

*Chapitre 1. Les techniques séparatives : la
Chromatographie*



Fig.I.1.2 : CCM d'une encre noire (une encre noire est un mélange d'encres de plusieurs couleurs)



Fig.I.1.3 : CCM de 10 huiles essentielles (révélation à la vanilline)

I.2- Chromatographie sur colonne

II.2.1- Description et principe

Elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes.

Elle présente cependant plusieurs inconvénients :

- de grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution
- la durée de l'élution est généralement très grande
- la détection des composés exige une attention constante.

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur et de section variables ; l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité.

II.2.2-Facteurs dont dépend la séparation

Quatre facteurs interviennent :

- l'adsorbant
- l'éluant
- la dimension de la colonne
- la vitesse d'élution

-Adsorbant

Le plus utilisé est l'alumine, le gel de silice est également fréquemment utilisé pour la séparation de composés qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être traités par l'alumine.

La quantité d'adsorbant dépend de la difficulté de la séparation et de la masse d'échantillon.

-Eluant

L'éluant est en général un mélange de deux solvants. Au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les substances les moins retenues par l'adsorbant (les moins polaires). Ensuite on fait varier la composition de l'éluant en additionnant graduellement le solvant le plus polaire. Ainsi les composés les plus polaires, retenus sur l'adsorbant, ne migreront que graduellement vers le bas de la colonne.

II.2.3-Remplissage de la colonne

C'est l'opération la plus délicate car le remplissage doit être le plus homogène possible et exempt de bulle d'air. Les surfaces inférieure et supérieure de l'adsorbant doivent être parfaitement horizontales. La colonne étant verticale, le remplissage peut être réalisé selon deux méthodes au choix.

-Remplissage par voie humide :

On prépare dans un bécher un mélange homogénéisé de l'adsorbant et du moins polaire des solvants utilisé pour le développement en ajoutant par petites quantités l'adsorbant dans le solvant pour obtenir une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement.

A l'aide d'un entonnoir, on verse suffisamment de bouillie pour que l'adsorbant qui se dépose progressivement forme une couche d'environ 2 cm. On tapote les parois de la colonne pour favoriser le tassement de l'adsorbant. On ouvre alors le robinet pour que le solvant s'écoule lentement et on poursuit l'addition de la bouillie homogénéisée par portions successives. Quand tout l'adsorbant est introduit, on laisse décanter jusqu'à ce que le liquide qui surnage soit limpide.

Pendant l'opération, on doit veiller à ce que le niveau de solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant.

-Remplissage par voie sèche :

La colonne est remplie au deux tiers par le moins polaire des deux solvants et l'adsorbant en poudre est ajouté en portions successives dans la colonne à l'aide d'un entonnoir; pendant l'addition, on frappe continuellement sur les parois pour obtenir un tassement maximal. Quand la première portion forme une couche d'environ 2 cm, on ouvre le robinet pour faire couler lentement le solvant. On termine comme précédemment.

II.2.4-Dépôt des produits à analyser

Ils doivent former une zone cylindrique étroite dans le haut de la colonne.

Un liquide est déposé tel quel. Un solide sera dissous dans le minimum du moins polaire des deux solvants.

On ajuste d'abord le niveau de solvant pour qu'il soit juste au-dessus de celui de l'adsorbant. A l'aide d'une pipette, on coule l'échantillon au sommet de la colonne de façon uniforme sur toute la surface de la colonne sans la déformer. Si nécessaire, on ajuste à nouveau, comme précédemment, le niveau de liquide de la colonne : l'échantillon est ainsi adsorbé uniformément au sommet de la colonne.

II.2.5-Elution

On peut alimenter la colonne en continu à l'aide d'une ampoule de coulée ou bien ajouter manuellement l'éluant. Dans tous les cas, **la surface de l'adsorbant ne doit jamais être au contact de l'air**. En quelques minutes, une colonne laissée à sec se détériore : des fissures apparaissent dans la phase fixe.



Fig.I.2.1 : Exemple de l'éluion par chromatographie sur colonne