

Expérience # 4

Séparation d'un mélange par chromatographie sur colonne : Les pigments de plantes vertes

1. But

Le but de l'expérience consiste à séparer différents composés que l'on retrouve dans les végétaux par chromatographie sur colonne. La séparation est caractérisée par la variation de l'indice de réfraction et les composés séparés sont étudiés par différents moyens physiques. Nous pourrions ainsi en identifier quelques-uns.

2. Théorie

La chromatographie est une technique utilisée pour séparer les constituants d'un mélange et pour purifier des substances. Bien que cette technique ait été développée à l'origine pour séparer des substances colorées (d'où le nom, Chroma (grec signifie couleur)), la chromatographie est de nos jours utilisée pour séparer tous les types de substances, y compris celles qui sont incolores. Il faut donc employer une technique de révélation efficace pour observer les composés (UV, indice de réfraction, réactif complémentaire, masse après évaporation de l'éluant...).

Le principe de base de la technique de chromatographie réside dans la différence d'affinité d'un soluté envers une phase stationnaire (l'adsorbant) et une phase mobile (l'éluant). Évidemment, ces phases ne doivent pas réagir chimiquement l'une avec l'autre. Au contact de ces deux phases, un soluté sera séparé des autres solutés selon sa plus ou moins grande affinité pour ces phases.

Comme nous l'avons déjà vu dans le cadre du cours *Éléments de chimie organique*, il existe plusieurs méthodes de chromatographie. Celle qui nous intéressera ici sera la chromatographie sur colonne. Le principe général est similaire à celui de la CCM à la différence près que l'on peut séparer une plus grande quantité d'un composé. Le temps requis est toutefois relativement long pour effectuer une séparation adéquate.

La chromatographie sur colonne permet de séparer pratiquement tous les mélanges possibles. Il suffit de trouver les bonnes conditions (phase mobile et phase stationnaire). Il n'existe pas de règles définies pour trouver ces conditions. La méthode est donc une méthode passablement empirique d'essais et erreurs.

Dans un premier temps, il faut trouver un solvant qui parvient à dissoudre tous les constituants du mélange dans le cas où ce dernier est à l'état solide. La quantité de solvant requise doit être minimale. Ce solvant pourra souvent être utilisé comme éluant (phase mobile). Si le solvant de dilution n'est pas le même que la phase mobile, il devra avoir un faible pouvoir d'éluant. Le mélange pourra être déposé à la surface d'une colonne de l'adsorbant que l'on a choisi. Les adsorbants les plus communs sont le gel de silice et l'alumine. Ces deux adsorbants sont considérés polaires (SiO_2 et Al_2O_3).

Lorsque l'on travaille en phase normale, l'adsorbant est polaire. L'éluant est donc choisi en fonction de la polarité des espèces séparées. Il sera nécessaire de trouver un éluant polaire pour pouvoir éluer une espèce polaire. En phase inverse, la phase stationnaire est non polaire (un substrat non-polaire est fixé à la surface de billes de verre de très petit diamètre). Le pouvoir d'élution des différents solvants est donc inversé. Les critères qui permettent de choisir l'éluant sont:

Tableau # 1 Attractivité pour une phase stationnaire polaire

Fortement retenus
Acides carboxyliques et amines Alcools Aldéhydes, cétones et esters Éthers Hydrocarbures aromatiques et halogénures aromatiques Alcènes et alcynes Halogénures et hydrocarbures saturés
Peu retenus

Tableau # 2 Pouvoir d'élution de solvants sur un adsorbant polaire

Pouvoir élevé (éluant polaire)
Acides organiques (solution aqueuse) Eau Méthanol > éthanol > propanol ... Acétone Acétate d'éthyle Éther Dichlorométhane Toluène Cyclohexane Hexane Éther de pétrole
Pouvoir faible (éluant peu polaire)

Le montage utilisé est illustré à la figure 1.

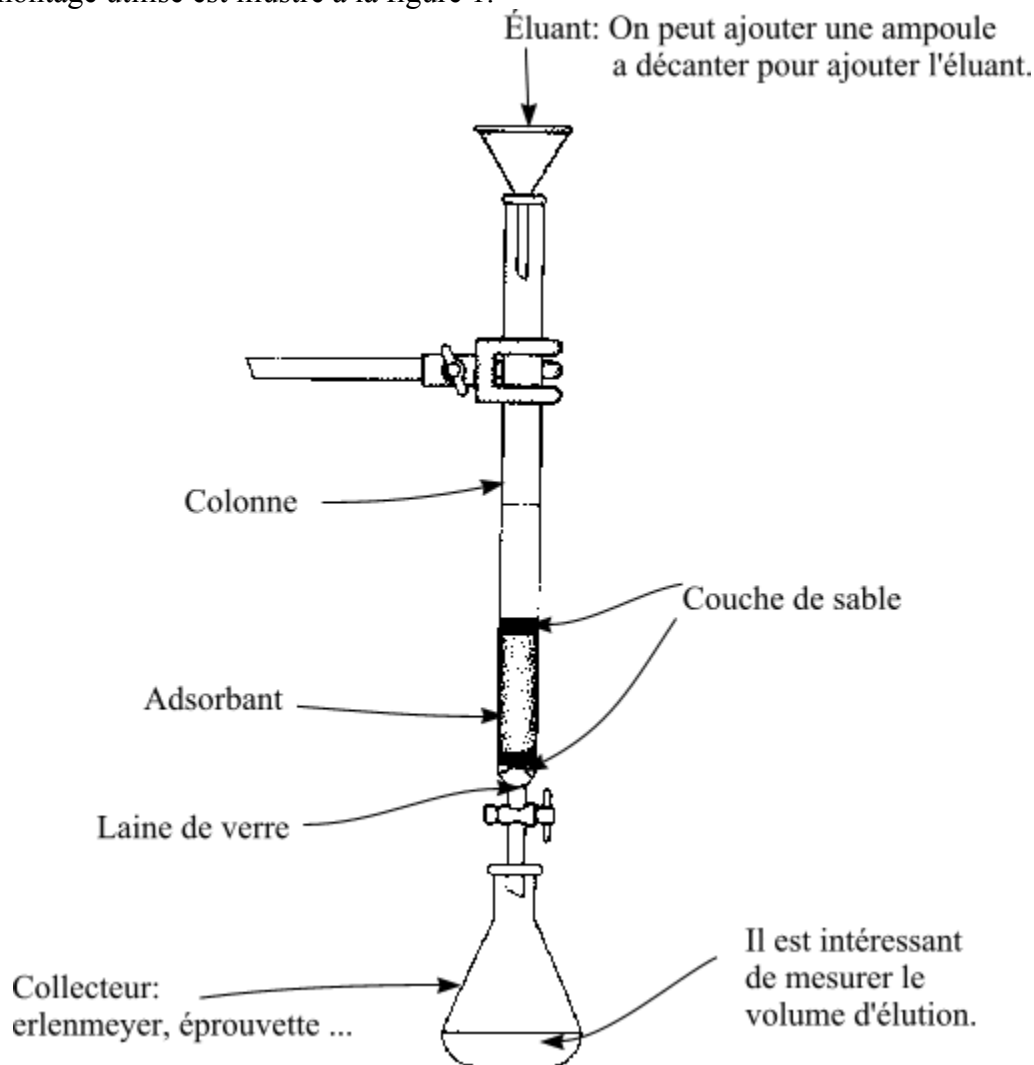


Figure 1. Montage pour effectuer la chromatographie sur colonne

La technique sera appliquée pour séparer un mélange de composés retrouvés dans les végétaux. Comme nous ne sommes pas assurés de la coloration de ces derniers, nous en profiterons pour caractériser la chromatographie en ébauchant un chromatogramme qui représentera l'évolution de l'indice de réfraction à différents volumes d'élution. Nous ébaucherons aussi le chromatogramme en suivant l'évolution de la masse séparée. Pour parvenir à nos fins, nous séparerons le volume élué en plusieurs fractions. Une partie sera utilisée pour mesurer l'indice de réfraction (avec la plus petite quantité possible) et le reste sera évaporé et pesé.

Les composés que nous devrions retrouver sont : La chlorophylle a, la chlorophylle b, les carotènes, la phéophytine (complexe similaire aux chlorophylles avec le cuivre au lieu du magnésium) et le xanthophylle. Il sera très intéressant de trouver les propriétés de ces composés avant d'entreprendre le laboratoire.

3. Mode opératoire

3.1 Extraction des pigments

1. Pesez environ 5 à 10 g du végétal analysé et transférez le tout dans un mortier. ajoutez aussi environ ½g d'oxyde de magnésium ou de carbonate de magnésium pour neutraliser l'acidité du milieu et limiter la formation d'une phéophytine.
2. Ajoutez 4 à 10 mL d'acétone et broyez en mélangeant le tout avec un pilon.
3. Ajoutez environ 4 mL d'hexane ou **d'éther diéthylique** et broyez encore.
4. Filtrez le tout sous vide. Rincez avec un peu d'acétone suivie d'eau distillée si nécessaire (le moins possible).
5. Transférez le filtrat dans une petite ampoule à décantier ou dans une éprouvette à centrifugeuse (vous devrez alors possiblement centrifuger ☺). Si les feuilles de la plante sont encore colorées, répétez les étapes 2 à 4 avec des quantités moindres des solvants (seulement si l'on veut faire un travail quantitatif ou si notre extrait n'est pas suffisamment coloré). Combinez les filtrats. On peut négliger le reste de couleur sur les feuilles de la plante si le travail effectué n'est pas quantitatif...
6. Ajoutez 10 mL d'eau distillée seulement si la séparation des phases n'est pas évidente et agitez très doucement. Décantez et conservez la phase colorée (dans l'hexane ou l'éther selon le cas).
7. Lavez encore cette phase colorée avec de l'eau distillée ou de l'acétone. Si vous n'observez pas deux phases, c'est que vous avez conservé la mauvaise phase à l'étape précédente ☺.
8. Asséchez la phase organique avec un agent desséchant approprié.
9. Transférez la phase asséchée dans un petit erlenmeyer et concentrez le mélange sur une plaque chauffante sous une hotte. Attention de ne pas surchauffer (bain marie avec eau ou huile). Nous voulons éviter la décomposition thermique de notre extrait.

3.2 Séparation par chromatographie

1. Procurez-vous au moins 10 éprouvettes propres et identiques. Graduez-les à 1 mL.
2. Effectuez un montage tel qu'illustré à la figure 1 en prévoyant que le volume d'élution sera collecté dans des éprouvettes (ajustez votre hauteur et prévoyez de l'espace pour changer régulièrement d'éprouvette). Insérez un morceau de laine de verre au fond de la colonne et versez environ 1 cm de sable au-dessus. La surface de sable doit être horizontale.
3. Pesez environ 10 et 15 gramme d'alumine dans un bécher de 100 mL (aucune précision requise, le seul but est de remplir la colonne sur une hauteur de près de 15 cm et d'éviter de gaspiller une grande quantité de l'agent adsorbant. 10 à 15 mL suffisent comme le diamètre de la colonne est environ de 1 cm). Ajoutez graduellement de l'éluant en agitant constamment. Le but est de produire une suspension aussi homogène que possible de la phase stationnaire dans la phase mobile (**7 parties d'hexane pour 3 parties d'acétone et 1 partie méthanol ou 7 parties d'éther pour 3 parties d'acétone et 1 partie méthanol**).
4. En agitant constamment, versez la suspension dans la colonne (la valve est fermée à ce moment). Si une grande quantité n'a pu être transférée, ajoutez encore un peu d'éluant au bécher et ajoutez le tout. Le remplissage de la colonne doit se faire aussi rapidement que possible pour éviter de devoir rajouter de l'éluant. Évidemment, la

suspension doit être aussi homogène que possible avant de commencer à emplir la colonne « une belle bouette ». Il n'est pas très grave de renverser un peu du mélange hétérogène si la colonne déborde (vous devrez nettoyer ☺).

5. Lorsque l'adsorbant s'est déposé, tapotez la colonne avec un crayon et ajoutez une couche de sable de ½ à 1 cm au haut de la colonne (facultatif). Commencez à laisser couler l'éluant dans un contenant quelconque. Ayez toujours de l'éluant à portée de main afin de vous assurer que la colonne ne soit jamais exposée à l'air. Il est IMPÉRATIF que la colonne soit homogène et qu'elle ne craque pas en aucun point. Essayez de remarquer la vitesse de coulée (d'élution) et de l'ajuster à un débit qui n'est pas trop rapide.
6. Lorsque le niveau d'éluant est près de la surface de l'adsorbant et du lit de sable, fermez la valve et ajoutez votre solution extraite en 3.1 à l'aide d'une pipette pasteur à long bec (notez la quantité approximative ajoutée, 1 cm (de colonne) = 1 cm³). Le but est d'éviter d'éclabousser les parois de la colonne.
7. Ajoutez votre première éprouvette (numérotée #1) au bas de la colonne. Ouvrez la valve à nouveau et laissez pénétrer votre échantillon. Vous pouvez rincer les parois doucement avec l'éluant que vous laissez couler sur la paroi de la colonne. N'oubliez pas que la surface de la colonne ne doit JAMAIS être exposée à l'air.
8. Lorsque tout l'échantillon est pénétré dans la colonne (ou qu'il en reste très peu à la surface), continuez à ajouter l'éluant. Il est alors convenable d'élever le niveau de l'éluant à plusieurs centimètres au dessus du lit de sable afin d'éviter d'oublier d'ajouter constamment l'éluant.
9. Observez si possible la colonne à l'aide d'une lampe UV tout au long de la progression de l'élution. (Nous voulons voir si certains composés seraient visibles avec la lumière ultraviolette et non à l'œil nu).
10. Remplacez la première éprouvette avant que le premier composé apparaisse au bas de la colonne. Le volume sera supérieur à 1 mL (seulement pour la première éprouvette car elle ne contiendra que l'éluant). Soyez assuré de ne jamais manquer d'éluant en tête de colonne. Dès que vous aurez le temps, allez mesurer l'absorbance (**SPECTRONIC 20, cuvettes en verre**) à la ou aux longueur(s) d'onde choisies. Observez encore la colonne avec la lampe UV si le temps vous le permet.
11. Lorsque la marque de l'éprouvette # ... est atteinte, remplacez par l'éprouvette 3, 4, 5... Notez encore l'absorbance à la ou aux longueur(s) d'onde choisies pour chaque portion de 1 mL. Observez à la lampe UV... **Si nécessaire, diluez la portion avec une quantité constante d'éluant. N'oubliez pas d'homogénéiser.**
12. Pendant l'élution ou peu de temps après, reproduisez l'expérience sur une couche mince en utilisant votre extrait initial et sur des points séparés, vos composés isolés (les différentes fractions qu'il n'est pas nécessaire d'avoir évaporées). Observez avec une lampe UV et développez avec l'iode.

Note : $\lambda_{\text{max}} = 470$ nm pour les caroténoïdes, 642 nm pour la chlorophylle b et 661 nm pour la chlorophylle a.

4. Cahier de laboratoire

1. Titre de l'expérience
2. But
3. Résumé des manipulations sous la forme d'un organigramme
 - Ajoutez le schéma du montage ainsi que les tableaux qui vous aideraient à trouver le bon éluant et la bonne phase stationnaire.
4. Données et observations

5. Rapport de laboratoire

1. Page titre
2. Données et observations (4,0 pts)
 - Résumez l'étape d'extraction en ajoutant et en expliquant vos observations.
 - Résumez les propriétés des substances que vous prévoyez retrouver dans le mélange.
 - Notez toutes vos données et observations (Notamment la couleur des fractions, l'absorbance à la λ choisie en fonction du volume d'élution total, la chromatographie sur couche mince (rf)...).
3. Résultats et commentaires (6,0 pts) ***** La qualité est évaluée*****
 - Réalisez un chromatogramme en portant l'absorbance à λ mesurée en fonction du volume total d'élution (trouvez un titre plus convenable). Identifiez aussi la couleur et la nature (quel composé) de chaque fraction sur le graphique.
 - Identifiez chaque composant en spécifiant son volume d'élution. Expliquez votre raisonnement immédiatement après l'identification du composé.
 - Classez les composés identifiés en ordre de polarité croissante et expliquez votre raisonnement en vous appuyant sur les polarités des phases mobile et stationnaire ainsi que sur la structure moléculaire.
 - Commentez vos résultats (chromatogramme, qualité de séparation, détection...)
 - Proposez quelques composés qui seraient restés dans la phase aqueuse lors de l'extraction. Justifiez.