

Chapitre N°2: Chromatographie Planaire

Module: Techniques d'Analyses Chromatographiques

Master 1 chimie Analytique

2025/2026

Chromatographie planaire

Cette chromatographie recouvre la **chromatographie sur couches minces** (CCM) et la **chromatographie sur papier**.

- La phase stationnaire est sur la surface d'un support plat (CCM) ou dans une feuille de cellulose poreuse (chromatographie sur papier) ;
- La phase mobile est un liquide (solvant) qui se déplace par capillarité ou par gravité tout au long de la phase stationnaire.





CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Chromatographie sur papier

Principe

- Méthode qualitative couramment utilisée pour la séparation et l'identification des composés colorés.
- Repose sur la séparation des biomolécules d'un mélange sur la base du phénomène de partage, c'est-à-dire la différence de solubilité et donc de distribution d'une biomolécule donnée (analyte) entre la phase stationnaire et la phase mobile.



Chromatographie sur papier

Le papier (support)

- En cellulose inerte
- Largement hydraté (distribution de l'analyte entre l'eau immobilisée (phase stationnaire), et le solvant constituant la phase mobile)



Whatman No. 1 Chromatography Paper, 11-cm² Sheets



Chromatography Paper Strips



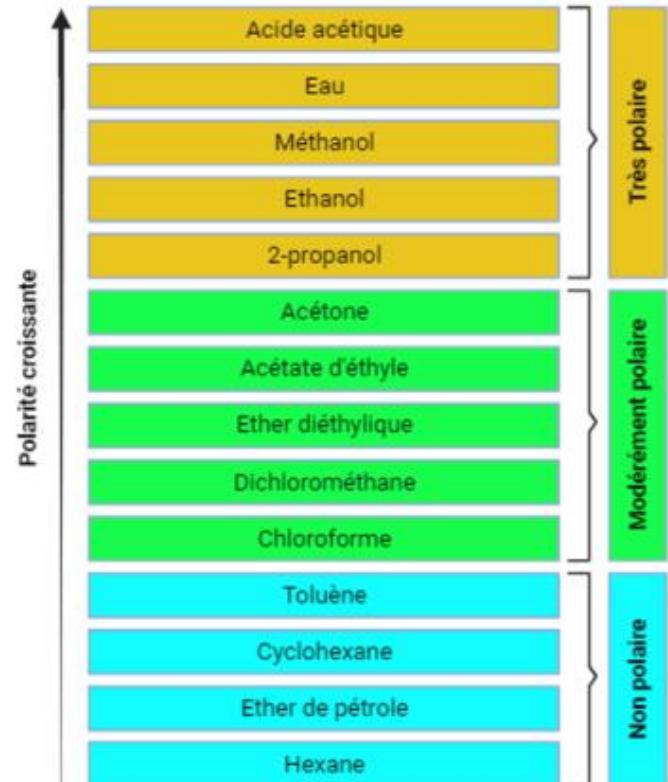
Chromatographie sur papier

Phase stationnaire

- constituée par **l'eau** elle-même adsorbée sur la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle
- Les composés les plus solubles dans l'eau sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement

Phase mobile

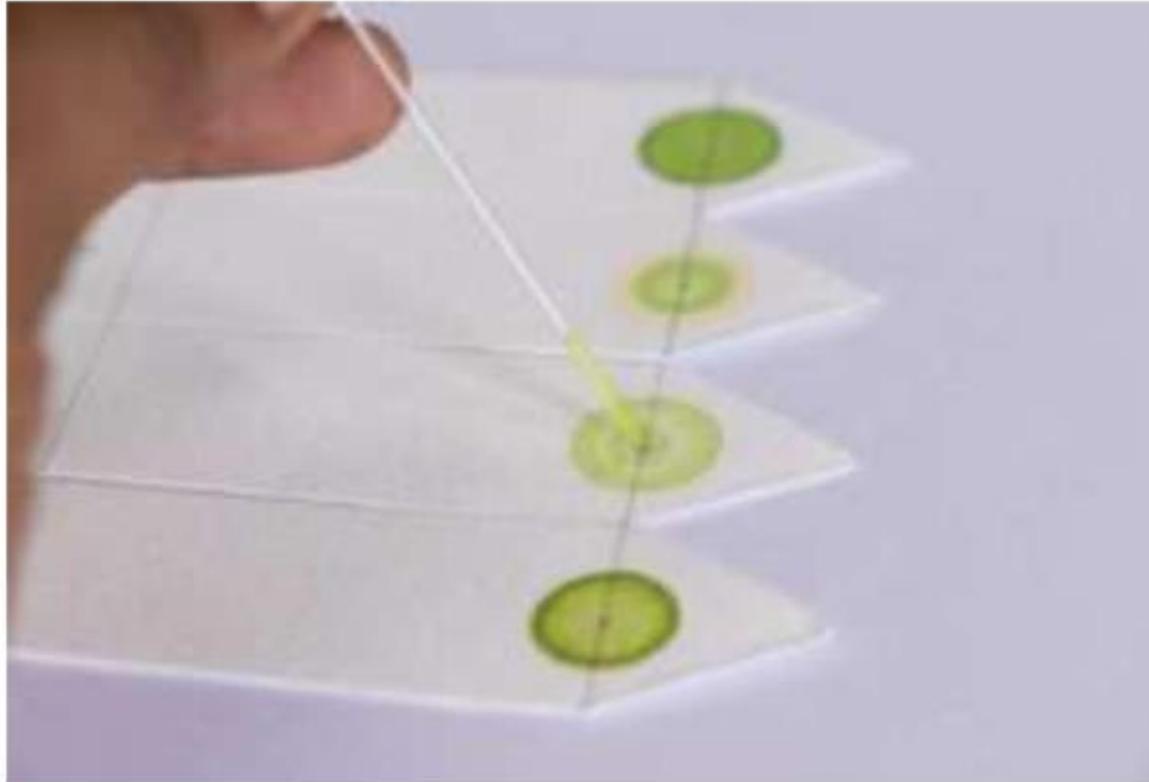
- souvent un **mélange de solvants organiques et de l'eau**.
- Les solvants utilisés sont plus ou moins polaires
- Le choix de la composition de la phase mobile se fait selon la polarité des composants de l'échantillon à analyser
- Ex. de solvants: méthanol, l'éthanol, l'acide éthanoïque et le propanol



Chromatographie sur papier

Méthodologie

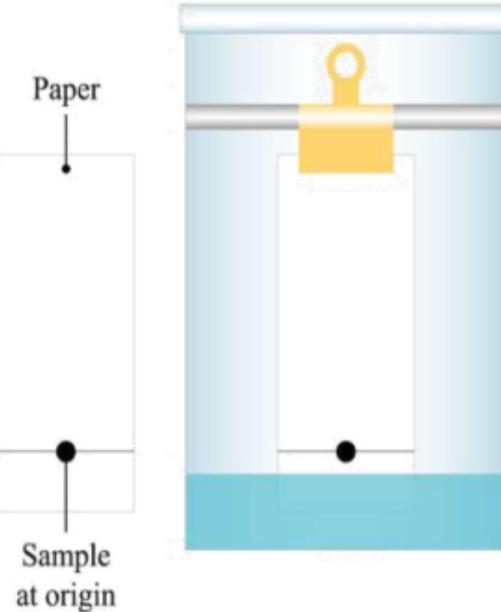
1. Dépôt de l'échantillon



Chromatographie sur papier

Méthodologie

1. Dépôt de l'échantillon



2. Développement (élation)

Chromatographie sur papier

Méthodologie

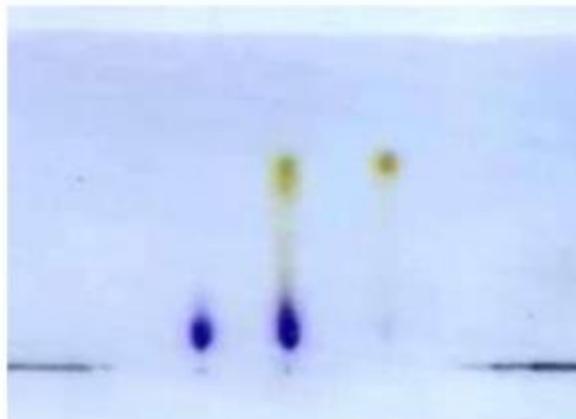
1. Dépôt de l'échantillon
2. Développement (élution)



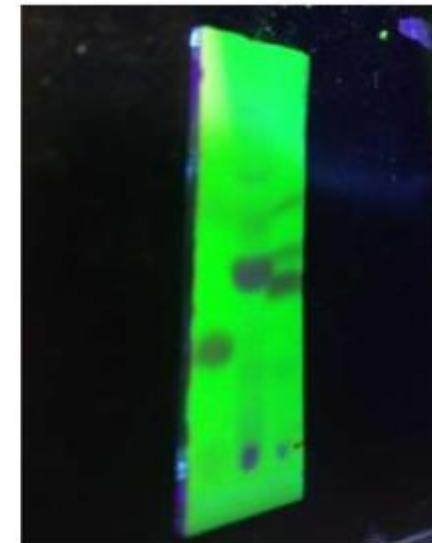
Chromatographie sur papier

Méthodologie

1. Dépôt de l'échantillon
2. Développement (élution)
3. **Révélation**



Spots visibles à l'oeil nu

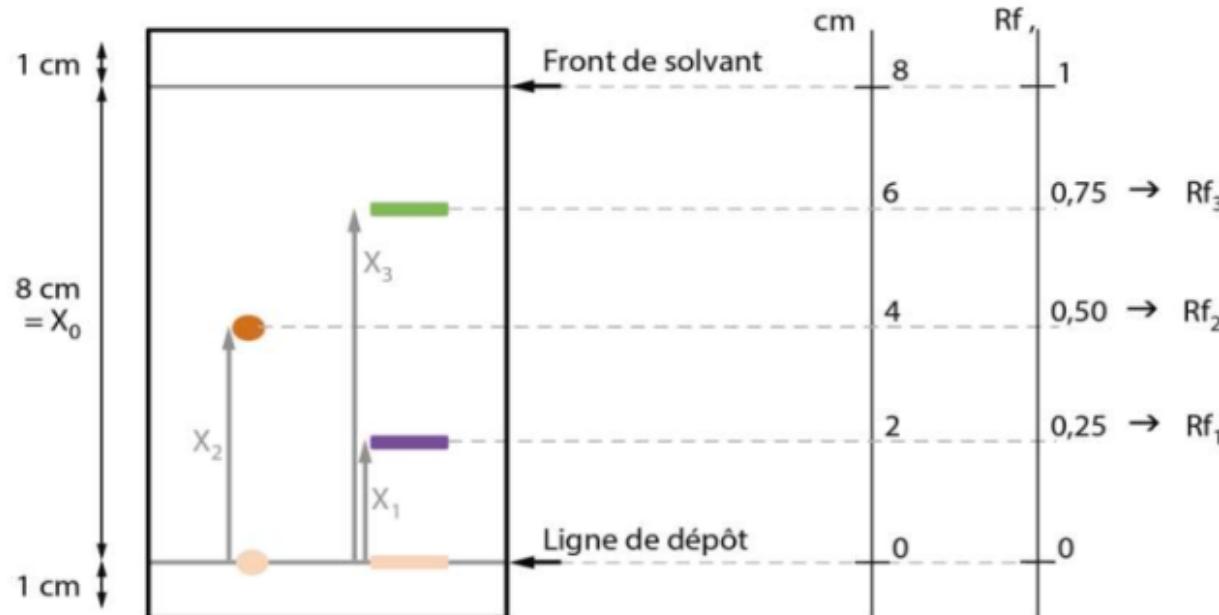


Spots visibles sous lampe UV

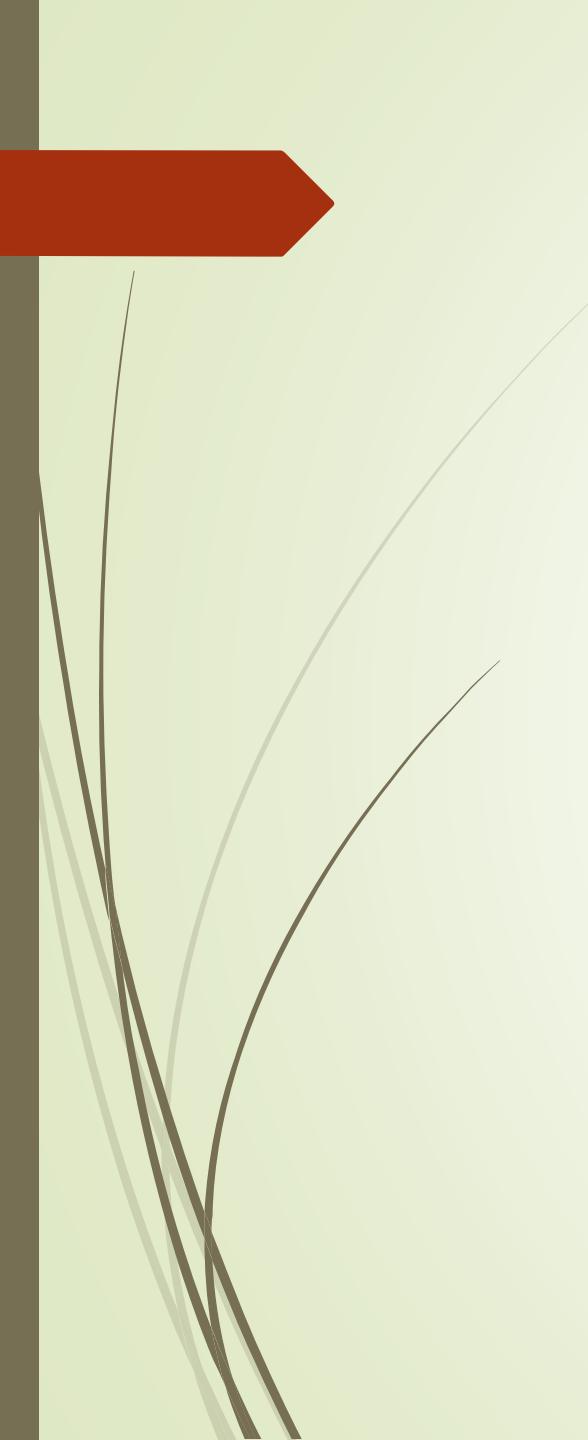
Chromatographie sur papier

Méthodologie

1. Dépôt de l'échantillon
2. Développement (élution)
3. Révélation
4. Calcul de Rf (rapport frontal)



$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par l'échantillon(cm)}}{\text{Front du solvant (cm)}}$$



CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES (CCM)



Chromatographie sur couches minces (CCM)

Contexte et Principe

La chromatographie sur couches minces (CCM):

- Forme de chromatographie planaire la plus couramment utilisée
- Emploie une approche expérimentale très similaire à la chromatographie sur papier.
- La CCM repose sur la séparation des biomolécules d'un mélange sur la base de des phénomènes **d'adsorption et/ou de partage.**
 - pour les phases stationnaires polaires : Phénomène d'adsorption prédominant ;
 - Dans le cas des phases inverses (phases stationnaires hydrophobes) : Phénomène de partage prédominant.

Chromatographie sur couches minces (CCM)

Phase stationnaire

- consiste en une couche adsorbante uniforme sur une plaque souple (polymère ou aluminium) ou rigide (verre).



Silice sur plaque de verre



PLAQUES DE SILICE SUR SUPPORT ALUMINIUM

Chromatographie sur couches minces (CCM)

Phase stationnaire

- Les phases stationnaires adsorbantes les plus couramment rencontrées :
 - Le gel de silice ;
 - L'alumine (pas l'aluminium) ;
 - La cellulose.
- Types d'interactions entre phase stationnaire et analyte : forces électrostatiques / liaisons hydrogène.
- Epaisseur de la couche de phase stationnaire :
 - 0,2 mm (200 μm) pour une plaque analytique
 - 1-3 mm pour une plaque préparative

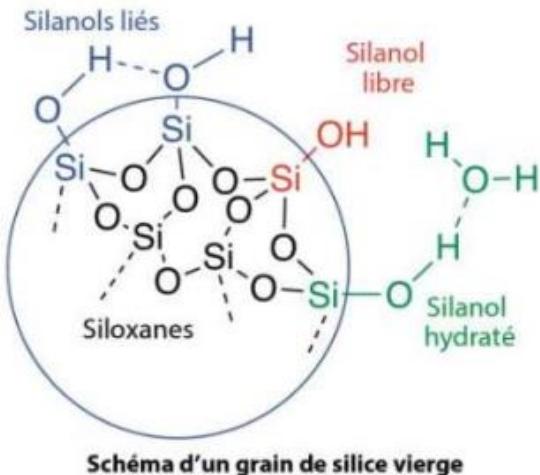


Chromatographie sur couches minces (CCM)

Phase stationnaire

► Silice vierge (ou gel de silice)

La silice vierge est un polymère réticulé de dioxyde de silicium hydraté ($\text{SiO}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_n$). Le cœur des grains de silice est composé de groupements siloxanes (-Si-O-Si-). La surface est recouverte de groupements silanols (alcool libre, SiOH). Certains groupements silanols sont reliés entre eux par des liaisons hydrogènes ou d'autres peuvent être hydratés.



Ce sont les groupements silanols qui confèrent à la silice son caractère polaire mais également un caractère acide, qui peut entraîner des réactions parasites (dégradation des composés).

La silice est le support de base en chromatographie. Elle peut être utilisée directement comme phase stationnaire (support le plus courant en chromatographie sur colonne et en CCM) ou les groupements silanols peuvent être fonctionnalisés pour donner des silices greffées

Chromatographie sur couches minces (CCM)

Phase stationnaire

► Alumine (ou oxyde d'aluminium)

L'alumine est composée d'oxyde d'aluminium hydraté ($\text{Al}_2\text{O}_3\cdot(\text{H}_2\text{O})_n$).

La surface des grains est recouverte de groupements hydroxyles, d'aluminoxanes ($\text{Al}-\text{O}-\text{Al}$) , de cations Al^+ ou d'oxydes anions AlO^- . Cela conduit à trois formes d'alumine en fonction du pH : alumine acide (pH 4-4,5), neutre (pH 7-8) ou basique (pH 9-10).

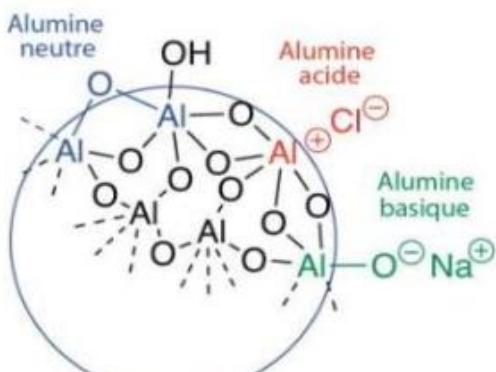


Schéma d'un grain d'alumine

Avantage : les différentes formes d'alumine disponibles en fonction du pH permettent d'adapter la phase stationnaire aux composés à analyser possédant des fonctions sensibles au pH.

L'alumine (sous ses trois formes) est un support classique en CCM.
La rétention sur alumine est similaire à celle sur silice.

Exemple d'application

Purification sur alumine neutre de composés possédant une fonction protonable sur silice vierge.



Chromatographie sur couches minces (CCM)

Phase mobile

- Constituée d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants.
- Choix du solvant : en fonction de la polarité des constituants de l'échantillon.
- Solvants les plus courants : l'hexane, l'acétone et l'alcool.

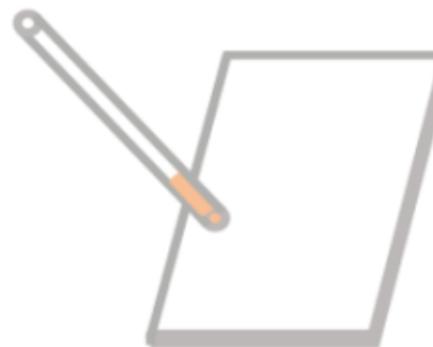


Chromatographie sur couches minces (CCM)

Méthodologie

1. Dépôt de l'échantillon

- Le **dépôt** des échantillons peut être réalisé sous forme de points ou de bandes. Les dépôts sont faits manuellement à l'aide d'un capillaire, d'une pipette ou d'une seringue sur la **phase stationnaire**.

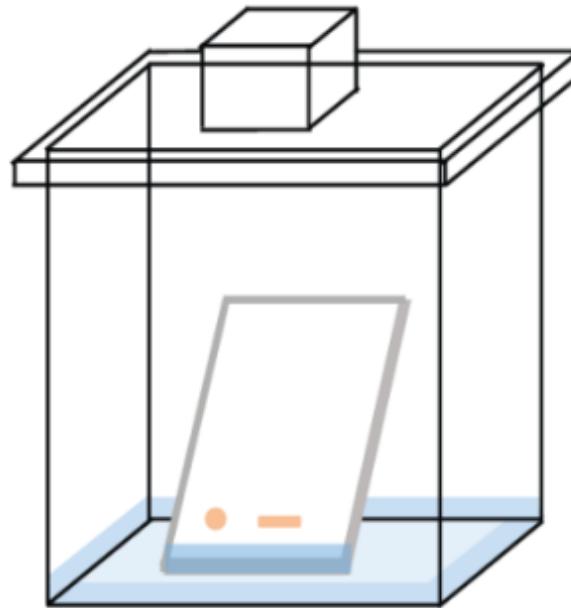


Chromatographie sur couches minces (CCM)

Méthodologie

- L'**élution** est réalisée dans une **cuvette de migration** qui contient une **solution d'élution** = phase mobile

2. Développement (élution)



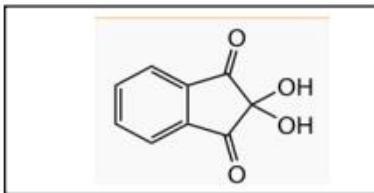
Chromatographie sur couches minces (CCM)

Méthodologie

- La **visualisation** de la plaque peut être effectuée directement à l'œil nu dans le cas de composés visibles et/ou à l'aide d'une lampe UV (pour les composés capables d'absorber ou d'émettre de la fluorescence à 254 nm ou 365 nm).

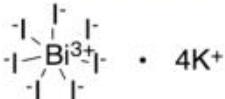
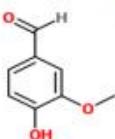


Exemples de quelques révélateurs chimiques



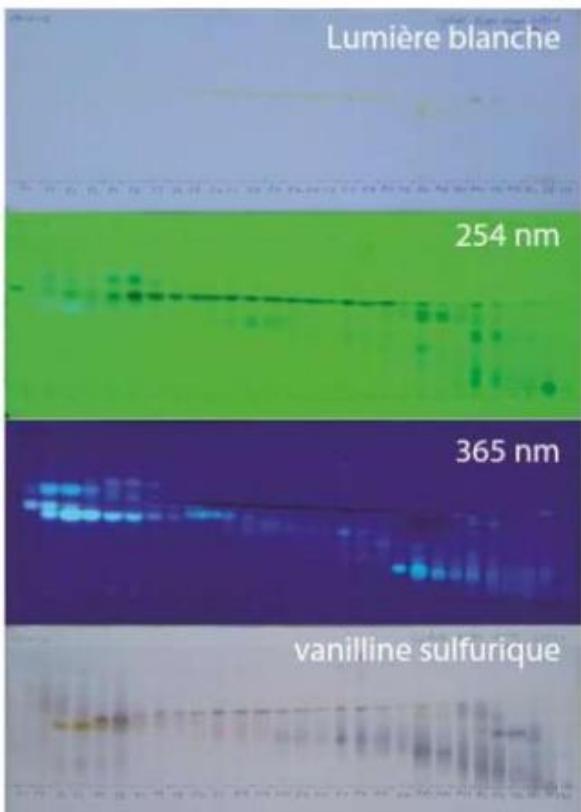
La **ninhydrine**
(2,2-dihydroxy-1H-indene-1,3-dione)

Révélateurs	Réactifs	Molécules ciblées	Visualisation	Couleur de révélation
Molisch	alpha naphtol éthanolique + solution d'acide sulfurique	sucres	lumière blanche	violet
Ninhydrine	ninhydrine	acides aminés	lumière blanche	rouge, jaune
Neu	diphénylborate d'aminoéthanol	polyphénols	UV 365 nm	jaune, vert, bleu
Dragendorff	iodobismuthate de potassium	alcaloïdes	lumière blanche	orange
Vanilline	solution éthanolique de vanilline et d'acide sulfurique	non spécifique	lumière blanche	variable selon les molécules



Chromatographie sur couches minces (CCM)

► Exemple de visualisation d'une plaque CCM selon différents moyens de détection



Peu de composés visibles

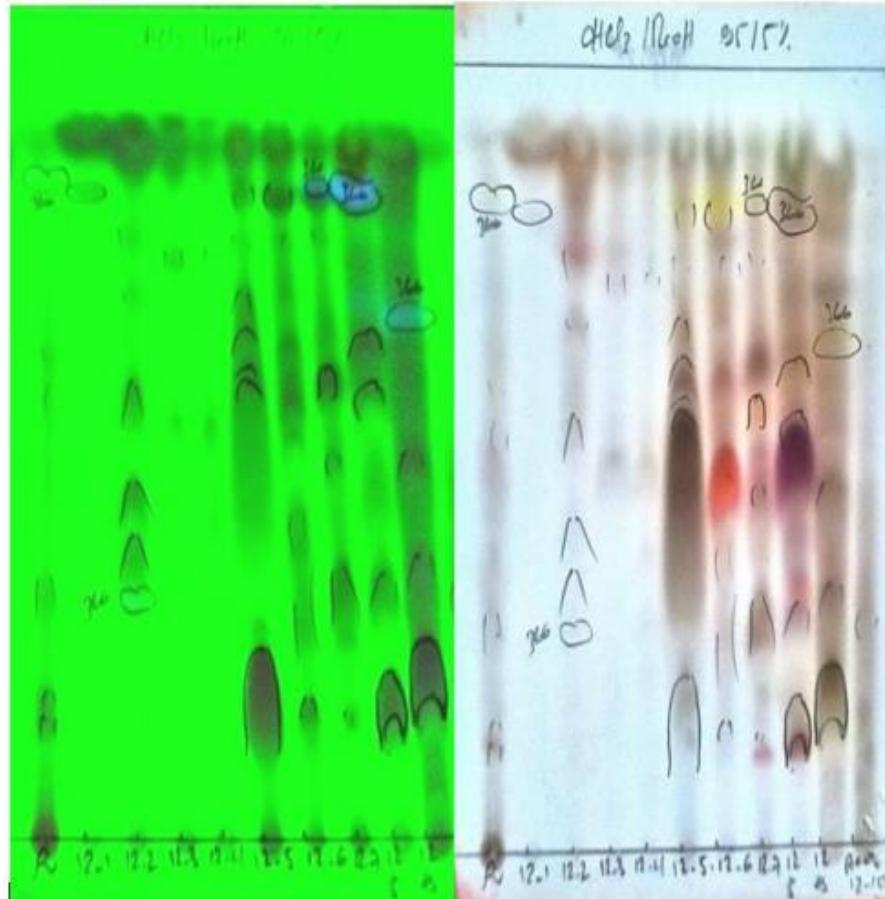
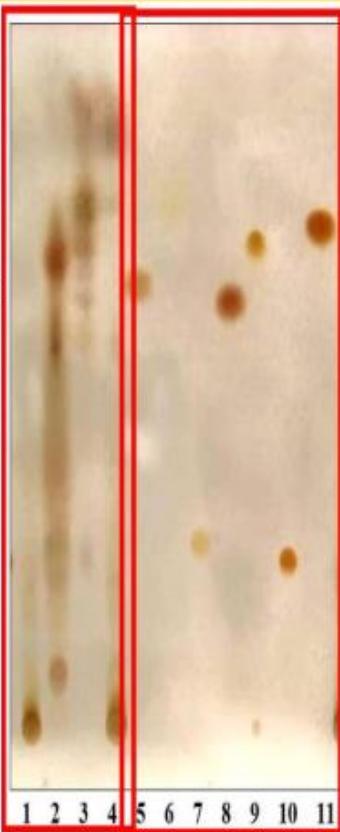
Les plaques « F254 » possèdent dans leur phase stationnaire un indicateur de fluorescence vert (parfois bleu) permettant de visualiser les substances qui absorbent dans l'UV à 254 nm (absorbance caractéristique des noyaux aromatiques). Celles-ci apparaissent en sombre sur le fond fluorescent.

Les molécules fluorescentes sont visibles à 365 nm sur fond sombre.

Révélation chimique non spécifique de l'ensemble des composés présents sur la plaque.

Exemple de CCM : Chromatographie sur couches minces d'extraits végétaux.

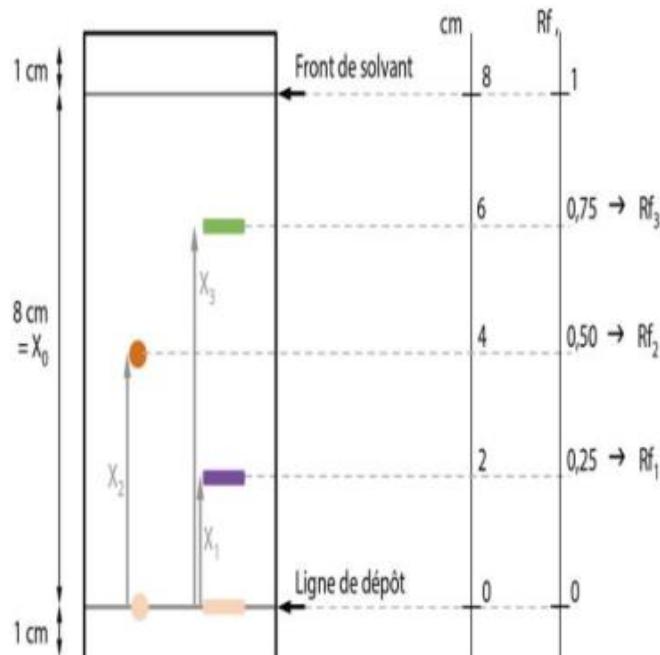
- De 1 à 4 : Extraits végétaux ;
- De 5 à 11 : témoins de composés phénoliques:
 - 5 : Acide gallique
 - 6 : Flavone
 - 7 : Naringine
 - 8 : Catéchine
 - 9 : Morine
 - 10 : Rutine
 - 11 : Quercétine.



Chromatographie sur couches minces (CCM)

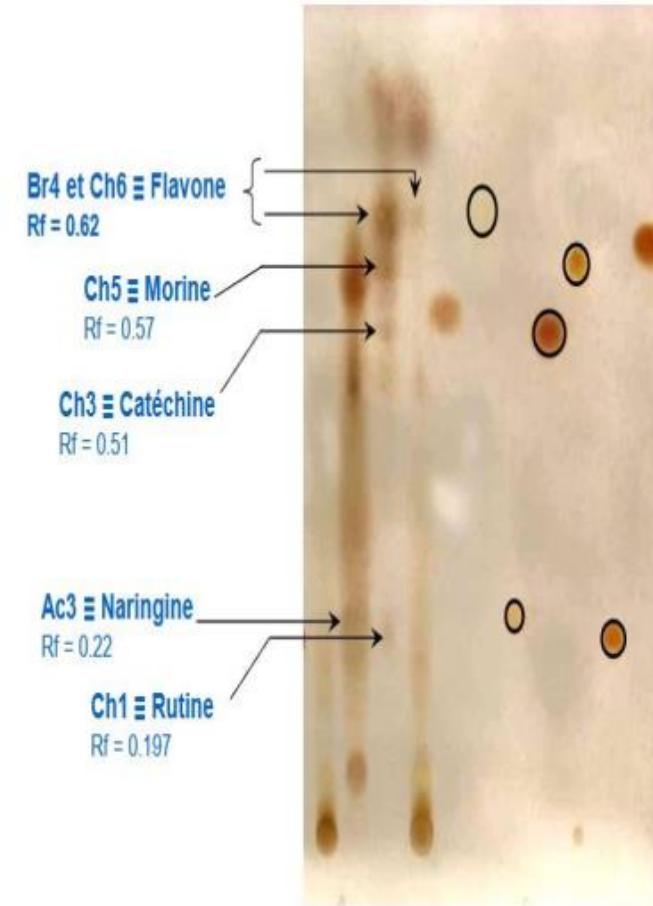
Méthodologie

4. Calcul de Rf



$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par l'échantillon(cm)}}{\text{Front du solvant (cm)}}$$

Exemple de CCM analytique : Chromatographie sur couches minces d'extraits végétaux.



Efficacité d'une CCM

On peut déterminer l'efficacité **N** d'une plaque CCM et la hauteur **H** de plateau théorique pour un composé dont la distance de migration est **X** et le diamètre du spot **W** par les relations:

$$N = 16 (X^2/W^2) \quad \text{et} \quad H = X/N$$

Le facteur de rétention **K** d'un composé ou la sélectivité entre deux composés sont reliés aux distances de migration sur la plaque et aux temps de migration. En admettant que le rapport des vitesses μ et μ_0 de migration sont les mêmes sur la plaque et sur la colonne (extrapolation) on peut écrire les relations suivantes:

$$R_F = X/X_0 = \mu/\mu_0 = t/t_0 = 1/K+1 \quad \text{soit} \quad K = 1/R_F - 1$$

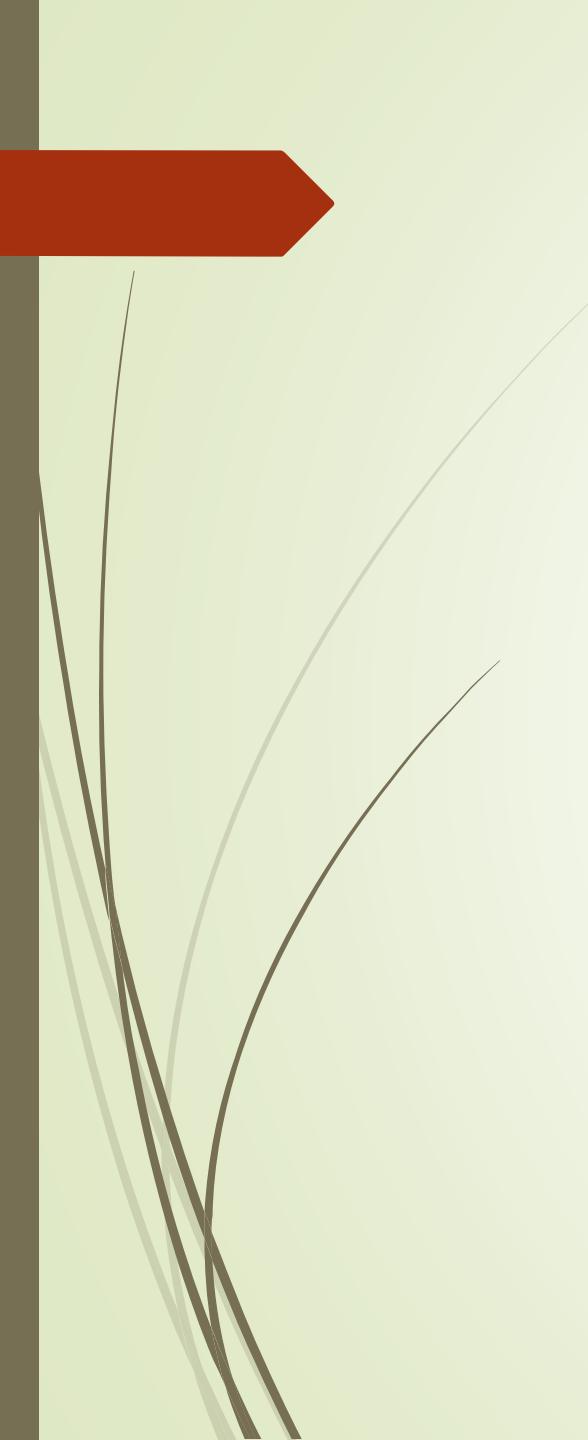
La résolution est donnée par la relation suivante:

$$R = 2 (X_2 - X_1) / (W_1 + W_2)$$



Chromatographie sur couches minces (CCM)

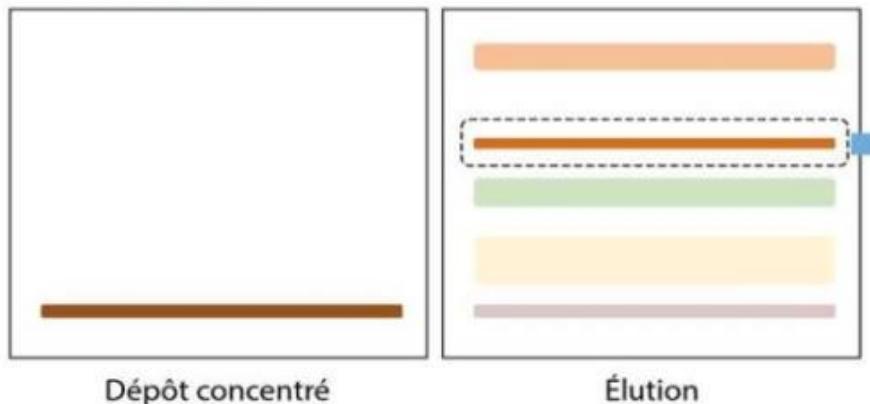
- **CCM analytique** : permet l'identification de composés par comparaison à un produit de référence déposé sur la même plaque.
- permet aussi d'avoir un premier aperçu du contenu moléculaire d'un échantillon avant l'utilisation de méthodes de caractérisation plus poussées (criblage ou screening)
- **CCM préparative** : permet la purification des molécules.



LA CCM PRÉPARATIVE

CCM préparative

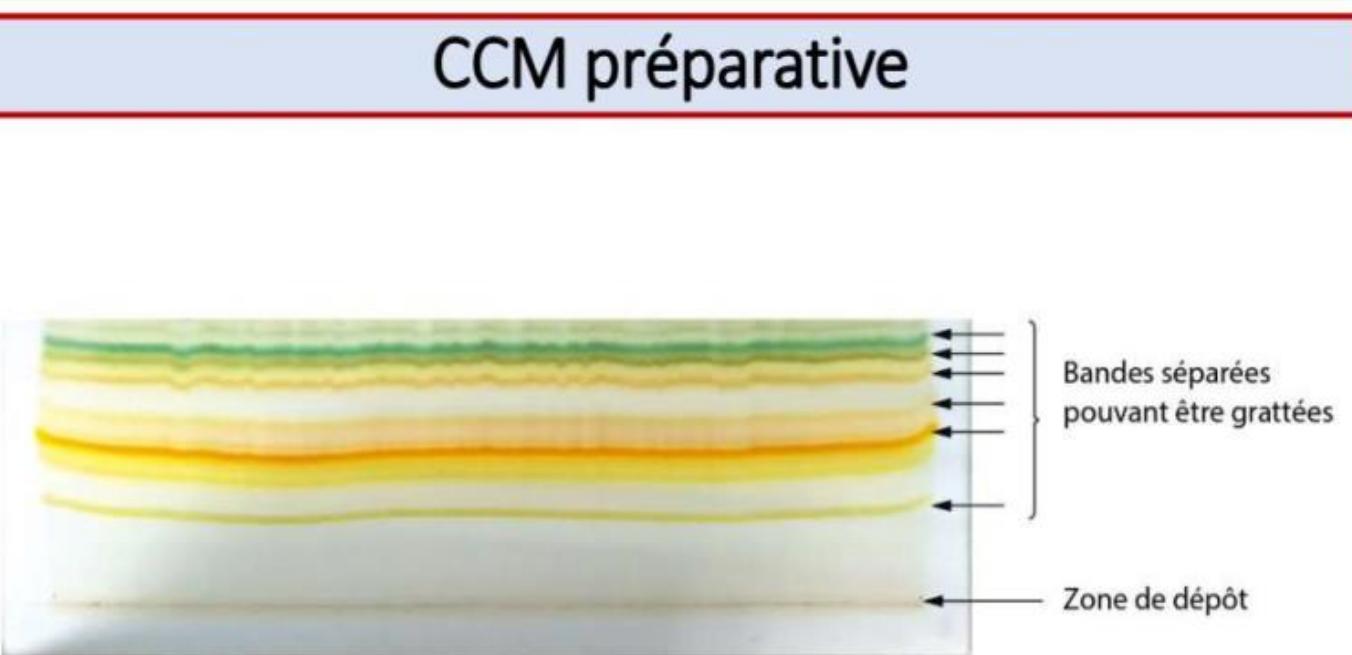
- Utilisées pour la **Purification** de molécules
- Consiste à déposer une grande quantité d'extrait sur toute la largeur de la plaque et à faire migrer celle-ci avec un système d'élution optimisé au préalable.
- Cela permet de séparer la/les bande(s) d'intérêt par grattage de la silice et désorption dans un solvant approprié



- 1) Grattage
- 2) Récupération de la silice imprégnée du produit d'intérêt
- 3) Désorption par solubilisation puis filtration pour éliminer la silice



CCM préparative



Fractionnement d'un extrait de plante par CCM préparative



CCM préparative

Caractéristiques des plaques adaptées pour réaliser une CCM préparative :

- dimension de la plaque : 20 x 20 cm ;
- migration sur plaque entière (environ 15cm) ;
- épaisseur de phase stationnaire 0.5, 1 ou 2mm.