

Chromatographie sur colonne



Cette chromatographie est basée sur le même principe que la CCM, sauf que la silice est placée dans une colonne et non sur une plaque.

Le but est toutefois différent:

La chromatographie sur colonne sert à **séparer des produits**, soit à **purifier un produit de réaction**. C'est la méthode standard de purification dans un laboratoire de chimie organique.

C'est une **méthode préparative**, elle permet de purifier 50 mg à environ 20 g en laboratoire, et jusqu'à 1 kg en industrie.



1

Chromatographie sur colonne

Deux types de chromatographie existent:

- **Chromatographie par gravité**: elle utilise des particules de silice de 70 à 200 μm et le solvant s'écoule au goutte-à-goutte. Cette technique est désuète car elle demande une plus grande quantité de silice et de solvant.
- **Chromatographie éclair ("flash")**: elle utilise des particules de silice de 35 à 70 μm et le solvant s'écoule sous pression d'air comprimé.

Première référence à la chromatographie éclair:

Still, C.W.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2923-2925:
Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution.

2

Préparation de la chromatographie éclair

Plusieurs choix sont à faire en fonction de la quantité de produit et de l'aspect de la CCM:

- **Diamètre de la colonne**
- **Hauteur de silice**

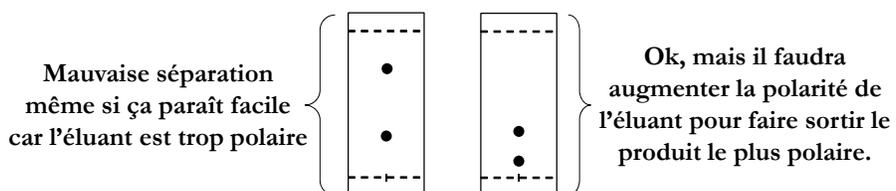
Masse de produit	Masse de silice	Diamètre de la colonne à utiliser	Hauteur de silice obtenue
15 - 500 mg	15 g	30 mm	45 mm
500 mg - 3 g	30 g	40 mm	50 mm
2 - 15 g	100 g	70 mm	55 mm

- **Choix de l'éluant**

3

Choix de l'éluant

Il faut faire des essais sur CCM avec différents éluants pour avoir une bonne séparation entre les produits, tout en recherchant un $R_f \sim 0.3$ pour le produit le moins polaire.

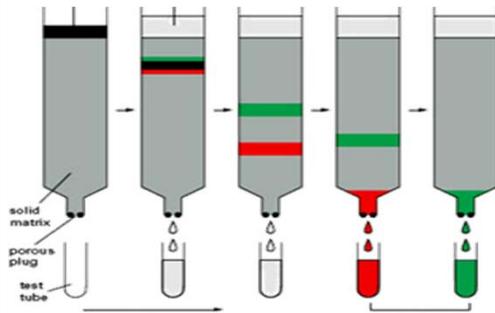


La polarité de l'éluant peut rester la même tout au long de la chromatographie (**élution isocratique**) ou aller en augmentant (**gradient de solvant**).

4

Que se passe-t-il?

Soit deux produits de polarité différentes (rouge et vert) qui migrent à travers une colonne de silice:



Le composé rouge est moins polaire donc moins retenu.

→ Sort en premier !

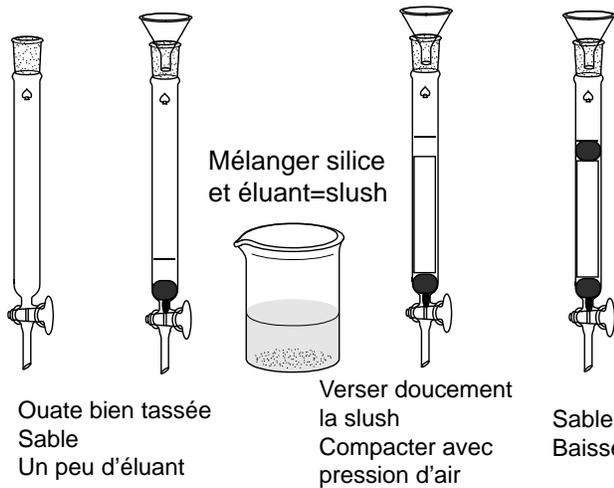
Le composé vert est plus polaire donc plus retenu.

→ Sort en deuxième !

On n'a qu'à changer régulièrement le « récipient » (éprouvettes de format variable)

5

Préparation de la colonne

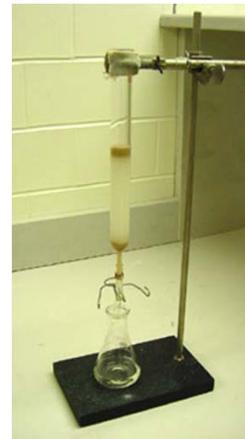


Ouate bien tassée
Sable
Un peu d'éluant

Mélanger silice
et éluant=slush

Verser doucement
la slush
Compacter avec
pression d'air

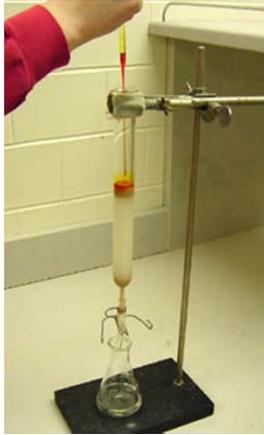
Sable
Baisser l'éluant



6

Attention à ne pas sécher la silice! Régler le débit d'air: 1-2 gouttes/sec.

Préparation de la colonne



Dépôt du produit:

Il s'effectue robinet fermé, à la pipette pasteur de façon homogène sur les bords de la colonne, le plus bas possible.

Choix du solvant?

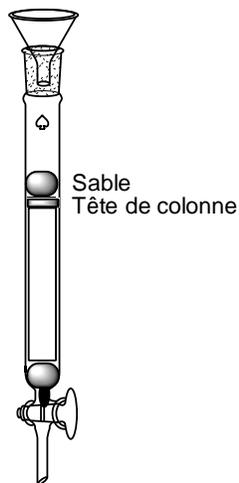
Si possible, éluant de départ

Le plus petit volume possible

Le dépôt doit ensuite être absorbé intégralement avant l'ajout du solvant d'éluion.

7

Dépôt de produit solide



Deux possibilités s'offrent à vous si le produit brut est solide:

- le solubiliser dans l'éluant et l'ajouter tel que décrit précédemment

- faire une **imprégnation sur silice**: mélanger le produit en solution avec ~ 5 x sa masse de silice. Évaporer à sec et additionner ce solide sur le haut de la colonne **avant** de mettre le sable. On utilise souvent cette technique si le produit brut n'est pas soluble dans l'éluant choisi.

8

Colonne de chromatographie éclair

Additionner doucement l'éluant.

Remplir les éprouvettes.

Veiller à ne pas manquer d'éluant pour ne pas sécher la colonne.

Si vous utilisez un gradient d'éluant, laissez écouler le premier solvant avant de rajouter le deuxième.

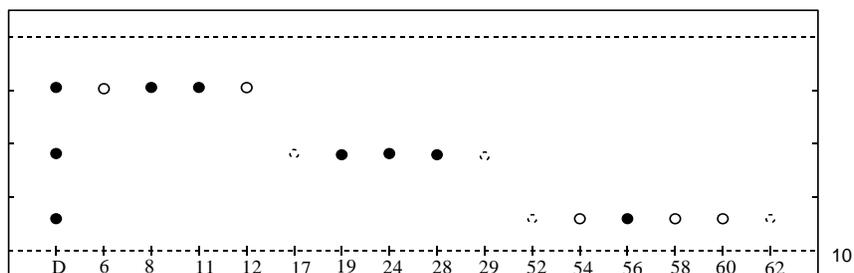
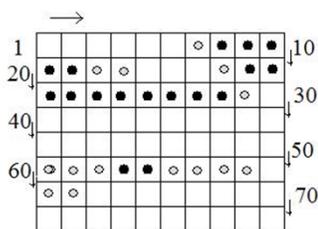


9

Analyses de la purification par chromatographie éclair

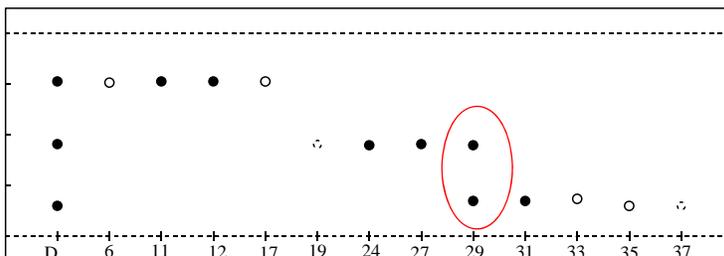
Déposer une micro-goutte de chaque éprouvette sur une CCM.

Préparer une CCM avec les éprouvettes qui contiennent un chromophore.



Chromatographie sur colonne

Que faire en cas de mélange ?



Conseils généraux :

- Toujours garder un échantillon du produit brut avant flash et le spotter
- Attention à la polarité de l'éluant pour les CCM... changer souvent!
Doit-il être le même que l'éluant pour la flash ??

11

Purification par chromatographie éclair : fin

- Regrouper les éprouvettes qui contiennent le même produit pur.
- Concentrer à l'évaporateur rotatif.
- Sécher à la pompe mécanique.
- Calculer le rendement de la flash et de la réaction.



12

Paramètres influençant la séparation

- Diamètre et hauteur de la colonne

- Quantité de silice

- Débit de l'éluant

- Granulométrie de la silice

- Polarité de l'éluant

- Volume du dépôt

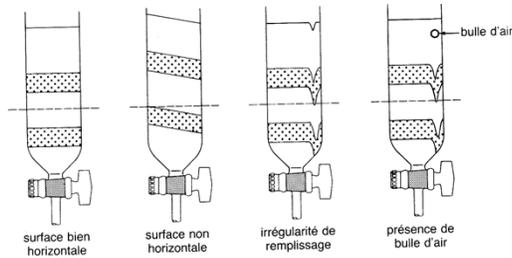


Figure 18.16 Les effets d'un mauvais remplissage

13

Systemes automatisés

Il existe maintenant des systèmes automatisés où la colonne est prépaquetée, le gradient est programmé, et l'appareil collecte des fractions. L'interface nous donne directement les fractions qui contiennent un chromophore. Il reste juste à faire les CCM et évaporer!



14

Cahier de laboratoire

Indiquer les informations suivantes:

- **Pour les CCM:**

- l'éluant
- le révélateur
- les R_f des produits

- **Pour les chromatographies éclair:**

- Diamètre et hauteur de la colonne de silice
- Éluant utilisé (variations, quoi, quand, comment...)
- Quantité de chaque fraction recueillie
- Reproduction des CCM de chaque fraction
- Rendement de la colonne