

La chromatographie par perméation de gel : une dimension nouvelle en synthèse organique et en analyse de produits naturels.

par G. Seroussi
(Waters Associates)

La C.P.G. est une technique de tamisage moléculaire qui différencie et sépare les molécules en fonction de leur taille effective en solution.

La vitesse de la C.P.G., égale, à présent, celle des autres modes de C.L. à haute pression. En outre le pouvoir séparateur a considérablement augmenté, ce qui donc, rend possible avec des colonnes garnies de microphase de 10 microns * :

Une meilleure détection des composants mineurs.

Des séparations analytiques et préparatives sur la même colonne.

La récupération totale de l'échantillon.

La purification des molécules instables.

Deux à six de ces colonnes de 30 cm de longueur, connectées en série produisent des séparations si remarquables qu'elles donnent une dimension nouvelle dans la recherche de petites molécules (poids moléculaire inférieur à 1500), particulièrement en synthèse organique et produits naturels.

Analyse séquentielle

Il y a quatre types de séparations dans la C.L. : liquide-liquide (partition), liquide-solide (adsorption), échange d'ion et perméation de gel (taille).

Des mélanges très complexes requièrent parfois une séparation faisant appel à plusieurs types de C.L. en séquence pour une analyse complète (fig. 1). La C.P.G. est habituellement la première dans la séquence. La C.P.G. à haute résolution permet souvent de réduire la séquence par la suppression d'un ou plusieurs des types de C.L.

L'application de cette technologie procure là une opportunité non négligeable dans la

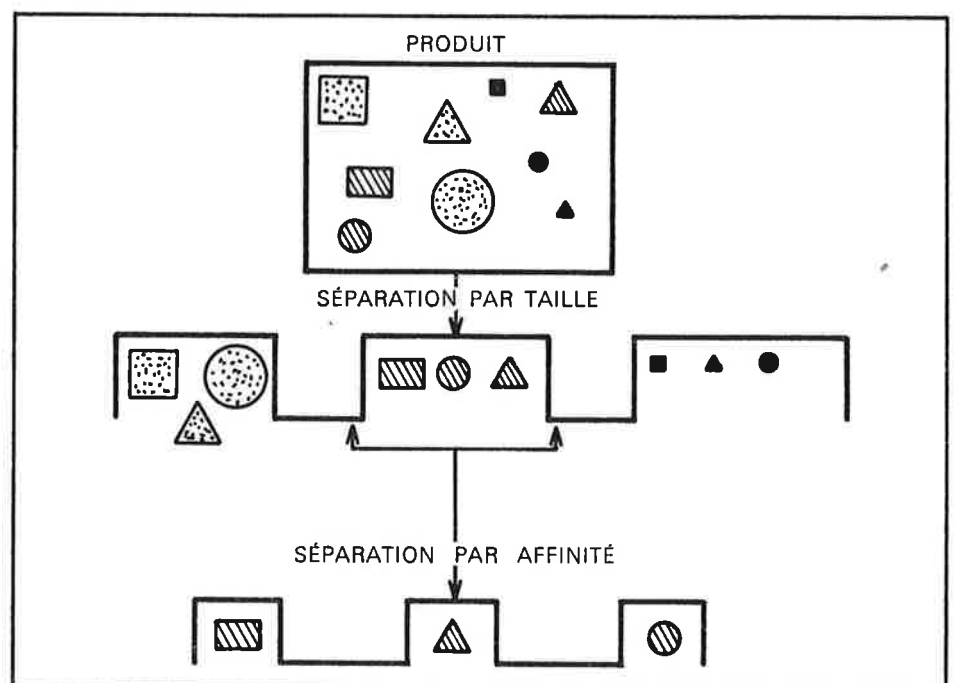


Figure 1.

(*) μ STYRAGEL® (WATERS ASS.).

recherche notamment : synthèse organique générale; botanique, phytopathologie; chimie organométallique; entomologie; photochimie; pollution d'eau; produits pétroliers; analyse des résidus de pesticides et herbicides; colorants et pigments; pharmacologie et métabolisme des médicaments.

Intérêt de la C.P.G. à grande vitesse

Détection meilleure des composants mineurs.

L'utilisation de la C.P.G. à haute résolution dans l'analyse séquentielle est très intéressante dans une analyse très fine car le volume de l'échantillon n'est pas limitatif.

La première étape pour une analyse totale n'est pas la C.P.G. dans ce cas, mais une concentration de l'échantillon organique sur phase inverse.

Ceci est réalisé en utilisant un garnissage de phase inverse lié avec des C_{18} . Avec un solvant non organique dans la phase mobile, ces C_{18} adsorbent les molécules organiques. Dès lors que les produits qui nous intéressent ont été adsorbés et ainsi séparés de la solution, c'est-à-dire retenus sur la colonne, on les récupère en lavant la colonne avec un faible volume de méthanol.

L'échantillon peut éventuellement être concentré par évaporation sous vide.

Par exemple, si les matériaux organiques contenus dans 2 litres d'eau de rivière polluée sont concentrés selon la méthode décrite plus haut, on obtient une solution de 0,2 ml. Dans cette solution de 0,2 ml, on retrouve bien sûr tous les composés organiques, ce qui multiplie donc la concentration par 10 000, accroissant par conséquent la précision et la sensibilité relative des détecteurs.

La seconde étape dans cette procédure séquentielle est la séparation de cette solution par C.P.G. à haute résolution. Pour analyser par C.P.G. à haute résolution, on injecte la solution concentrée (comme décrite ci-dessus) sans dilution et l'on obtient des pics très pointus. L'étroitesse des pics est essentielle à un bon travail analytique quantitatif. L'absence de dilution en C.P.G. est illustrée par la figure 2, où même une dilution facteur 10 de l'échantillon avant injection ne laisse pas apparaître un étalement de pic.

En outre, la C.P.G. à haute résolution permet de modifier la phase mobile afin d'augmenter la réponse des détecteurs.

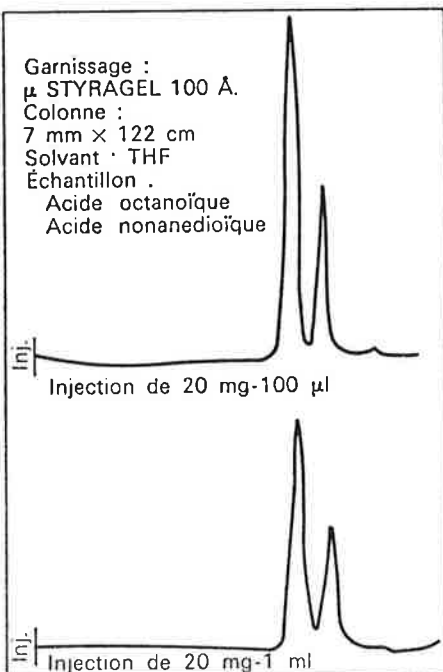


Figure 2.

Ceci est extrêmement important lorsque l'échantillon n'absorbe pas en U.V. et qu'il nécessite une détection par réfractométrie différentielle.

Plus que tout autre mode de C.L., on peut considérer que dans la C.P.G. la phase mobile est un véhicule pratiquement inerte. Pour cette raison, des changements dans la composition du solvant, n'ont qu'un effet mineur sur la qualité de la séparation. Ainsi les solvants peuvent être choisis de façon telle que la différence entre les indices de réfraction de l'échantillon et du solvant soit maximum pour accroître la sensibilité du détecteur.

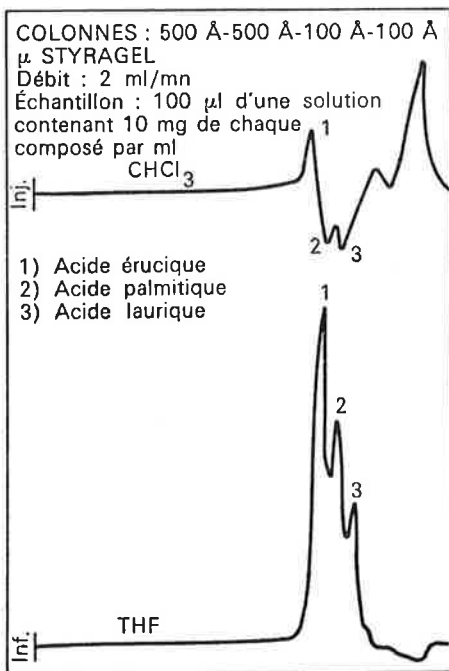


Figure 3.

Ceci est illustré dans la figure 3, où la détection de la séparation de 3 acides gras nécessite un réfractomètre différentiel. Quoique la séparation obtenue avec le chloroforme comme phase mobile soit bonne, la hauteur des pics n'est cependant pas grande, et l'on voit sur le même chromatogramme des pics positifs et négatifs. Ce dernier point n'est pas rare avec l'emploi d'un réfractomètre différentiel, puisque l'indice de réfraction de l'échantillon peut être supérieur ou inférieur à celui du solvant. Cependant l'apparition successive de pics positifs et négatifs sur le même chromatogramme, de produits similaires, est souvent une indication sur le fait que l'indice de réfraction des composants de l'échantillon est proche de celui de la phase mobile. On répète donc la séparation de ces acides gras avec une nouvelle phase mobile (tétrahydrofurane) de façon à augmenter la sensibilité.

La réponse du premier pic est approximativement multipliée par 6, et ce en gardant la même atténuation du détecteur dans les deux opérations.

Il est important de noter que malgré la grande différence de polarité qui existe entre le $CHCl_3$ et le T.H.F., la qualité de la séparation n'est pas affectée par le changement de phase mobile.

Séparation de composants ayant une grande différence de polarité sans gradient de solvant

En chromatographie en phase normale ou inverse, les molécules, dont le groupe fonctionnel dominant a une polarité égale à celle de la surface de la phase stationnaire,

sont fortement retenues, alors que celles qui diffèrent beaucoup sont peu retenues, voire pas du tout.

On peut s'attendre par exemple à avoir une plus grande rétention (donc un plus grand volume d'élution) du méthyl phthalate par rapport au benzène sur une colonne de silice.

La séparation des composants qui diffèrent beaucoup en polarité nécessite donc une variation dans la composition du solvant (gradient de solvant) pour obtenir une séparation complète dans un laps de temps raisonnable.

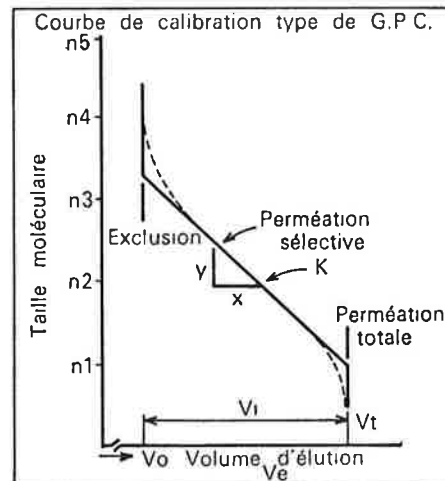
Un des principaux bénéfices de la C.P.G. à haute résolution réside dans le fait que ces différences de polarité ne rendent pas nécessaires les gradients de solvant.

Le pouvoir séparateur des colonnes garnies de microphase* est si grand que les composants peuvent être facilement obtenus purs s'ils ne diffèrent que de 10 à 15 % en taille effective en solution.

Informations sur les composants de l'échantillon

En C.P.G., les molécules qui sont plus grandes que les pores de la phase stationnaire ne sont pas retenues par le système, et seront de ce fait éluées avec le front de solvant. Les molécules plus petites que les pores les plus fins entreront dans presque tous les pores et auront de ce fait le temps de rétention le plus long. Les molécules dont les dimensions en solution se situent entre ces deux extrêmes se sépareront à une certaine vitesse en fonction de leur taille selon que celle-ci se rapproche de l'un ou l'autre de ces extrêmes.

Ainsi, une des caractéristiques spécifiques de la C.P.G. est la possibilité de prédire : « Les plus grosses molécules sortent toujours de la colonne avant les petites » (fig. 4).



1. La limite d'exclusion V_0 .
2. La limite de perméation totale V_i .
3. La zone d'utilisation du garnissage.
4. Le ratio de capacité maximum de la colonne (V_i/V_0).
5. La linéarité de la courbe dans la zone d'utilisation (Plus la partie linéaire est longue, plus l'interprétation des résultats est aisée).
6. La perméation sélective de la colonne. (Plus la courbe est horizontale, meilleure est la résolution).

Figure 4.

Lorsqu'on travaille sur des mélanges divers ou inconnus, ceci permet de calibrer le système à l'avance. En établissant une corrélation entre le volume d'élution et la taille moléculaire apparente avec un système

(*) μ STYRAGEL® (WATERS ASS.).

à 2 détecteurs, il est possible d'avoir des informations d'une part, sur la concentration relative de chaque composant, qu'ils soient absorbants dans l'U.V. ou dans le visible (220 à 700 nm), et d'autre part sur la taille relative des composants selon leur ordre d'éluion.

Ces informations s'obtiennent avec un simple chromatogramme.

Minimum de travail préalable.

Comme la C.P.G. ne dépend que des capacités différentes des molécules à migrer dans ou hors des pores de la phase stationnaire, nous n'avons pas à nous occuper de la polarité de surface de la phase stationnaire, et, ou, de modifier la composition du solvant. Tout ce que nous avons à faire dans la C.P.G. à haute résolution est de nous assurer que l'on a sélectionné le garnissage avec une zone de porosité adéquate et que l'on a choisi un solvant dans lequel l'échantillon est soluble. Dès que l'échantillon est dissout, il est simplement injecté dans la colonne.

Un minimum de temps est requis pour ce travail préalable. Ainsi une petite expérience en L.C. est suffisante pour utiliser cette technologie avec succès.

Maximum de rendement.

Le temps nécessaire à une séparation par C.P.G. à haute résolution, une fois connu, permet de faire de multiples injections, en évitant bien entendu un chevauchement. Ainsi plusieurs échantillons peuvent être séparés sur la même colonne, pratiquement en même temps.

Cette procédure permet d'utiliser le plus efficacement l'appareil et surtout elle permet une économie de temps à l'opérateur.

Récupération totale de l'échantillon

Dans les types de C.L. où il y a des sites actifs sur la surface des particules de garnissage de la colonne, les composants de l'échantillon peuvent adsorber si étroitement sur ces sites qu'il faut de profondes modifications pour une éluion totale de l'échantillon. Si le manipulateur ne s'en rend pas compte, il peut perdre des échantillons.

Tout au contraire les colonnes de μ STYRAGEL n'ont pas de sites actifs, ainsi il ne peut y avoir adsorption et perte d'échantillon. Une récupération totale de l'échantillon est assurée.

Les résultats de l'analyse qualitative et

quantitative sont par conséquent plus sûrs que ceux obtenus dans les autres types de C.L.

Quelques composés, particulièrement les organométalliques, se modifient ou se décomposent avec des groupes fonctionnels polaires ou acides. Comme la surface du μ STYRAGEL est dépourvue de ces groupes, ces particules de garnissage conviennent particulièrement pour la séparation de ces molécules très sensibles.

Séparations analytiques ou préparatives

Un exemple très clair de la capacité de chargement des colonnes de μ STYRAGEL est donné dans la figure 5. Tout d'abord, la séparation analytique d'acide octanoïque et d'acide nonanedioïque est réalisée en

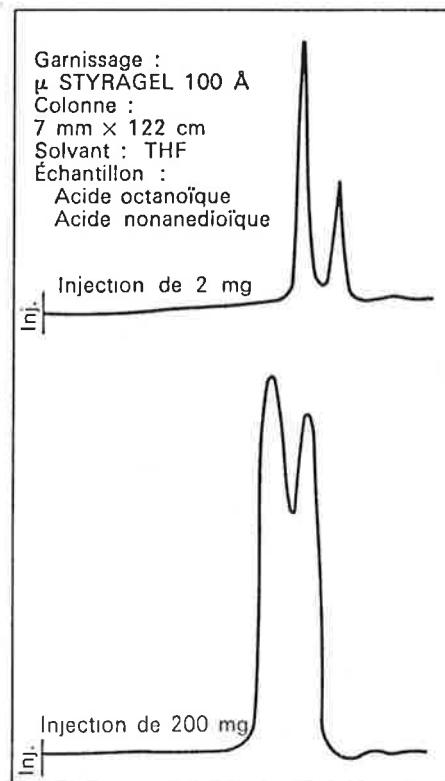


Figure 5.

injectant 1 mg de chaque composé (ce qui déjà représente un fort chargement analytique pour les séparations par C.L.).

On obtient une bonne séparation en 35 minutes environ. La séparation suivante réalisée avec 100 mg de chaque composé a demandé le même temps sur la même colonne.

Au premier examen, ce chromatogramme semble suggérer que nous sommes dans des conditions de surcharge, et qu'il y a une perte de pureté.

Cependant, la modification de la hauteur relative des pics dans le chromatogramme préparatif indique que c'est le détecteur réfractométrique qui est proche de la saturation et non la colonne.

Pour confirmer cette hypothèse, l'acide octanoïque (qui est bien entendu le 2^e pic) est recueilli, dilué au sixième et réinjecté dans les mêmes conditions (Fig. 6).

Il n'apparaît alors qu'un pic, c'est-à-dire qu'il n'y a pas eu de chevauchement entre les 2 acides.

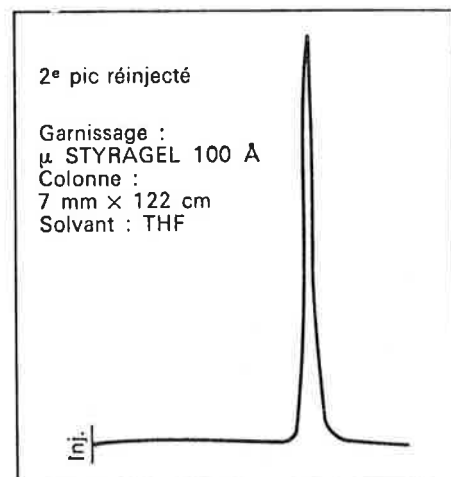


Figure 6.

Même 100 mg de chaque composé n'ont pas surchargé la colonne de μ STYRAGEL. En augmentant la longueur de la colonne, ou en diminuant le débit, on peut améliorer la séparation et avoir des passages préparatifs plus importants.

Ainsi avec la C.P.G. à haute résolution des chargements préparatifs significatifs peuvent être séparés en 30 minutes ou moins.