fiche sur la technique de la chromatographie sur colonne

publié le 25.11.02 |par anthony bourgeais, edith thummen

la chromatographie d'adsorption est une technique de séparation de composés basée sur la différence d'affinité existant entre ces composés, la phase mobile, qui entraîne les composés, et la phase stationnaire. en effet, selon la plus ou moins grande affinité entre les solutés et la phase stationnaire ou mobile, les constituants du mélange migrent à des vitesses différentes et sont ainsi séparés.

1. introduction

la chromatographie d'adsorption est une technique de séparation de composés basée sur la différence d'affinité existant entre ces composés, la phase mobile, qui entraîne les composés, et la phase stationnaire. en effet, selon la plus ou moins grande affinité entre les solutés et la phase stationnaire ou mobile, les constituants du mélange migrent à des vitesses différentes et sont ainsi séparés.

la technique présentée ici est la chromatographie sur colonne, elle utilise une phase stationnaire introduite dans une colonne de verre. c'est une technique très largement utilisée notamment lors de réaction en chimie organique, pour séparer et purifier les différents constituants d'un mélange. elle fut découverte en 1906 par le botaniste russe tswett, qui montra que l'on pouvait séparer des colorants végétaux en faisant passer leur solution dans l'éther de pétrole à travers une colonne remplie de carbonate de calcium.

au cours de cette séquence nous verrons sur l'exemple d'un mélange de colorants, extraits du sirop de menthe, le principe de cette technique en utilisant comme phase stationnaire la silice (sio_2).

2. présentation du matériel

nous avons ici besoin de ces différents éléments :

- **pot silice,**
- **les deux éluants : eau salée à 40g/l, puis éthanol,**
- **entonnoir,**
- **sable et coton,**
- **colonne en verre,**
- **béchers,**
- **pipettes pasteur, propipettes, verre à pied,**
- **solution contenant le mélange sirop menthe,**
- **support et tubes à essai,**

- laine verte (contenant les colorants).

revenons sur quelques uns de ces éléments :

- le pot de silice : il contient la phase stationnaire finement divisée à introduire dans la colonne, car toute séparation chromatographique implique l'écoulement d'une phase mobile au contact d'une phase stationnaire de grande surface.
- la colonne en verre : selon la quantité de produits à séparer et la qualité de la séparation, on choisira des colonnes de diamètre et de longueur plus ou moins importants.
- les colorants du sirop de menthe ont été extraits à l'aide d'un morceau de laine préalablement lavé en milieu basique dans une solution d'ammoniac à 1% d'ammoniaque, puis rincé à l'eau. l'extraction se fait en milieu acide à l'aide d'acide acétique dilué, et le relargage s'effectue en milieu basique dans la solution ammoniacale à 1%.

3. mise en place du matériel

la réalisation d'une colonne impose de respecter certaines règles qui permettront une séparation efficace.

on place tout d'abord un morceau de coton au fond de la colonne que l'on recouvre d'éluant, afin d'éliminer l'air emprisonné dans le coton. on rajoute un demi centimètre du sable environ au dessus du coton, afin que la phase stationnaire ne puisse pas s'échapper de la colonne. on considérera ici que le sable n'a pas de propriétés adsorbantes.

enfin, on remplit la colonne avec la phase stationnaire en réalisant une suspension de silice dans le premier éluant qui est l'eau salée. le gel ainsi formé est introduit dans la colonne grâce à l'entonnoir. on rince avec l'éluant et on le laisse s'écouler.

une fois la colonne remplie, on rajoute un demi centimètre de sable en tête de colonne au dessus de la surface de silice, après s'être assuré que cette dernière était plane. cette couche permet de réaliser des dépôts et d'ajouter de l'éluant sans perturber la surface de silice, ce qui empêcherait une bonne séparation. on s'assure régulièrement de ne pas assécher la phase stationnaire, en vérifiant qu'il reste toujours de l'éluant au niveau du sable.

4. réalisation de l'expérience

on amène le niveau d'éluant au niveau de la surface du sable. on peut alors déposer délicatement la solution de colorants en haut de colonne à la pipette pasteur afin de ne pas perturber la surface de silice.

on ouvre le robinet pour que les colorants arrivent au niveau de la silice. on rajoute quelques millilitres d'éluant et on ouvre de nouveau le robinet afin de s'assurer que toute la solution soit en tête de la colonne de silice.

on peut alors ajouter l'éluant. les premiers millilitres doivent toujours être ajoutés avec précaution à la pipette pasteur afin de ne pas perturber la surface de silice. ensuite, on peut ajouter l'éluant plus rapidement en le versant directement dans la colonne.

l'éluant utilisé ici dans un premier temps est l'eau salée, il permet l'élution de la tartrazine , alors que le bleu patenté v reste fortement retenu par la silice. après avoir récupéré la tartrazine, on change d'éluant pour récupérer le bleu patenté.

on utilise ici de l'éthanol. en effet, la tartrazine a peu d'affinité pour la silice par rapport à l'éluant, qu'on utilise l'eau salée ou l'éthanol. c'est pourquoi elle est entraînée facilement. par contre, le bleu patenté v développe plus d'interaction avec la silice que la tartrazine, et l'eau salée n'est alors pas un éluant capable de l'entraîner, contrairement à l'éthanol.

le bleu patenté est entraîné par la phase mobile, et il est récupéré dans un autre tube. il est souvent utile de réaliser des chromatographies sur couche mince sur chaque tube pour vérifier où sont les composés à séparer, dans le cas où ceux-ci ne sont pas colorés.



5. conclusion

la technique de la chromatographie sur colonne permet la séparation des différents constituants d'un mélange, mais elle peut être utilisée couplée à un moyen de détection, comme par exemple une spectroscopie uv – visible ou une spectrométrie de masse et on obtient ainsi une chaîne complète automatisable d'analyse.

CRÉDITS

AUTEUR(S)/AUTRICE(S)

anthony bourgeais

professeur agrégé de chimie

AUTEUR(S)/AUTRICE(S) ET MISE EN LIGNE

edith thummen

professeure agrégée de chimie, conceptrice et responsable éditoriale du site culturesciences-chimie de 2002 à 2004 en collaboration avec d. jaouen et j.b. baudin, et avec le soutien des membres du département de chimie de l’ens. enseignante en cpge depuis 2004.

LICENCE DU TEXTE DE L'ARTICLE

creative commons - attribution - pas d'utilisation commerciale