

Chapitre II

Chromatographie Liquide classique

1. La chromatographie sur colonne

1.1. Introduction

La chromatographie sur colonne est une méthode préparative qui permet de séparer et d'isoler les constituants d'un mélange. Cette technique est fondée principalement sur des phénomènes d'adsorption et permet de séparer pratiquement tous les mélanges possibles. Il suffit de trouver les bonnes conditions.

1.2. Description de la méthode

La phase stationnaire remplit une colonne de longueur et de section variables. Le mélange, en solution très concentrée, est déposé au sommet de la colonne. La séparation des constituants du mélange résulte de l'écoulement continu d'un éluant à travers la colonne par gravité. Dans la technique classique, l'éluant est un solvant unique mais on peut accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des constituants du mélange.

1.3. Phase stationnaire

Une grande surface spécifique de l'adsorbant est souhaitable pour obtenir de meilleures séparations. Les adsorbants les plus utilisés sont :

L'alumine (Al_2O_3) sous forme acide, basique ou neutre. Cet adsorbant ne peut être employé qu'avec des composés organiques stables (l'alumine acide entraîne la

déshydratation des alcools tertiaires, l'alumine basique entraîne l'hydrolyse des esters). L'alumine est un adsorbant polaire ; le constituant le plus polaire sera le plus fortement fixé et c'est le constituant le moins polaire qui sera élué le premier.

Gel de silice (SiO_2), se présente sous forme d'une poudre blanche utilisée en particulier pour séparer des composés organiques qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être séparés sur l'alumine. La granulométrie d'un adsorbant employé en chromatographie sur colonne est plus importante que celle d'un adsorbant employé en CCM (80 à 200 μm au lieu de 70 μm). Les adsorbants suivants sont classés selon l'ordre croissant de leurs forces d'interactions avec les composés polaires : papier, cellulose, amidon, sucres, carbonate de sodium, oxyde de magnésium, gel de silice, alumine, charbon activé.

1.4. Eluant

L'éluant généralement employé est un mélange de deux solvants. Le plus souvent, au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les constituants les moins polaires (les moins retenus par l'adsorbant) ; on augmente ensuite la polarité de l'éluant par addition graduelle du solvant le plus polaire ; on élue ainsi les constituants les plus polaires. Il faut faire des essais sur CCM avec différents éluant pour avoir une bonne séparation entre les produits. Un R_f proche de 0,3 pour le produit le moins polaire.

1.5. Vitesse d'élution

La vitesse d'élution doit être la plus constante possible; elle doit être suffisamment lente pour que le soluté soit plus près de l'équilibre entre les phases mobile et stationnaire. Si la vitesse d'élution est trop faible, les constituants diffusent dans l'éluant. Le chromatogramme présente alors des bandes larges et la séparation est médiocre ; une vitesse d'élution élevée n'est autorisée que dans le cas où les substances à séparer ont des polarités très voisines.

1.6. Dimension de la colonne

La hauteur de la colonne est égale à sept à dix fois le diamètre intérieur de la colonne. Il faut laisser un espace libre d'environ 10 cm au-dessus de l'adsorbant pour faire couler le solvant. Les colonnes classiques ont à leur base une plaque de verre fritté qui permet l'écoulement libre de l'éluant tout en empêchant le passage de l'adsorbant (Fig.1.1). On peut utiliser une burette, au fond de laquelle on place du coton.

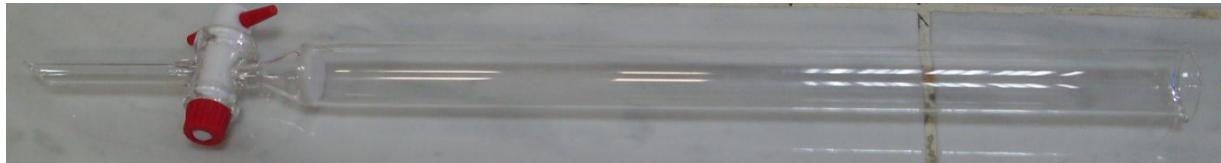


Fig.1.1 Colonne classique

1.7 Remplissage de la colonne

L'opération de remplissage de la colonne doit être le plus homogène possible et totalement exempt de toute bulle d'air ou de zone sans phase stationnaire. Les surfaces inférieures et supérieures de l'adsorbant doivent être parfaitement horizontales. Si ces conditions ne sont pas remplies, on aura alors des zones déformées pendant la séparation des composés. Il existe deux modes de remplissage de la colonne.

Remplissage par voie humide: on prépare dans un bécher, un mélange parfaitement homogène de l'adsorbant et du moins polaire des deux solvants de façon à obtenir une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement (on verse l'adsorbant dans le solvant par petites quantités et en agitant). On verse suffisamment de bouillie et on frappe les parois de la colonne pour favoriser le tassemement de l'adsorbant.

Remplissage par voie sèche: on remplit la colonne au deux tiers avec le moins polaire des deux solvants puis on ajoute l'adsorbant en poudre par petites portions successives.

1.8 Dépôt de l'échantillon

Si l'échantillon est liquide, il est déposé tel quel. Si l'échantillon est solide, on le dissout dans un minimum du moins polaire des deux solvants. On ajuste d'abord le niveau du solvant pour qu'il soit juste au-dessus de la surface supérieure de l'adsorbant. Ensuite, robinet fermé, on coule l'échantillon (pur ou en solution très concentrée) au sommet de la colonne en essayant de le distribuer de la façon la plus uniforme possible sur les bords de la colonne. On ouvre le robinet un court instant de façon que l'échantillon pénètre dans la colonne et soit adsorbé en une zone cylindrique de faible épaisseur au sommet de la colonne.

1.9 Alimentation en solvant

L'alimentation en solvant s'effectue à l'aide d'une ampoule de coulée. On doit s'assurer, durant l'élution, que la surface de l'adsorbant est toujours recouverte de solvant et n'est jamais au contact de l'air. Lorsque débute l'alimentation en solvant, on règle le débit de l'alimentation de façon qu'il soit le même que celui de l'écoulement au bas de la colonne (vitesse de 5 à 50 gouttes par minute). Le volume de chaque fraction recueillie varie de 1 à 50 mL selon les cas. On collecte les fractions et on les analyse (Fig.1.2).

1.10 Analyse des fractions

Lorsque les composés qui se séparent forment des zones colorées dans la colonne ou sont fortement fluorescents aux U.V, il est facile de les repérer soit directement sur la colonne soit dans les fractions recueillies. La récupération s'effectue alors simplement en réunissant les fractions appropriées et en évaporant le solvant. Si les produits ne sont pas colorés, après une analyse approprié (HPLC, CCM, IR et UV) réunir les fractions correspondant au produit désiré et évaporer le solvant.

La chromatographie sur colonne présente plusieurs inconvénients :

- Elle nécessite une grande quantité d'éluant
- La durée de l'élution est en général très grande (au minimum, plusieurs heures)
- La détection des composés exige une attention constante
- Il est indispensable de coupler cette chromatographie avec d'autres méthodes de façon à pouvoir détecter les constituants du mélange.

Les paramètres influençant la séparation sont :

- Le diamètre et la hauteur de la colonne
- La quantité de la phase stationnaire et sa granulométrie
- Le débit de l'éluant et sa polarité

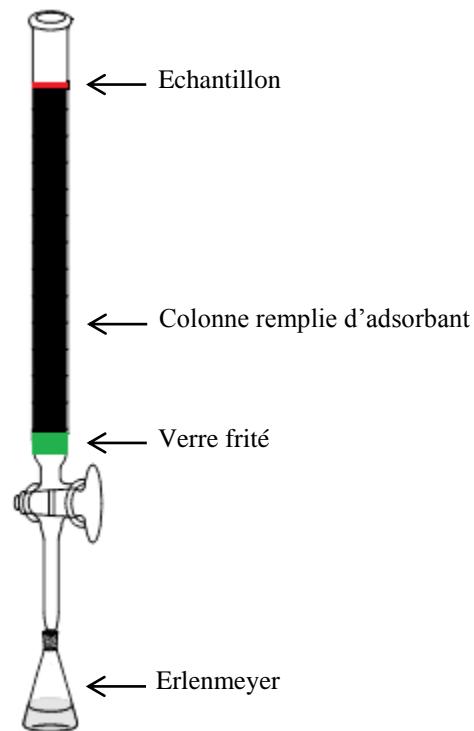


Fig.1.2 : Schéma d'une colonne chromatographique

Exercices

Exercice 1.1

On réalise une chromatographie sur colonne d'un sirop de menthe, puis on recueille deux fractions colorées F1 et F2.

Les spectres d'absorption de ces fractions, ont l'allure ci-après.

Le colorant jaune tartrazine (E102) présente un maximum d'absorption pour la longueur d'onde $\lambda_{(E102)} = 420 \text{ nm}$ et le colorant bleu patenté (E131) présente un maximum d'absorption pour la longueur d'onde $\lambda_{(E131)} = 625 \text{ nm}$. La chromatographie a-t-elle permis de séparer complètement les deux constituants ? Justifier.

