

ANNEXE CHROMATOGRAPHIE

1. Chromatographie: aspects généraux:

1.1. Définitions:

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de **deux phases**, l'une **stationnaire ou fixe**, l'autre **mobile**. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur **adsorption** et **désorption** successives sur la phase stationnaire, soit de leur **solubilité différente** dans chaque phase.



1.2 Nature des phases

Phase fixe. La phase fixe peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitées, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (chromatographie sur couche mince ou CCM).

Phase mobile. La phase mobile est:

- soit un gaz (ex: chromatographie en phase gazeuse): la phase mobile est appelée **gaz vecteur** ou **gaz porteur**.
- soit un liquide (ex: chromatographie sur papier, couche mince ou colonne): la phase mobile est appelée **éluant**.

1.3 Polarité des phases. Les séparations sont basées sur le principe de polarité c'est à dire l'existence de dipôles électriques.

Phase mobile : le pouvoir éluant d'un liquide dépend de sa propre polarité. Les liquides classés ci-dessous le sont par **polarité croissante**. On obtient ainsi une série élutropique : éther de pétrole, tétrachlorométhane, benzène, éther diéthylique, propanone, éthanol, eau, acide éthanoïque...

Adsorbants : les adsorbants figurant dans la liste ci-dessous sont classés selon l'ordre croissant de leurs forces d'interactions avec des composés polaires. : papier, cellulose, amidon, sucres, carbonate de sodium, oxyde de magnésium, gel de silice, alumine...

2 Chromatographie sur couche mince (CCM)

2.1 Appareillage. 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 mm 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, déposé 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.

2.2. 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.

2.3. Calcul de R_f (retarding factor ou rapport frontal). $R_f = y_c / y_e$. y_c : distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache), y_e : distance parcourue par le front du solvant. Pour un couple éluant et support déterminé, R_f est une caractéristique de chaque soluté à la température de l'expérience.

2.4. Applications de la CCM. Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisément et rapidement de la pureté d'un composé organique ou bien de la composition d'un mélange. 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.

2.5. Révélation. L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes : directement si les substances sont colorées ; à l'aide de révélateurs si elles sont incolores afin de les transformer en taches colorées ; toutes les substances ayant une absorption dans la région au-dessus de 230 nm sont étudiées sur des supports additionnés de corps fluorescents par irradiation de lumière UV à ondes courtes ($\lambda_{\text{max}} < 254 \text{ nm}$).