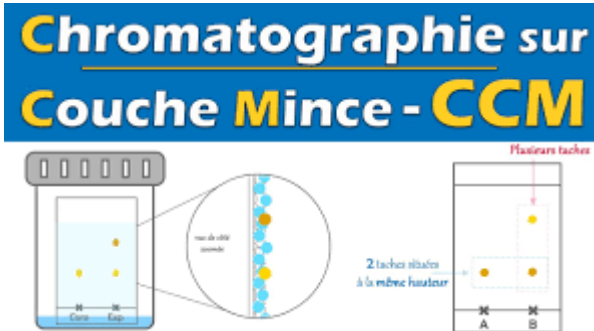


II.4 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)



Introduction : Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique couramment utilisée pour séparer et analyser des mélanges de composés. Elle repose sur le principe de la migration différentielle des analytes sur une phase stationnaire déposée sous forme de fine couche sur un support solide.

Elle est utilisée dans de nombreux domaines, notamment la chimie organique, la pharmacie, la biochimie et les sciences environnementales.



- **Applications principales :**
 - ❑ Identification des composés.
 - ❑ Suivi de réactions chimiques.
 - ❑ Analyse des extraits naturels.
 - ❑ Contrôle qualité dans l'industrie.

II.4.1 Principe de la CCM

La CCM repose sur l'interaction entre :

- **La phase stationnaire** : une couche fine de matériau adsorbant (comme la silice ou l'alumine) déposée sur un support solide (plaque en verre, aluminium ou plastique).
- **La phase mobile** : un solvant ou un mélange de solvants qui migre par capillarité sur la plaque.

Les composés à analyser sont séparés en fonction de leurs interactions avec les deux phases :

- **Adsorption** : attraction entre le composé et la phase stationnaire.
- **Solubilité** : affinité du composé avec la phase mobile.

La **chromatographie sur couche mince** s'effectue généralement sur une fine couche de silice (phase stationnaire) déposée sur un support. Le mélange à étudier est ensuite posé à l'aide d'un capillaire à environ 1 cm du bord puis placé dans une cuve contenant l'éluant. Le niveau de l'éluant devant être en dessous du produit déposé. La cuve de chromatographie est ensuite refermée par un couvercle. Pour une meilleure séparation, on peut placer un papier filtre sur toute la hauteur de la cuve. Celui-ci se charge de solvant par capillarité ce qui permet une meilleure saturation de la cuve.

L'éluant migre sur la plaque de silice par capillarité et entraîne les composés du mélange étudié. Si les vitesses de migration des composés sont différentes, ils seront séparés. La plaque de chromatographie est ensuite lue directement si les composés sont visibles, ou placée sous une lumière UV. Les produits peuvent également être révélés en pulvérisant la plaque une solution d'acide sulfurique suivi d'un chauffage dans une étuve. Des plaques avec révélateurs à la fluorescéine sont également disponibles. Placées sous la lumière UV, les taches apparaissent sans avoir besoin d'avoir recours à un révélateur. Dans tous les cas, ne pas oublier de tracer le front du solvant dès la sortie de la plaque de la cuve avant son évaporation.

On détermine le ***ratio frontal*** (R_f) étant le rapport entre la distance parcourue par le soluté divisé par la distance parcourue par le front du solvant.

Le principe de séparation des composés par CCM est proche de celle en HPLC. Le mélange est placé sur la plaque de silice à l'aide d'une pipette pasteur.

Le principal intérêt de la CCM est l'identification rapide des composés d'un mélange. En contre partie, l'analyse est uniquement **qualitative** et ne permet pas le dosage d'un composé. Toutefois, ceci est de moins en moins vrai avec l'apparition de chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC). Ici de dépôt du produit à analyser est automatisé avec une précision extrême ce qui permet une quantification.

II.4.2 Mode opératoire : Réalisation de l'expérience de la chromatographie sur couche mince (CCM)

Cas étudié : Mélange contenant les composants C1 et C2.

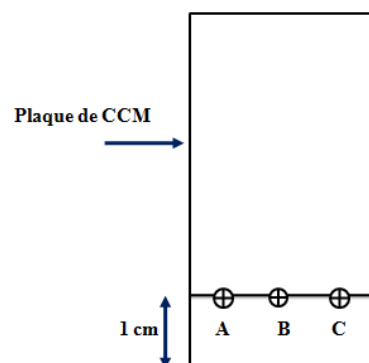
Étape 1 : Préparation de la plaque

- Utiliser une plaque de CCM (généralement en verre, aluminium ou plastique) recouverte d'une fine couche de phase stationnaire (par exemple, gel de silice ou alumine).
- **Remarque :**
 - Le choix de la phase stationnaire dépend de la polarité des composés à analyser.

- Manipuler la plaque avec précaution pour éviter de la contaminer avec les doigts ou d'autres substances.

Étape 2 : Tracer la ligne de base

- Tracer un trait horizontal à environ **1 cm du bas** de la plaque à l'aide d'un crayon à mine fine (pas de stylo, car l'encre pourrait interférer avec l'expérience).
- Sur cette ligne, marquer trois points :
 - **A** : Correspond au produit de départ ou au standard 1.
 - **B** : Correspond au standard 2 (ou témoin).
 - **C** : Correspond au mélange des deux composés (C1 et C2).

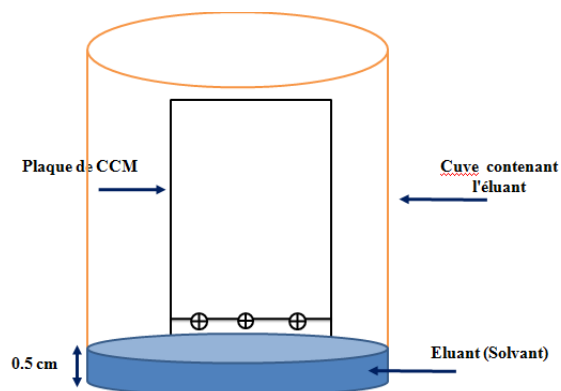


Étape 3 : Dépôt des solutions

- À l'aide d'un **capillaire** ou d'une **microseringue**, déposer une petite quantité des solutions **A**, **B**, et **C** sur les points correspondants de la ligne de base.
- **Remarque :**
 - Le dépôt doit être très précis, et les gouttes doivent être de taille similaire pour garantir des résultats reproductibles.
 - Laisser sécher les dépôts avant de passer à l'étape suivante pour éviter leur diffusion prématurée.

Étape 4 : Préparation de la cuve et saturation

- Dans une cuve chromatographique (ou un récipient hermétique), verser l'éluant (phase mobile) de manière à ce qu'il atteigne environ **5 mm de hauteur**.
- Placer un papier filtre contre la paroi de la cuve pour homogénéiser la saturation en vapeur d'éluant (facultatif mais recommandé).
- Fermer la cuve et laisser saturer l'atmosphère en vapeur d'éluant pendant environ **5 à 10 minutes**.
- **Remarque :**
 - La saturation de la cuve est essentielle pour obtenir une migration uniforme des composés.

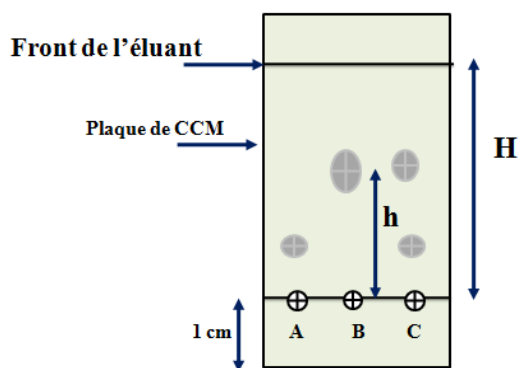


Étape 5 : Migration des composés

- Placer délicatement la plaque de CCM dans la cuve, **ligne de base vers le bas**, en s'assurant que la ligne de base ne soit pas immergée dans l'éluant.
- Fermer la cuve et laisser le solvant migrer par capillarité le long de la plaque.
- Lorsque le solvant atteint environ **1 cm du haut de la plaque**, retirer cette dernière de la cuve.
- Immédiatement, tracer au crayon une **ligne de front** marquant la hauteur atteinte par l'éluant (ligne de fin de migration).
- Laisser sécher la plaque à l'air libre pour évaporer le solvant.

Observation

- Après séchage, des taches apparaissent sur la plaque correspondant aux composés **A**, **B**, et **C**.
- Pour le mélange **C**, deux taches distinctes sont observées :
 - Une à la même hauteur que **A**.
 - Une autre à la même hauteur que **B**.
- Ces observations confirment que le mélange **C** contient les deux composés **C1** et **C2**.



Remarque sur la visualisation des taches

- **Visualisation sous UV :**

- Placer la plaque sous une lampe UV à **254 nm**. La plaque, fluorescente, apparaît verte, tandis que les composés absorbant les UV se manifestent sous forme de taches sombres.
- Cette méthode est prioritaire car elle n'altère pas la plaque ni les composés.

- **Visualisation chimique (colorimétrique) :**

- Si les taches ne sont pas visibles sous UV, vaporiser une solution révélatrice (ex. : permanganate de potassium ou acide sulfurique concentré suivi d'un chauffage doux).
- **Remarque :** Certains révélateurs peuvent endommager la plaque et sont à utiliser en dernier recours.

Remarque :

Il existe de nombreux autres révélateurs

vanilline : On plonge la plaque dans une solution acide de vanilline et l'on chauffe la plaque jusqu'à ce que des taches colorées apparaissent.

Révélation au permanganate de potassium

- ❏ 10 g de K_2CO_3
- ❏ 1,5 g de permanganate de potassium ($KMnO_4$)
- ❏ 150 ml d'eau distillée
- ❏ 1,25 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) en solution à 10 %

La vanilline

- ❏ Ajouter 2 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 200 ml d'éthanol à 90-96 % (ou 190 ml d'éthanol absolu et 10 ml d'eau désionisée),
- ❏ Ajouter 800-1 000 mg de vanilline et agiter jusqu'à dissolution complète,
- ❏ Conserver à l'abri de la lumière.

Ce révélateur est utilisé en spray ou par trempage suivi d'un chauffage à environ 200 °C jusqu'à ce que les taches apparaissent.

On peut noter que ce type de révélation produit souvent des couleurs intenses dans tout le spectre visible et que la couleur d'une tache est caractéristique du composé présent. Il est ainsi possible de :

II.4.3 ratio frontal

Pour calculer le **ratio frontal** (R_f) en chromatographie sur couche mince (CCM), vous pouvez utiliser la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{(Distance parcourue par la tache)}}{\text{(Distance parcourue par la front)}} = \frac{h}{H}$$

Étapes pour calculer R_f :

1. **Mesurer la distance parcourue par la tache :**
 - À l'aide d'une règle, mesurer la distance entre la **ligne de base** (où l'échantillon a été déposé) et le **centre de la tache**.
2. **Mesurer la distance parcourue par le front du solvant :**
 - Mesurer la distance entre la **ligne de base** et la **ligne de front**, qui marque l'endroit où le solvant a cessé de migrer.
3. **Appliquer la formule :**
 - Divisez la distance parcourue par la tache par la distance parcourue par le front du solvant.

II.4.4. Types de Phase Stationnaire

- **Silice (SiO_2)** : Utilisée pour des composés polaires.
- **Alumine (Al_2O_3)** : Pour les composés non polaires.
- **Cellulose** : Pour les analytes hydrophiles.

II.4.5 Phase Mobile

- Les solvants doivent être choisis en fonction de leur polarité et de la nature des composés.
 - **Exemples de solvants :**
 - Non-polaires : Hexane, cyclohexane.
 - Polaires : Éthanol, acétone.
 - Mélanges : Hexane-acétate d'éthyle.

II.4.6 Visualisation des Résultats

1. **Détection UV** : Pour les composés fluorescents ou absorbant dans l'UV.

2. Réactifs de coloration : Pour rendre visibles des composés spécifiques.

- Iode pour les composés organiques.
- Ninhydrine pour les acides aminés.
- Réactifs dérivés de l'acide sulfurique pour les sucres.

II.4.7 Optimisation en CCM

- Choix du solvant ou mélange de solvants pour une meilleure séparation.
- Contrôle de la saturation de la cuve.
- Répétition des analyses pour améliorer la reproductibilité.

Conclusion

La chromatographie sur couche mince est une méthode essentielle pour des analyses rapides et économiques. Bien que moins sophistiquée que d'autres techniques chromatographiques, elle reste indispensable dans les laboratoires pour les analyses préliminaires et les applications éducatives.

Pour approfondir, des cours pratiques et des études de cas peuvent compléter cet enseignement théorique.