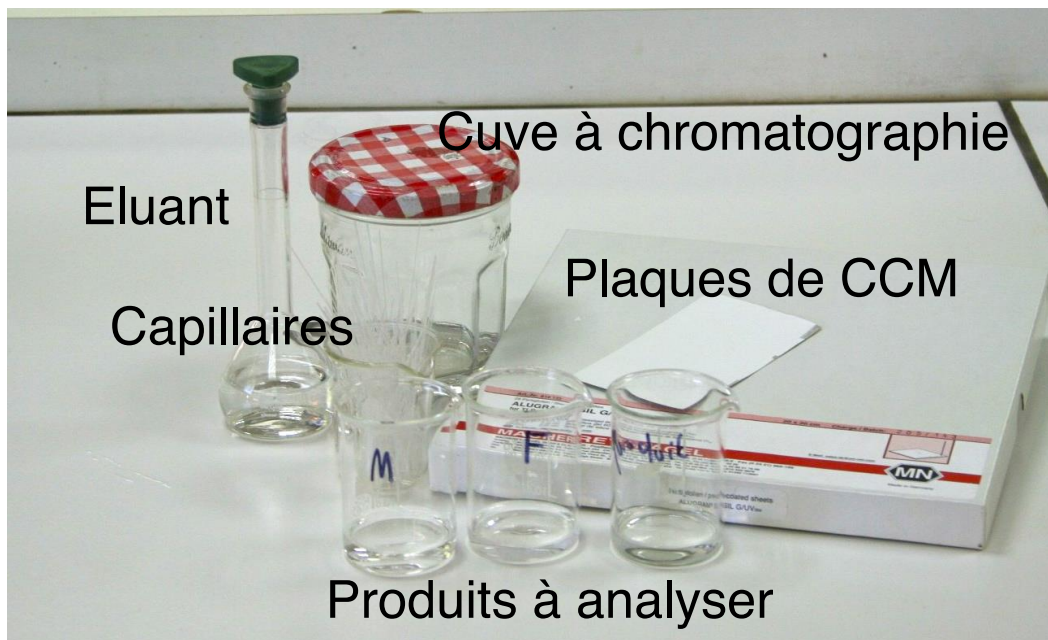




Analyse d'un produit par C.C.M

Chromatographie sur Couche Mince



nécessaire à C.C.M

La chromatographie est une technique de **séparation** des constituants d'un mélange, basée sur leurs affinités respectives pour une **phase stationnaire** et une **phase mobile**.

Il existe de nombreux types de chromatographies, selon la nature des phases en présence :

- chromatographie de partage liquide/liquide (par exemple sur papier Whatman ayant fixé de l'eau) ;
- chromatographie sur couche mince (CCM) ;
- chromatographie en phase vapeur (CPV) ;
- chromatographie sur colonne ; chromatographie liquide haute performance (HPLC)...

La chromatographie peut avoir :

- un but **préparatif**, notamment pour purifier un produit de ses impuretés ;

- un but **analytique** : la séparation des constituants d'un mélange est alors la première étape pour déterminer la composition de ce mélange.

La **Chromatographie sur Couche Mince (CCM)** est l'une des chromatographies les plus faciles à mettre en oeuvre. Elle est utilisée en général dans un but **analytique qualitatif**.

■ Les phases en présence en CCM

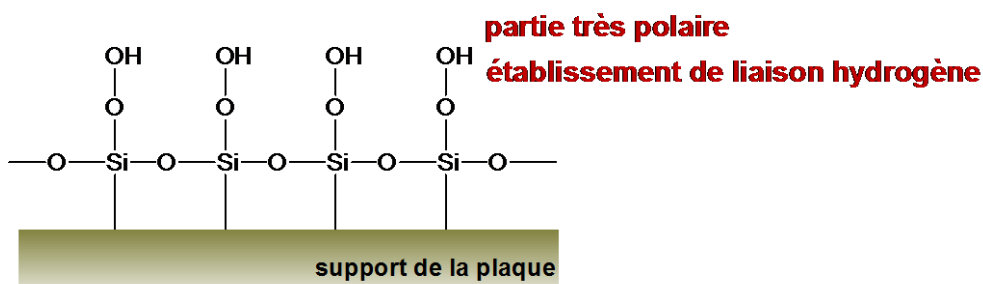
a) La phase stationnaire

La phase stationnaire est une fine couche de **gel de silice**, poudre blanche déposée sur un support plastique (PETE), métallique (Al) ou encore en verre.

Remarques : la silice est la surface la plus utilisée, mais on rencontre également parfois des plaques recouvertes d'alumine Al_2O_3 .

Rem : la silice contient également une petite quantité d'un additif qui a la propriété d'être fluorescent dans l'UV, ce qui est utile pour l'étape de révélation (voir plus loin « révélation »).

Le gel de silice est de la silice (SiO_2) **amorphe** (non cristallisée). C'est une variété de silice que l'on utilise en chromatographie en raison de sa grande **porosité**. Au niveau microscopique, elle est constituée de micrograins de formule SiO_2 , présentant en surface des liaisons O-H (Si-O-H).



En raison de l'électronégativité plus grande de l'oxygène par rapport au silicium ou à l'hydrogène, les liaisons Si-O et O-H présentes en surface sont polarisées : le gel de silice fait partie des phases stationnaires de **polarité élevée**.

b) La phase mobile

Il s'agit d'un solvant qui migre sur la plaque de silice. Un solvant qui se déplace est appelé en chromatographie un **éluant**.

De nombreux éluants peuvent être utilisés, selon la polarité souhaitée :

- ▶ *Solvants apolaires* : hexane, éther de pétrole (mélange d'alcane à 5 à 7 atomes de carbone)...
- ▶ *Solvants polaires* : éther, éthanol...

Le choix de l'éluant est le point crucial pour réussir une bonne séparation en CCM. Il dépend de la polarité des constituants que l'on a à séparer. Lors de la mise au point, on essaie couramment divers éluants, purs ou en mélange.

■ **Mode d'emploi**

On fournit en général des plaques de dimension 5x10 cm.

1) Préparation de la plaque : tracer un trait fin au crayon à papier, à 1cm d'un des bords et bien parallèle à celui-ci :

Attention !

- ▶ ne pas trop appuyer avec le crayon, pour ne pas endommager la surface de silice ;
- ▶ toujours tenir la plaque par le haut, afin de ne pas laisser d'empreinte digitale sur la partie où migrera l'éluant.

2) Préparation de la cuve : dans un bocal avec couvercle, introduire une petite quantité d'éluant (hauteur 0,5 cm) puis fermer le couvercle et attendre quelques minutes : cela permet de **saturer l'atmosphère en vapeurs d'éluant, afin d'éviter que celui-ci ne s'évapore à partir de la plaque pendant l'élution.**

On peut également placer un morceau de papier filtre imbibé d'éluant le long des parois internes du pot, afin d'accélérer la saturation de l'atmosphère en vapeurs d'éluant.

3) Dépôt de la goutte sur la plaque : avec un capillaire, déposer sur la ligne de base de la plaque une **petite** goutte du mélange à analyser ; il est possible de répéter le dépôt plusieurs fois afin d'augmenter la quantité d'espèces chimiques déposées sans élargir les taches. Il faut dans ce cas attendre que le solvant s'évapore entre chaque dépôt.

4) L'élution : placer la plaque dans l'éluant (attention aux vagues, ne pas déplacer le bocal !) et refermer immédiatement le couvercle. L'éluant monte alors lentement, par capillarité. Attendre que l'éluant atteigne les 2/3 ou les 3/4 de la hauteur de la plaque, puis retirer cette dernière et marquer immédiatement, au crayon, la position du **front de l'éluant** (avant qu'il ne sèche). On peut alors sécher la plaque pour éviter tout étalement des taches.

5) Révélation : le plus souvent, les produits que l'on a séparés sont incolores, on ne voit alors aucune tache sur la plaque : il faut la **révéler**. Il existe pour cela deux méthodes :

▶ *révélation avec une lampe UV* : on rappelle que le sulfure de zinc additionné à la silice rend la plaque fluorescente lorsqu'on la place sous une lampe UV ; les entourer au crayon ; que certaines plaques de CCM contiennent un indicateur fluorescent permettant une résolution dans l'UV, UV proche (366nm) ou lointain (254nm). L'indicateur UV₂₅₄ est un silicate de zinc activé au manganèse, dont le maximum d'absorption est à 254nm. Il présente une fluorescence verte. L'indicateur UV₃₆₆ est également un pigment minéral avec un maximum d'absorption à 366nm. Il présente une fluorescence bleue. Si les taches sont opaques à l'UV, la plaque ne sera pas fluorescente à ces endroits et on verra les taches.

▶ *révélation chimique* : on pulvérise sur la plaque un réactif spécifique qui réagit avec les taches pour donner un produit coloré. *Variante* : il est aussi fréquent de placer les plaques dans des vapeurs de diiode, ce dernier ayant beaucoup d'affinité pour les cycles aromatiques.

■ **Principe de la CCM**

Soit un constituant A déposé sur la ligne de base.

Lorsque l'éluant arrive sur la ligne de base, A est entraîné et migre avec lui le long des grains de silice. Mais en général, A migre moins vite que l'éluant, ce qui est dû à deux facteurs en compétition :

▶ **attraction de A par la silice polaire** : forces de Van der Waals dipôle/dipôle, liaisons hydrogène... Lorsqu'un corps est retenu par une surface, on dit qu'il est **adsorbé** sur cette surface ;

▶ **entraînement de A par l'éluant** : on choisit une polarité de l'éluant plus proche de celle de A si on veut que A migre davantage, plus éloignée dans le cas contraire.

Un éluant polaire a également pour effet d'être lui-même adsorbé par la silice, ce qui chasse les molécules de A et provoque sa migration par déplacement.

En général, avec un éluant peu polaire :

▶ si A est apolaire, il migre fortement avec l'éluant et est peu retenu par la silice : on le retrouve donc en haut de la plaque, proche du front de l'éluant, lors de la révélation ;

▶ si A est polaire, il migre plus ou moins selon sa polarité, selon sa capacité à faire des liaisons hydrogène... on le retrouve entre la ligne de base et le front de l'éluant ;

▶ si A est un ion, il reste sur la ligne de base, car les ions sont très fortement adsorbés sur la silice (interaction ion/dipôle).

■ Analyse des plaques

Comme on l'a dit précédemment, chaque constituant déposé sur la ligne de base (mélange A+B+C...) migre plus ou moins en fonction de ses affinités pour la silice et l'éluant.

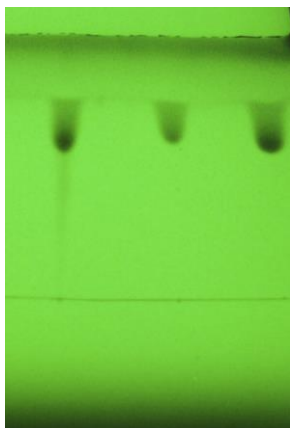
Le paramètre caractérisant la migration d'un constituant A vis-à-vis d'un éluant donné est le **rapport frontal**, c'est-à-dire la distance parcouru par A rapportée à la distance parcourue par l'éluant :

Le rapport frontal étant reproductible d'une CCM à l'autre (bien entendu avec une plaque et un éluant identiques), il permet d'attribuer les taches issues d'un mélange si on a pris le soin de faire au préalable des CCM de référence (A ou B ou C seuls).

Front de l'éluant



progression de l'éluant visible : on retire la plaque avant que le front de l'éluant n'atteigne le sommet de la plaque. On repère alors ce front avant que l'éluant, évaporé, ait disparu.



Exemple de plaque révélée sous lumière UV $\lambda = 254 \text{ nm}$

