



Chapitre III

La chromatographie sur CM, sur papier et sur colonne conventionnelle.

III-1-Définition de la Chromatographie sur couche mince.

III-2-Etapes de séparation.

III-2-1-Dépôt de l'échantillon.

III-2-2-Développement de la plaque CCM.

III-2-3-Révélation de la plaque CCM.

III-3-CCM bidimensionnelle.

III-4-Paramètres de séparation et de rétention.

III-5-Chromatographie sur papier.

III-6-Chromatographie sur colonne conventionnel.

III-1-Définition de la Chromatographie sur couche mince.

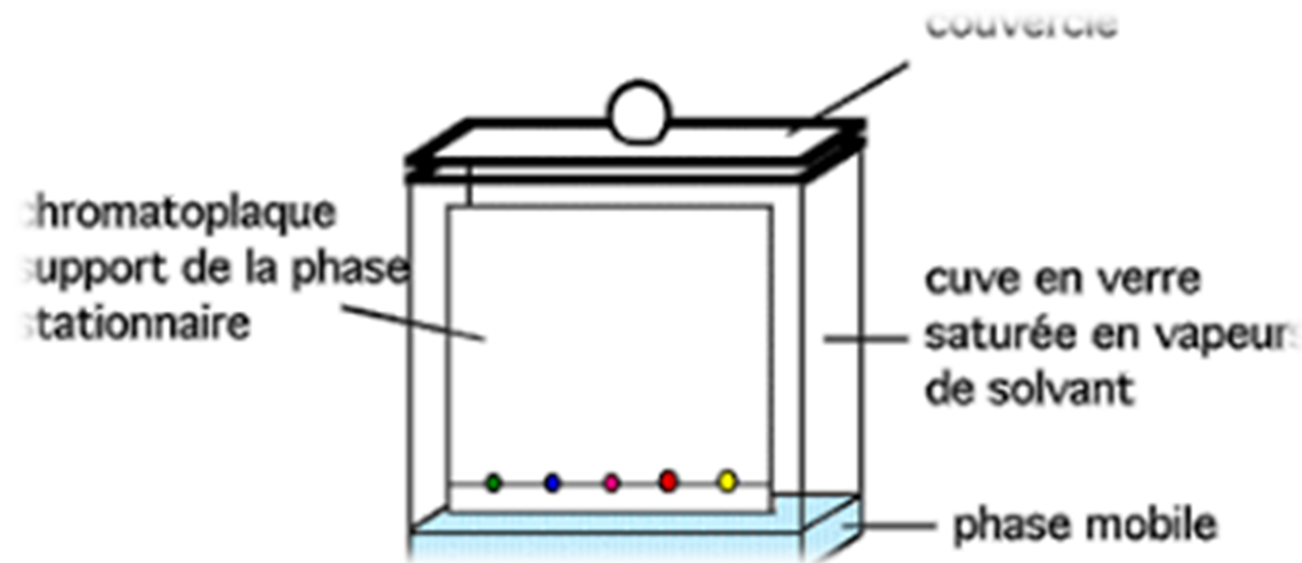
- ❖ La séparation par chromatographie sur couche mince (ou chromatographie planaire) des constituants de l'échantillon est réalisée sur une fine couche (100-200 µm) de phase stationnaire, généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium.
- ❖ Pour maintenir la phase stationnaire sur le support et assurer la cohésion des particules, un liant organique est incorporé au cours de la fabrication de la plaque.
- ❖ La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique complémentaire de la CLHP; elle présente plusieurs avantages:
 - 1-elle est plus rapide et meilleur marché que la CLHP.
 - 2- elle s'accommode de matrices complexes.
 - 3- elle permet des analyses bidimensionnelles.
 - 4- elle rend possible le lancement de plusieurs analyses simultanément.



III-2-Etapes de séparation:

III-2-1-Dépôt de l'échantillon:

- ❖ On commence par déposer un petit volume de l'échantillon en solution diluée, à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache de 1 à 3 mm de diamètre. Ce dépôt est réalisé soit manuellement, soit de manière automatique, avec un capillaire à extrémité plane.

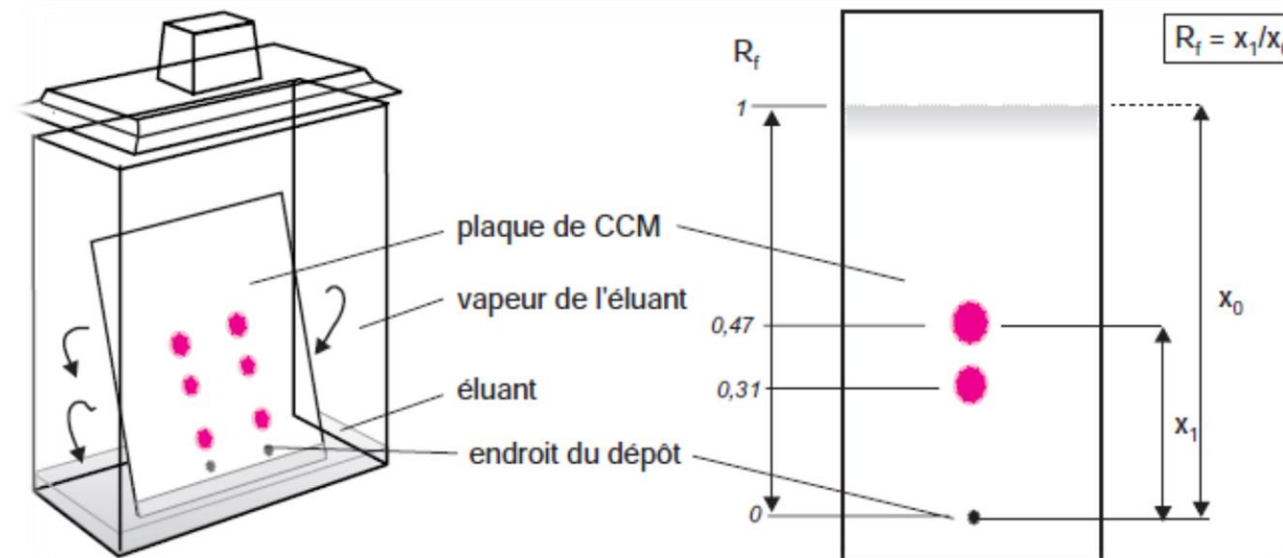


- ❖ La plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve spéciale munie d'un couvercle, au fond de laquelle se trouve un peu de la phase mobile servant d'éluant. L'endroit où l'échantillon se trouve doit être situé au-dessus du niveau d'immersion.

III-2-Etapes de séparation:

III-2-2-Développement de la plaque CCM:

- ❖ La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Le temps de migration (plusieurs minutes) dépend de divers paramètres.
- ❖ Quand le front de solvant a parcouru une distance considérée comme suffisante (quelques centimètres), on retire la plaque de la cuve, on repère la position limite atteinte par la phase mobile et on évapore cette dernière.



III-2-Etapes de séparation:

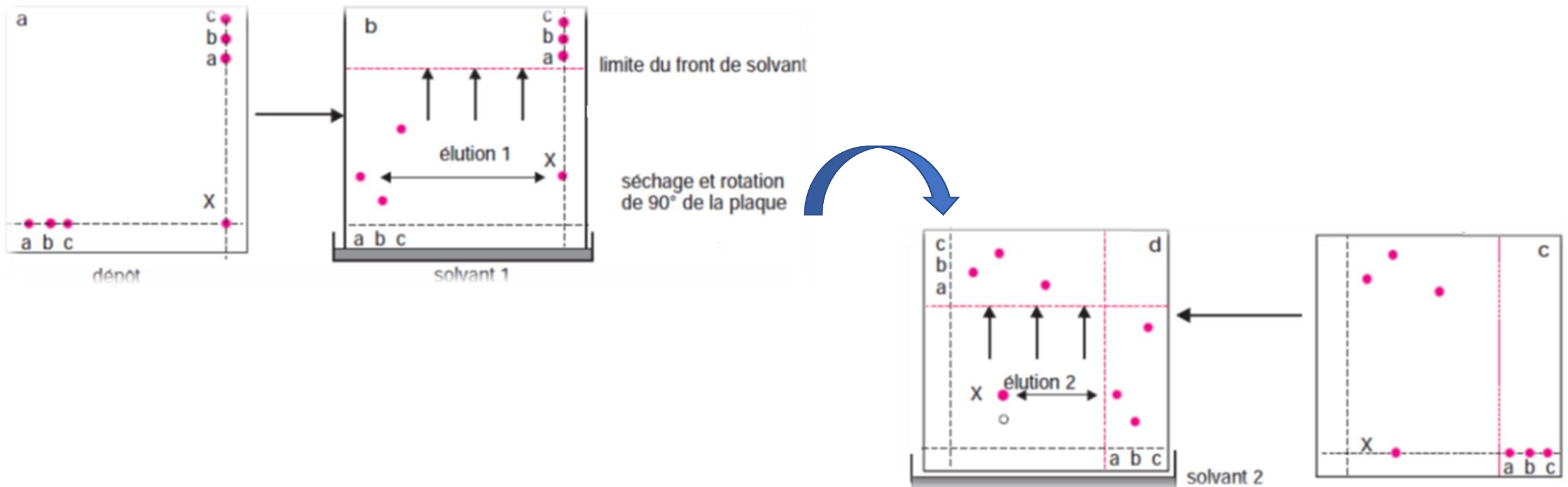
III-2-3-Révélation de la plaque CCM:

- ❖ La localisation des composés après **migration** se fait sur la plaque par le biais de plusieurs **révélateurs**, spectroscopiques ou chimiques.
- ✓ **Soit à l'aide d'une lampe UV à vapeur de mercure ($\lambda = 254 \text{ nm}$):** Tout composé qui absorbe à cette longueur d'onde (tel que les composés aromatiques) apparaît sous forme d'une tache sombre (ou colorée) sur un fond illuminé en vert (due à la présence des sels de zinc sur la phase stationnaire).
- ✓ **Soit à l'aide des révélateurs chimiques:** cette méthode consiste à carboniser les composés en chauffant la plaque après l'avoir soumise à une pulvérisation d'acide sulfurique; ou la révélation par immersion dans des réactifs généraux (acide phosphomolybdique, vanilline, Iode, KMnO_4), ou spécifiques (ninhydrine en solution alcoolique pour les acides aminés, par exemple).



III-3-CCM bidimensionnelle:

- ❖ L'utilisation d'une plaque de forme carrée permet de faire de la **chromatographie bidimensionnelle** en procédant à deux éluions successives avec deux éluants différents, c'est une expérience qui permet de prouver si un "spot" de la CCM contient en fait deux produits.



- ❖ Une application typique de cette méthode est la séparation des acides aminés. Pour n spots, la résolution peut atteindre $(n * n)$ composés.

III-4-Paramètres de séparation et de rétention:

- ❖ Chaque composé est défini par son R_f , (abréviation de « **rapport frontal**»), qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{x}{x_0}$$

- ❖ On définit l'efficacité N et la hauteur d'un plateau théorique de la plaque H pour un composé dont la distance de migration est x et le diamètre du spot w par les relations suivantes:

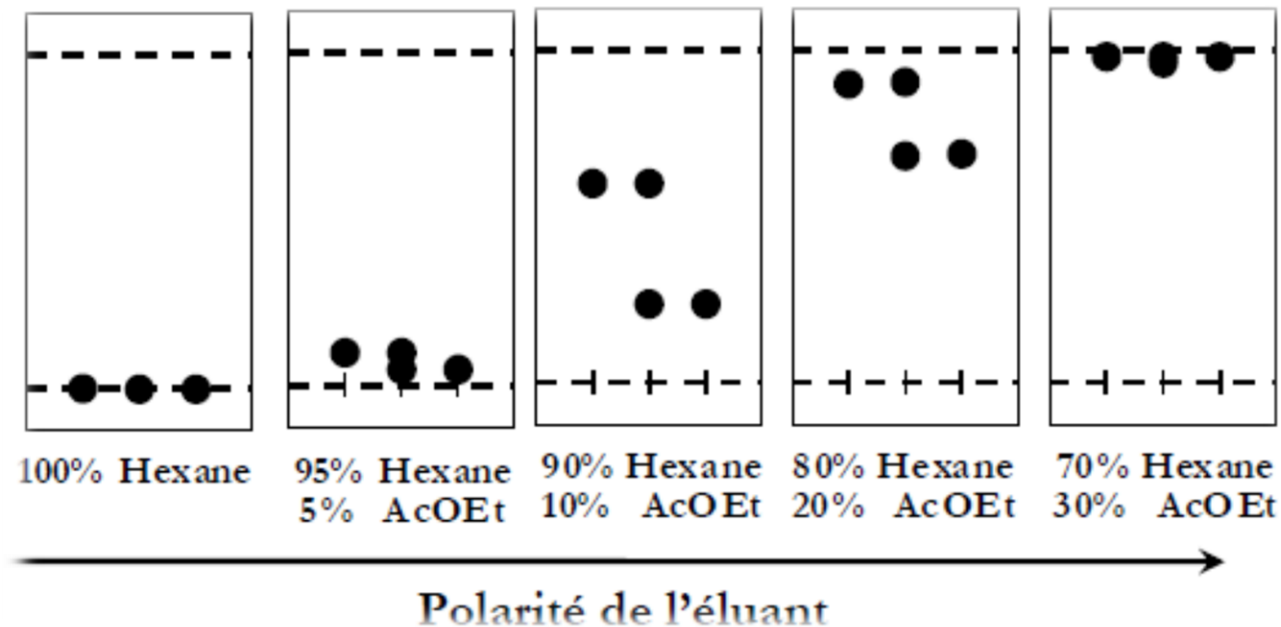
$$N = 16x^2 / w^2 ; H = x / N$$

- ❖ Pour calculer le facteur de rétention k d'un composé ou la sélectivité ou la résolution R entre deux composés on fait généralement correspondre les distances de migration sur la plaque aux temps de migration lus sur un chromatogramme

$$k = \frac{1}{R_f} - 1 \qquad R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_2 - w_1}$$

III-4-Paramètres de séparation et de rétention:

❖ Le choix de la phase mobile est très important pour avoir une résolution satisfaisante entre deux produits, pour faire une séparation de deux produits par chromatographie sur couche mince, on cherche un éluant qui donne le plus grand ΔR_f possible, avec un R_f pour le produit le moins polaire autour de 0,3.

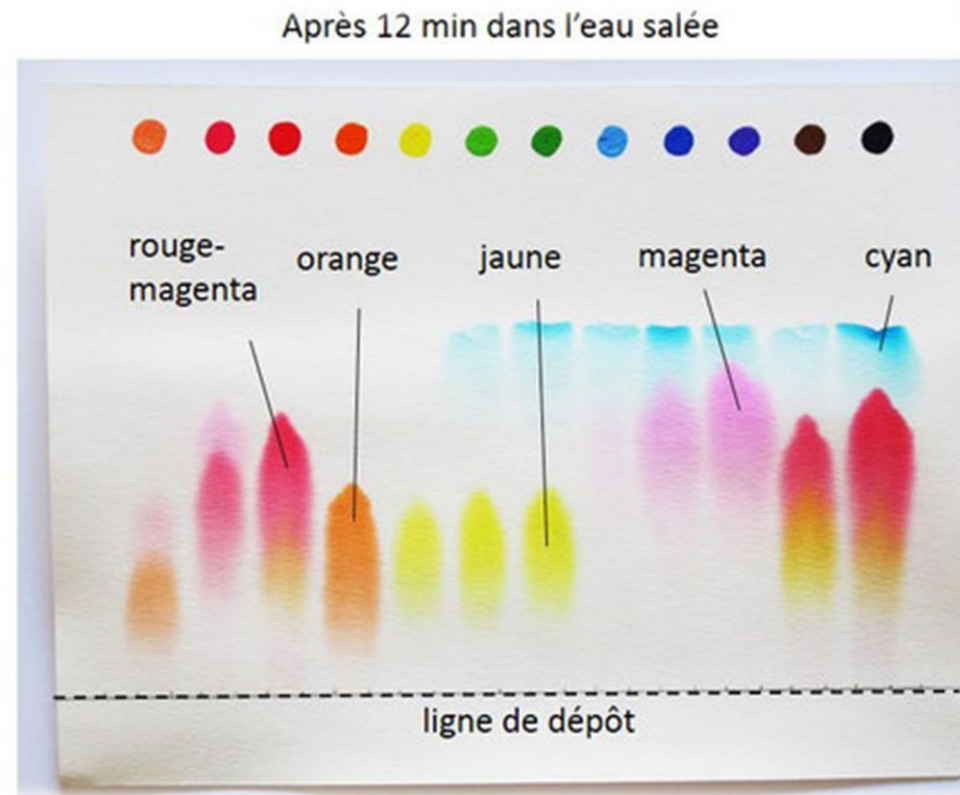
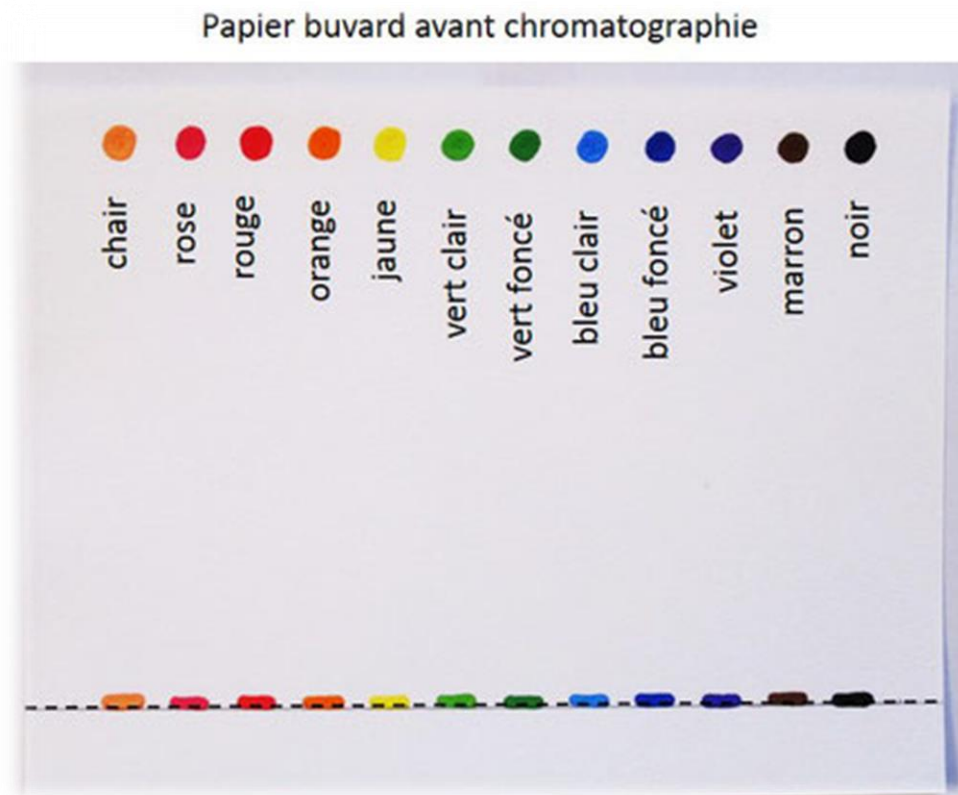


✓ Remarque:

❖ On ne peut faire varier le débit de la phase mobile, pour améliorer l'efficacité de la séparation. Un remède consiste à faire des développements multiples en séchant la plaque entre chaque cycle de migration

III-5-Chromatographie sur papier:

- ❖ La chromatographie sur papier est une technique de chromatographie planaire possède les mêmes étapes et principes de séparation de la chromatographie sur couche mince; la différence entre les deux techniques c'est la nature de la phase stationnaire.



III-6-Chromatographie sur colonne conventionnel:

❖ Cette technique de chromatographie solide-liquide permet des séparations de quantité de soluté qui peuvent varier de 500 mg à plusieurs grammes tout dépend du diamètre de la colonne et de la quantité de la phase stationnaire utilisés.



- ❖ Dans un premier temps on remplit la colonne de la phase stationnaire (silice ou alumine) imprégnée d'un solvant. Le niveau du liquide dans la colonne est abaissé au sommet de la phase stationnaire.
- ❖ L'échantillon à analysé est dissous dans un minimum de solvant (la phase mobile) on le dépose au sommet de la colonne pour subir l'élution, les constituants du soluté sont entraînés vers le bas à des vitesses différentes.
- ❖ **La polarité** de l'éluant est un facteur important. Si l'éluant est suffisamment polaire, les constituants du soluté sont entraînés; s'il est apolaire, les constituants apolaires (moins retenus) sortiront les premiers et les produits polaires ne migreront que par l'addition d'un solvant polaire (mélanges).

III-6-Chromatographie sur colonne conventionnel:

- ❖ La polarité c'est la propriété des molécules de posséder des centres positive et négative séparés, cet arrangement résulte de la nature des atomes mis en jeu et de leur configuration.
- ❖ En chromatographie, la définition est élargie et englobe des propriétés telles que la liaison hydrogène et le phénomène de la polarisation.
- ❖ Les composés organiques oxygénée, alcools, cétones, ester....., ont des moment dipolaires plus faibles et forment des liaisons hydrogènes moins facilement que l'eau (solvant très polaire). La polarité relative des solvants est caractérisée par leur constante diélectrique.

✓ Polarité relative des solvants:

1-Les hydrocarbures légers.

2-Cyclohexane.

3-CCl₄.

4-Trichloroéthylène.

5-Toluène.

6-Benzène.

7-Dichlorométhane.

8-Chloroforme.

9-Ether éthylique.

10-Acétate d'éthyle.

11-Acétone.

12-N-Propanol.

13-Ethanol.

14-Méthanol.

15-Eau.

Références

