

# Chromatographie sur colonne

## I. Principe général de la chromatographie

**Chromatographie** : méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser ou à séparer à l'égard de deux phases : la phase stationnaire et la phase mobile.

- La phase stationnaire (ou phase fixe) est un solide, le plus souvent de la silice ou de l'alumine ;
- La phase mobile (ou éluant) est un liquide, corps pur ou mélange.

Dans la majorité des cas, on réalise une chromatographie en phase normale, ce qui signifie qu'on travaille avec une phase stationnaire plutôt polaire et une phase mobile plutôt apolaire.

### Vitesse de migration des composés

Un composé migre d'autant plus lentement qu'il est fortement adsorbé sur la phase stationnaire et qu'il interagit peu avec l'éluant. La vitesse de migration repose donc sur les interactions faibles (liaisons hydrogène et interactions de Van der Waals) entre le composé et les deux phases.

Affinité pour une phase  
stationnaire polaire



Acides carboxyliques et amines  
polaires protiques

Alcools  
polaires protiques

Aldéhydes, cétones, esters  
polaires aprotiques

Ethers  
peu polaires aprotiques

Hydrocarbures, dérivés halogénés  
apolaires aprotiques

Affinité pour une phase  
mobile apolaire



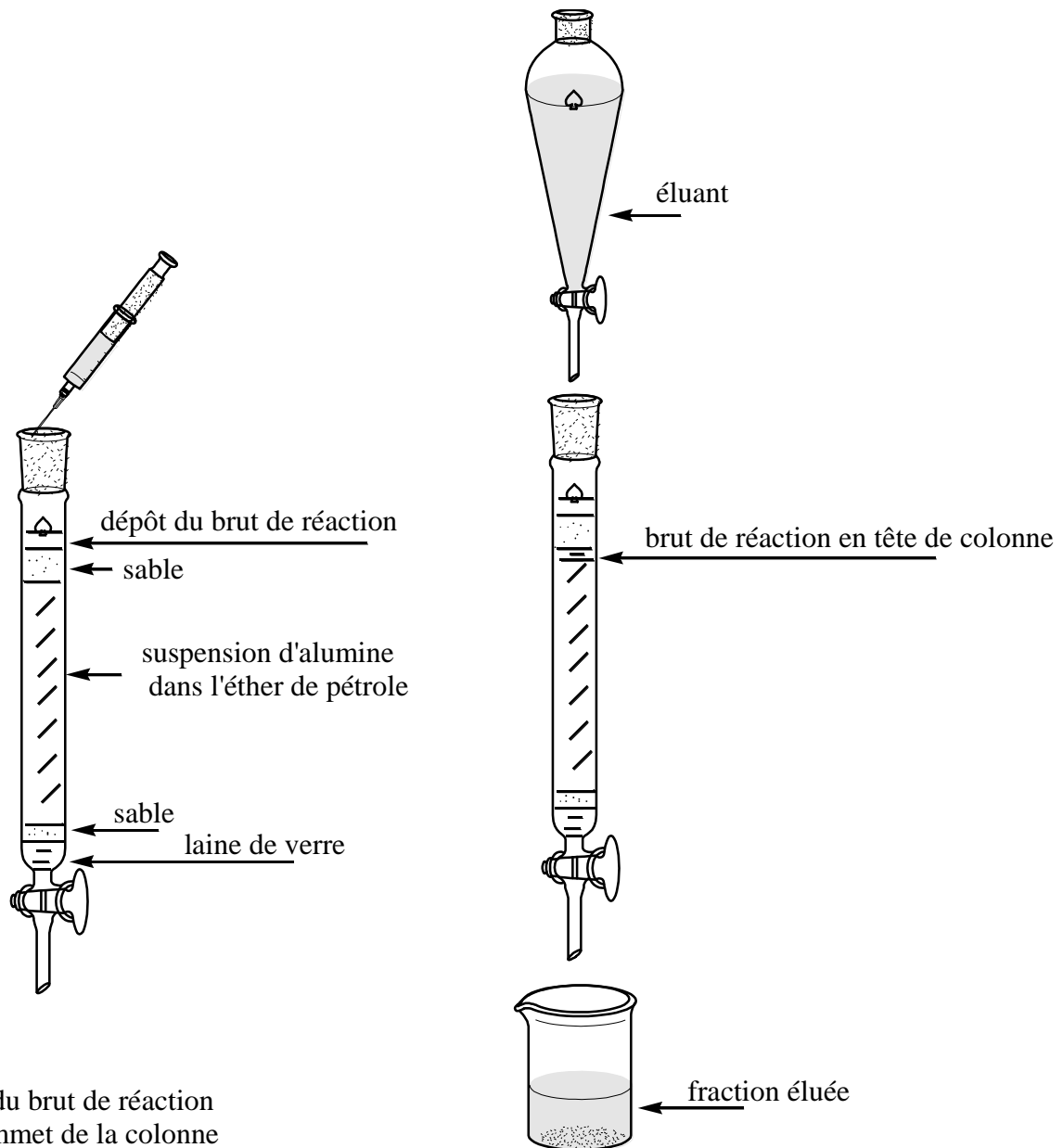
Vitesse de migration  
croissante



## II. Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne, tout comme la chromatographie sur couche mince (CCM), est une chromatographie d'adsorption : la migration des constituants résulte d'une succession d'adsorption et de désorptions sur la phase stationnaire. Cette technique peut être utilisée afin de :

- **séparer** les constituants d'un mélange ;
- **purifier** un composé : c'est-à-dire le séparer des impuretés présentes.



dépôt du brut de réaction  
au sommet de la colonne  
de chromatographie

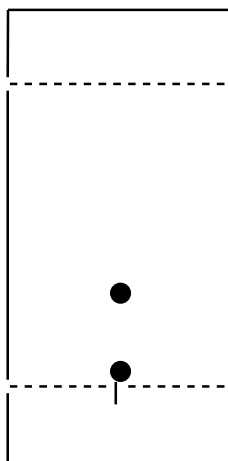
Elution du brut de réaction

## Choix de l'éluant – CCM préparatives

Avant d'entreprendre une chromatographie sur colonne, des CCM sont réalisées avec des éluants différents afin de déterminer les conditions de séparation optimales. Une bonne séparation nécessite que :

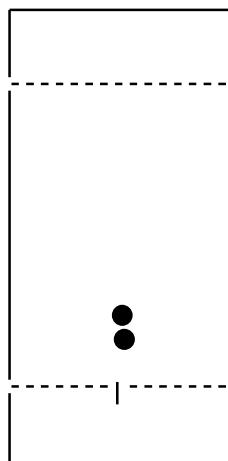
- les composés ne migrent pas au-delà du premier tiers de la plaque ;
- les taches soient suffisamment séparées.

Trois exemples de CCM avec des éluants différents pour une même phase stationnaire



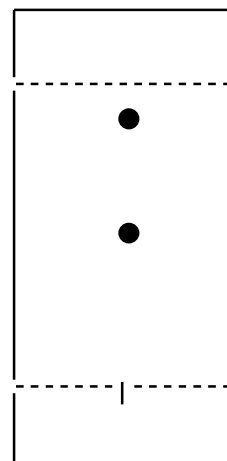
Eluant adapté pour séparer facilement les composés

(a)



Séparation difficile

(b)



migration trop rapide qui ne permet pas la séparation

(c)

Changement d'éluant en cours de séparation : La phase mobile est en générale un mélange de deux solvants : l'un polaire, l'autre apolaire. Au cours de la séparation, et après avoir récupéré les produits apolaires, on pourra augmenter progressivement la polarité de l'éluant afin de récupérer les produits les plus polaires. On réalise alors un gradient d'éluant.

Remarque : La migration des produits peut varier entre la CCM et la chromatographie sur colonne à cause de la différence de granulométrie entre les adsorbants employés.

## Choix de la phase stationnaire

### Stabilité des composés sur la phase stationnaire

- La silice est acide : on évitera donc, par exemple, de chromatographier un alcool tertiaire qui risque de se déshydrater en milieu acide ;
- L'alumine existe sous des formes acide, basique ou neutre : on évitera donc, par exemple, de chromatographier un composé carbonyle énolisable, qui risque de subir une condensation aldolique.

### Quantité d'adsorbant utilisée

Elle dépend principalement de deux facteurs : la masse de l'échantillon à purifier et la difficulté de la séparation.

- Cas de la CCM (a) : séparation « facile »  
30 g d'adsorbant pour 1 g de produit
- Cas de la CCM (b) : séparation « difficile »  
Jusqu'à 100 g d'adsorbant pour 1 g de produit

Remarque : Si l'éluant contient de l'eau, nous n'utiliserons pas l'alumine comme phase fixe car celle-ci est hygroscopique (absorbe ou adsorbe l'eau et devient très compact, ce qui empêche le passage de l'éluant à travers la colonne).

### III. Mise en œuvre expérimentale

#### ➤ Préparation de la colonne (phase fixe)

L'adsorbant n'est pas introduit en poudre dans la colonne mais sous la forme d'un gel : mélange d'adsorbant et d'éluant).

L'opération de remplissage de la colonne conditionne l'efficacité de la séparation. Il ne faut pas qu'il y ait de bulles ou de zone sans phase fixe car on aurait alors des chemins préférentiels nuisant à une bonne séparation des composés.

- Déposer un petit morceau de coton dans le bas de la colonne, puis ajouter un peu de sable de Fontainebleaux, tapoter la colonne afin d'obtenir une surface aussi plane que possible ;
- Fixer verticalement la colonne à l'aide d'une pince (ou deux si la colonne est grande) ;
- Déposer un récipient sous la colonne, dans lequel on peut verser l'éluant si la colonne est trop pleine ;
- Introduire le gel à l'aide d'une spatule, c'est-à-dire la phase fixe « mouillée par l'éluant » dans la colonne. Il faut bien s'assurer que la couche supérieure d'adsorbant est parfaitement horizontale et qu'il n'y a ni fissure, ni bulle d'air ;
- Ajuster le niveau d'éluant à 2 ou 3 cm au-dessus de la couche supérieure d'adsorbant puis ajouter environ 1 cm de sable de Fontainebleau. Tapoter la colonne pour tasser le sable. Cette seconde couche de sable permet de ne pas déformer la couche supérieure d'adsorbant lors du dépôt du mélange à séparer et des ajouts d'éluant.

La colonne est prête.

**Il est important de ne jamais laisser la colonne s'assécher !** Il faut donc toujours conserver au dessus de la phase stationnaire une certaine hauteur d'éluant (même très petite). Dans le cas contraire, des canaux peuvent se former et créer ainsi des chemins préférentiels pour le passage des composés à purifier.

#### ➤ Dépôt de l'échantillon

- Avant de réaliser le dépôt, on ajustera le niveau du solvant pour qu'il affleure à la surface de l'adsorbant.
- Un échantillon liquide sera déposé tel quel, à la pipette, très doucement, sans toucher les parois de la colonne, en faisant attention à ne pas déformer la surface de la phase stationnaire pendant cette opération, en s'aidant des parois de la colonne. Adsorber uniformément le composé en sommet de colonne en laissant couler un peu d'éluant. Pour déposer les mélanges solides, il est possible de les dissoudre dans la quantité minimale de solvant, l'éluant si possible.

#### ➤ Elution et récupération des fractions

- Lorsque l'échantillon a pénétré à la surface de la phase stationnaire, remplir la colonne d'éluant puis **éluer** : régler le débit en bas de la colonne au **goutte à goutte** (1 à 2 gouttes par seconde). Une ampoule de coulée (ou une ampoule à décanter) permet d'assurer une alimentation continue en goutte-à-goutte.
- Les fractions sont récupérées dans des récipients numérotés. L'analyse se fait par CCM et les fractions de même composition seront rassemblées.
- Enfin le solvant peut être évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif.

L'opération de séparation est terminée.