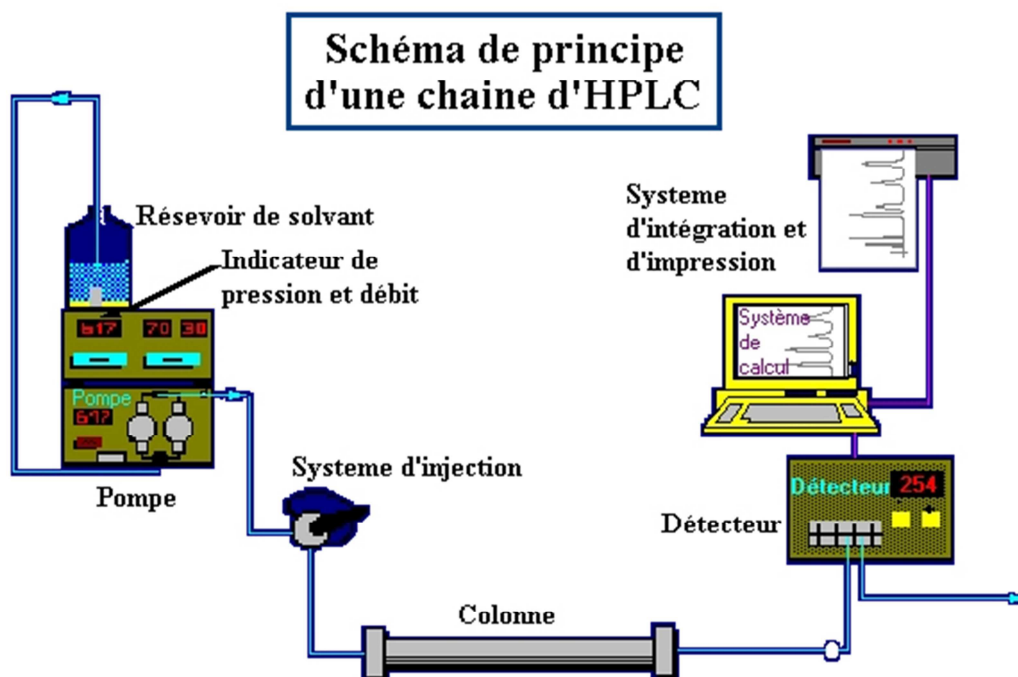
3. La Chromatographie Liquide à Haute Pression (HPLC)

3.1.Principe

La chromatographie en phase liquide à haute performance (l'abréviation anglaise HPLC - High Performance Liquid Chromatography est plus fréquemment utilisée) est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide sous pression environ 70 bar (appelé aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les « grains » sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. La chromatographie liquide à haute pression est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne sans en présenter les inconvénients qui sont: la lenteur des séparations, l'absence de détecteurs et la quantité considérable d'échantillon nécessaire. C'est un appareillage plus sophistiqué qui permet de mettre en œuvre, selon la nature de la **phase stationnaire**, aussi bien des **phénomènes de partage**, qui sont les plus courants, que des **phénomènes d'adsorption, d'échanges d'ions ou d'exclusion**.

3.2.Les différentes composantes d'une chaine HPLC

Vous trouvez dans le schéma ci-dessous les différentes composantes d'une HPLC



➤ **Réservoir de la phase mobile** (solvant) Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium. Les solvants doivent être très purs et il existe plusieurs qualités en fonction de l'application.

Tableau 2 : Pouvoir d'éluion de la phase mobile en HPLC

phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

➤ **La Pompe** Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. La pompe doit répondre aux exigences suivantes :

- ✚ fournir des pressions élevées jusqu'à 400 bars
- ✚ débit stable, non pulsé et réglable de 0.1 à 10 ml/min avec un contrôle meilleur que 0.5 %
- ✚ résistance à la corrosion quel que soit le solvant utilisé.

Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant.

➤ **L'injecteur**

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 µ L...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne. Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue

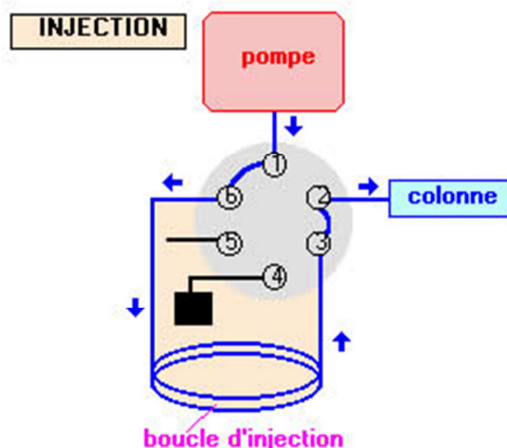


Figure 8: INJECTEUR HPLC

➤ **La Colonne :** C'est la partie du système qui permet la séparation des composés. Il s'agit d'un cylindre calibré en acier inoxydable et parfois en matériaux inerte (verre ou plastique). elles ont généralement un diamètre interne de 4,6mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μ m. Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires.

✚ La phase normale:

La phase dite « normale » est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant peu polaire (apolaire). Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête.

✚ La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice **greffée par des chaînes** linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est très peu polaire (apolaire) et nécessite donc un éluant polaire. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

➤ Le Détecteur

Le détecteur est placé à la sortie de la colonne chromatographique et doit être capable de détecter les composés qui sortent de la colonne. Le signal est converti en impulsion électrique qui est transmise à l'enregistreur. Comme en chromatographie en phase gazeuse, les détecteurs utilisés en chromatographie liquide à haute pression doivent posséder certaines qualités, dont les principales sont :

- une grande sensibilité
- une réponse linéaire sur une gamme de concentration élevée
- une capacité à détecter le plus de produits possible.

Les principaux détecteurs utilisés en HPLC sont :

✚ Détection par IR

✚ Détection par UV

✚ Détecteur à diode array (DAD)

➤ **L'Enregistreur**

Les enregistreurs sont les mêmes que ceux utilisés en chromatographie en phase gazeuse.

Les logiciels d'application, comme le Millennium, sont également utilisés en HPLC.

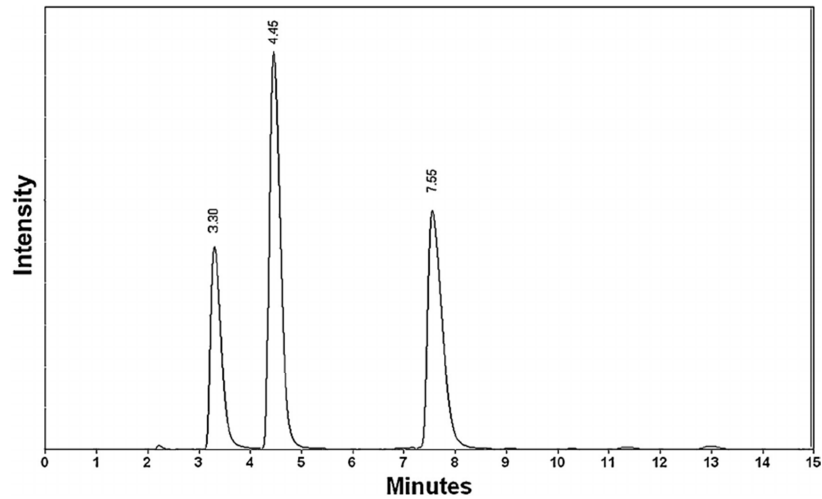


Figure9 : Chromatogramme des standards acide chlorogénique, acide caféique , rutine

✚ **Les Applications de l'HPLC**

La HPLC est particulièrement utile pour la séparation de matériaux de masse moléculaire élevée qui ont une très faible volatilité et ne peuvent pas être séparés par chromatographie en phase gazeuse. Les principaux domaines d'applications sont la biotechnologie, les sciences de la vie et l'industrie pharmaceutique.

ue.

4. La chromatographie sur colonne

C'est une méthode de purification couramment utilisée en phytochimie afin de séparer les constituants d'un Extrait de plante.

Elle permet, en effet, de purifier une quantité importante d'extrait (pouvant aller jusqu'à plusieurs grammes) pour une utilisation ultérieure en analyse par RMN, SM, HPLC,

4.1. Principe de la technique

Le principe est le même que celui de la CCM, la séparation des produits d'un mélange selon leur affinités relatives pour une phase mobile et une phase stationnaire. Lors d'une chromatographie sur colonne, l'adsorbant est placé dans la colonne (la phase stationnaire) tandis que l'éluant est un solvant, qui se déplace par gravité (et parfois sous l'effet d'une surpression) constitue la phase mobile

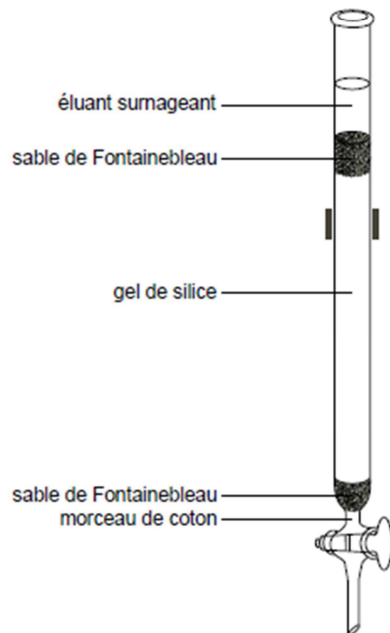


Figure 10 : Schéma d'une colonne de chromatographie.

4.2. Réalisation d'une CL

✚ Choix de l'éluant

Comme en CCM, l'éluant est choisi en fonction de la nature des molécules à séparer. Des mélanges de différents solvants peuvent être réalisés pour ajuster la polarité de l'éluant.

Avant d'entreprendre une chromatographie sur colonne, des CCM sont réalisées avec des éluants différents afin de déterminer les conditions de séparation optimales

✚ Préparation de la colonne

- Placer un petit **morceau de coton** au fond de la colonne afin de retenir son contenu.
- **Fixer fermement** la colonne de chromatographie, robinet fermé, en s'assurant de sa **verticalité** (schéma **a**).
- Verser approximativement 5 cm d'éluant dans la colonne
- Ajouter environ 1 cm de **sable** . S'assurer que la surface est horizontale (schéma **b**).
- Introduire une première portion du gel. Faire **couler le gel lentement sur les parois**
- **Tapoter** continuellement les parois de la colonne pour assurer un tassement efficace du gel et obtenir un adsorbant homogène.
- Ouvrir le robinet pour évacuer l'excès d'éluant sans assécher la silice.
- Vérifier que la couche supérieure d'adsorbant est **parfaitement horizontale** et qu'il n'y a **ni fissure ni bulle d'air** (schéma **c**).
- Ajuster le niveau d'éluant à 2 ou 3 cm au-dessus de la couche supérieure d'adsorbant.
- ajouter environ 1 cm de sable de (schéma **d**).
- Tapoter la colonne pour tasser le sable.

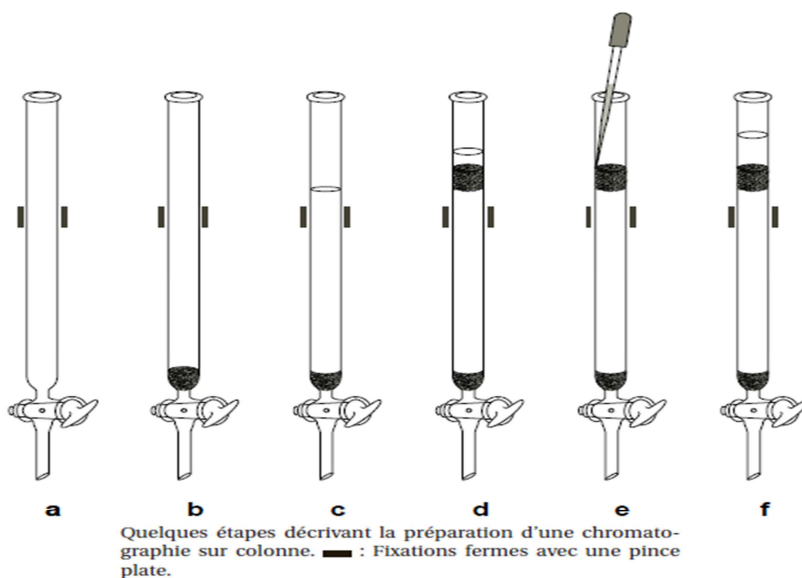


Figure 11 : Schéma des étapes de Réalisation d'une CL

✚ Remplissage de la colonne

Il y a deux type d' adsorbant : la **silice** et l'**alumine**. Dont la quantité d'adsorbant utilisée dépend principalement de deux facteurs : la **masse de l'échantillon à purifier** et la **difficulté de la séparation**.

Voici la quantité approximative d'adsorbant utilisée par gramme d'échantillon à purifier :

- ✓ Séparation « facile » environ 30 g pour 1 g de produit
- ✓ Séparation « difficile » jusqu'à 100 g pour 1 g de produit.
- ✓

Il existe deux techniques de remplissage.

- Remplissage à sec

Remplir la colonne aux deux tiers de solvant.

Faire couler l'adsorbant dans la colonne à l'aide d'un entonnoir en faisant attention à avoir une répartition homogène dans la colonne. La colonne est prête lorsque le solvant surnageant au-dessus de l'adsorbant est devenu limpide.

- Remplissage avec le solvant

Préparer une bouillie en mélangeant dans un bécher l'adsorbant dans le solvant.

Placer cette bouillie dans la colonne à l'aide d'un entonnoir en faisant attention à avoir une répartition homogène dans la colonne.

La colonne est prête lorsque le solvant surnageant au-dessus de l'adsorbant est devenu limpide.

Lors du remplissage frapper les parois de façon à avoir un tassement maximal.

✚ Dépôt du mélange à purifier

Que le mélange à purifier soit liquide ou solide, il est préalablement de le dilué dans un minimum de solvant d'élution (le moins polaire). Avant de réaliser le dépôt, on ajustera le niveau du solvant pour qu'il touche à la surface du sable. A l'aide d'une pipette Pasteur, réaliser le dépôt (schéma e).

Adsorber uniformément l'extrait en sommet de la colonne en laissant couler un peu d'éluant (Ouvrir le robinet). Ajouter quelques centimètres d'éluant à l'aide d'une pipette Pasteur en contact avec les parois de la colonne (schéma f). Les ajouts ultérieurs peuvent être effectués plus rapidement avec un erlenmeyer (tout en prenant garde à ne pas perturber la couche supérieure d'adsorbant).

Pour déposer les mélanges solides, il est possible de les dissoudre dans la quantité minimale de solvant d'élution. Il est aussi possible de les absorber sur 5 à 10 g de silice dans un solvant adéquat et de déposer le solide obtenu après évaporation au sommet de la colonne.

✚ Éluion

La colonne est alimentée par l'éluant au fur à mesure à l'aide de pipette Pasteur, des fractions de l'ordre de 10 à 50 ml suivant le volume de la colonne sont recueillies dans des tubes numérotés. L'analyse des fractions se fera par **CCM** afin d'**identifier** les composés présents. Finalement, les fractions correspondant au produit désiré sont **assemblées** puis le solvant est éliminé à l'**évaporateur rotatif**

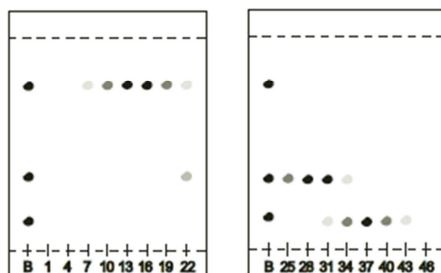


Figure 11 : CCM obtenues lors de l'éluion

4.3. Flash chromatographie haute pression

Il existe maintenant des systèmes automatisés où la colonne est prépaquetée, le gradient est programmé, et l'appareil collecte des fractions. L'interface nous donne directement les fractions qui contiennent un chromophore. Il reste juste à faire les CCM et évaporer (Fig3).



Figure13 : FLASH CHROMATOGRAPHIE HAUTE PRESSION (Dr.SADOU)

4.4. Applications

- Purification de composés synthétiques
- Purification mélange complexe de composés synthétiques
- L'isolement de biopolymères tels que des peptides et des nucléotides
- La purification **de produits naturels**