Protocole de montage de chromatographie sur colonne

Lucie Marpaux

1 Bibliographie

— Bernard "Techniques expérimentales en chimie"

2 Matériel et réactifs

— Colonne
— Plaque de chromatographie sur couche mince
— Silice
— Eluant

3 Principe

La chromatographie sur colonne est une méthode de purification permettant de séparer les constituants d'un mélange.

4 Protocole

4.1 CCM préparatoires

Réaliser des CCM avec des éluants différents pour déterminer les conditions de séparation optimales.
Pour que la colonne fonctionne correctement il faut que :
— Les composés ne migrent pas au delà du premier tiers de la plaque (sinon la migration sera trop rapide pour que la séparation soit efficace)
— Les taches soient suffisamment séparées

4.2 Montage de la colonne

Préparation du gel Pour préparer le gel prendre environs 30 g (soit 12 mL avec une densité de 2,65 g/mL **ne pas ouvrir le pot de silice en dehors de la hotte, très volatile**) de silice pour 1 g de produit. Ajouter la silice progressivement dans un volume d'environs 4O mL d'éluant et homogénéiser entre chaque ajout avec une baguette en verre. Le gel doit être suffisamment fluide pour pouvoir couler sur les parois de la colonne, si ce n'est pas le cas, ajouter de l'éluant.

Remplissage de la colonne
— Fixer la colonne de chromatographie, robinet fermé en s'assurant qu'elle soit bien verticale.
— Placer un bout de coton au fond de la colonne afin de retenir son contenu. Le tasser legerement avec une baguette en verre.
— Verser approximativement 5 cm d'éluant dans la colonne
— Ajouter environs 1 cm de sable de Fontainebleau (jusqu'à la partie rectiligne de la colonne). S'assurer que la surface est horizontale. Cette couche permet d'obtenir une couche d'adsorbant horizontale.
— Par petites portions : Introduire le gel en le faisant couler sur les parois pour ne pas déformer la couche de sable. Tapoter sur les parois de la colonne pour assurer un tassement efficace du gel. Ouvrir le robinet pour évacuer le surplus d'éluant sans assécher la silice. Rincer les parois avec de l'éluant afin d'entrainer le gel qui pourrait y adhérer.
— Recommencer jusqu'à avoir mis tout le gel. La couche supérieur doit être parfaitement horizontale. Il ne doit y avoir ni bulle ni fissure.

— Ajouter 2 ou 3 cm d'éluant au dessus de la colonne puis ajouter environs 1 cm de sable de Fontainebleau. Tapoter la colonne pour tasser le sable.

Dépot du mélange

— Diluer le mélange à purifier dans un minimum de solvant le moins polaire.
— Ajuster le niveau d'éluant de façon à affleurer la surface du sable.
— Faire le dépot le plus proche de la surface du sable avec une pipette pasteur en faisant des cercles à l'intérieur de la colonne.
— Ouvrir le robinet jusqu'à assechement du sable pour que le dépot pénètre dans la couche d'adsorbant (la silice).
— Si besoin, ajouter, à l'aide d'une pipette pasteur le minimum d'éluant pour laver les parois et faire passer dans la silice.
— Ajouter quelques centimètres d'éluant à la pipette Pasteur tout en gardant l'horizontalité du sable. Puis ajouter plus d'éluant (plus rapidement).

Elution

— Regler le débit en bas de colonne au goutte à goutte (1 à 2 gouttes par seconde).
— Receuillir des fractions de volumes constants dans des tubes numérotés.
— Faire des CCM sur les fractions.

5 Résumé en schéma

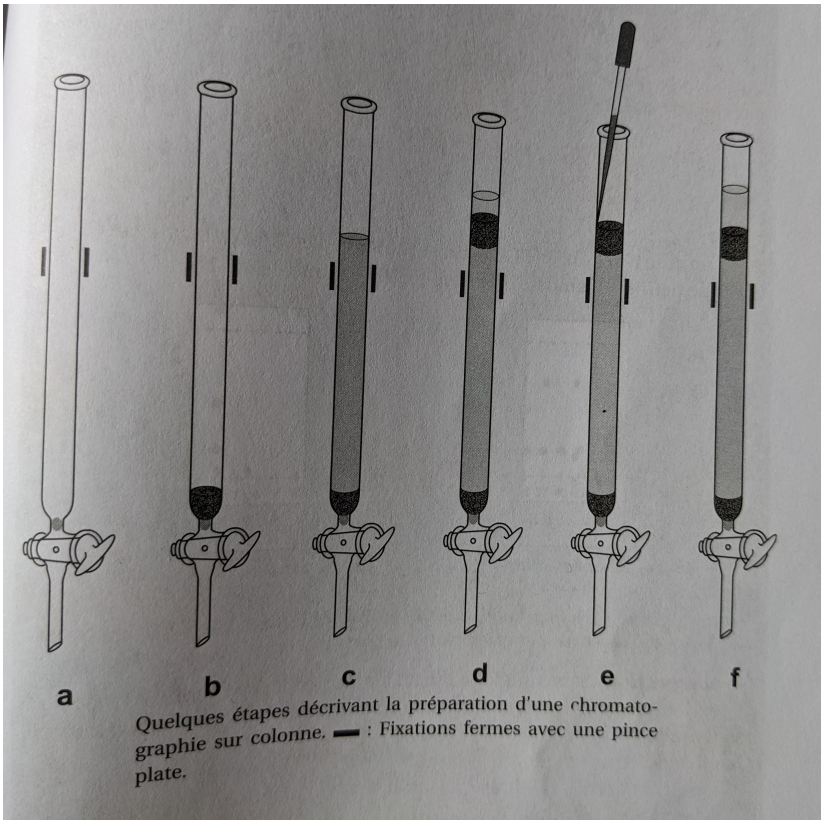

Figure 1 – Colonne