

1. Définition et appareillage.

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- la phase stationnaire : une couche d'environ $0,25 \mu\text{m}$ de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.
- l'échantillon : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposer en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- l'éluant : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

2. Principe de la technique.

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

3. Applications de la CCM.

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.

De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de

composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

4. Adsorbants et plaques chromatographiques.

Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose.

Les plaques vous seront fournies prêtes à l'emploi.

5. Choix de l'éluant.

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est trop polaire ; celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment.

Choix de l'éluant dans le cas d'analyses :

- d'hydrocarbures : hexane, éther de pétrole ou benzène.
- de groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique forment un éluant de polarité moyenne.
- de composés polaires : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol.

6. Dépôt de l'échantillon.

L'échantillon est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : on emploie fréquemment le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution est déposée en un point de la plaque situé à environ 1 cm de la partie inférieure.

Il est important que le diamètre de la tache produite au moment du dépôt soit faible ; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3 mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large.

L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité de la pipette sur la couche d'adsorbant en prenant soin de ne pas le détériorer.

On vérifie l'identité des composants présumés d'un échantillon, en procédant à un dépôt séparé d'une solution de chacun d'eux puis à celui de leur mélange. Ces solutions

témoins permettent de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à analyser.

7. Développement de la plaque.

Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque. Dans les analyses usuelles de laboratoire, le principal type de développement est la chromatographie ascendante : la plaque est placée en position verticale dans une cuve et le solvant qui en recouvre le fond monte par capillarité.

Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve puis on introduit la plaque. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée.

Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir.

8. Révélation.

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes : radiations UV , fluorescence , iode , atomisation.

Sauf indications contraires, nous utiliseront les radiations UV. En exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés apparaissent sous forme de taches brillantes.

Si un indicateur fluorescent est incorporé à l'adsorbant, la plaque entière devient fluorescente lorsqu'elle est soumise à une radiation UV ; les composés y sont révélés sous forme de taches sombres.

9. Calcul de R_f (retarding factor ou rapport frontal).

$$R_f = \frac{d_i}{d_s}$$

d_i : distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache)

d_s : distance parcourue par le front du solvant

10. Description d'une analyse par CCM selon l'ordre chronologique.

Préparation de la cuve chromatographique.

- Introduire l'éluant ou le mélange de solvants.
- Ajuster le niveau à environ 0,5 cm du fond de la cuve.
- Garnir l'intérieur de la cuve d'un papier filtre imprégné d'éluant et plaqué contre les parois ; une ouverture est ménagée dans le filtre pour observer le développement du chromatogramme.
- Fermer le récipient (la cuve doit être saturée de vapeur de solvant)

Dépôt de l'échantillon sur la plaque.

- Procéder au nettoyage de la plaque si nécessaire.
- Dissoudre l'échantillon dans un solvant approprié en solution de 2 à 5 % .
- Déposer environ 0,5 ml de la solution en un point situé à 1 cm de l'extrémité inférieure de la plaque; le diamètre de la tache doit être d'environ 2 mm pour la disposition de plusieurs produits.
- Sécher à l'aide d'un séchoir ; éventuellement faire de nouvelles applications.

Développement du chromatogramme.

- Placer la plaque dans la cuve en position verticale.
- Refermer le récipient qui ne doit plus être déplacé.
- Lorsque le front du solvant se trouve à environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, la retirer et marquer cette position. (le trait peut être tracé à l'avance et servir de repère pour arrêter l'élution).

Révélation et calcul de R_f .

- Sécher la plaque à l'aide d'un séchoir
- Révéler les taches sous une lampe U V
- Cercler les taches et pointer leur centre.
- Calculer les R_f