

# Chapitre V. Méthodes physico-chimiques d'analyse des médicaments

---

## 1. Méthodes chromatographiques : Chromatographie sur couche mince

Dr. FIZIR MERIEM

### Méthodes chromatographiques

La chromatographie est une méthode d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange ; les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile ; ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur.

#### 1. Classification des techniques chromatographiques

Les méthodes chromatographiques se classent en trois façons:

##### a. Classification selon la nature physique des phases

Selon la nature de la phase mobile on distingue:

- ✚ la chromatographie en phase liquide (CPL)
- ✚ la chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Selon la nature de la phase stationnaire on distingue:

- ✚ la chromatographie liquide/solide (CLS)
- ✚ la chromatographie liquide/liquide (CLL)
- ✚ la chromatographie gaz/solide (CGS)
- ✚ la chromatographie gaz/liquide (CGL)

##### b. Classification selon le mécanisme de rétention

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. On distingue ainsi: la chromatographie d'adsorption, de partage, d'échange d'ions, d'exclusion et la chromatographie d'affinité.

##### c. Classification selon la technique mise en jeu

Selon la technologie mise en jeu on distingue :

- ✚ La chromatographie sur colonne
- ✚ La chromatographie de surface (chromatographie sur papier ou chromatographie sur

couche mince). Dans ce chapitre on va présenter CCM.

#### 2. Choix de la technique

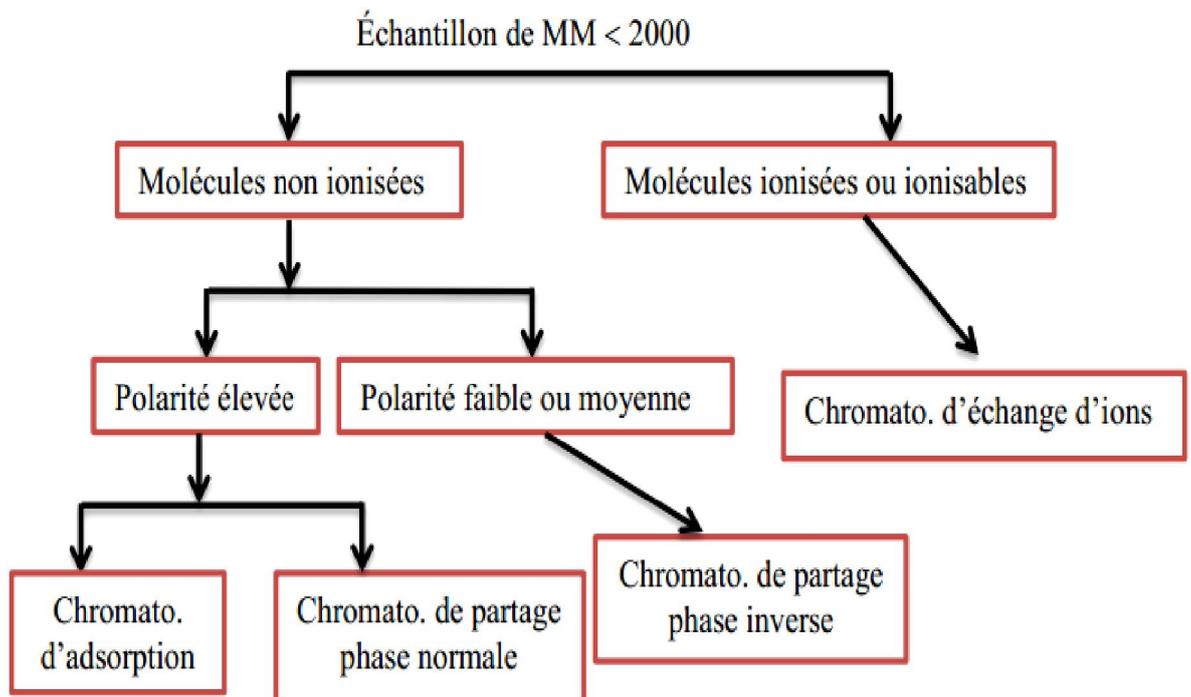
Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes. Le choix de l'une

## Chapitre V. Méthodes physico-chimiques d'analyse des médicaments

ou l'autre dépend :

1. *de la nature du soluté* : gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...
2. *du but de l'analyse* : identification, contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages, quantification...

Chromatographie d'exclusion correspond à la séparation des molécules de masses moléculaires supérieures à 2000.



### I. Chromatographie sur couche mince

#### 1. Définition

**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. La figure.1 représente les principaux éléments d'une séparation CCM.

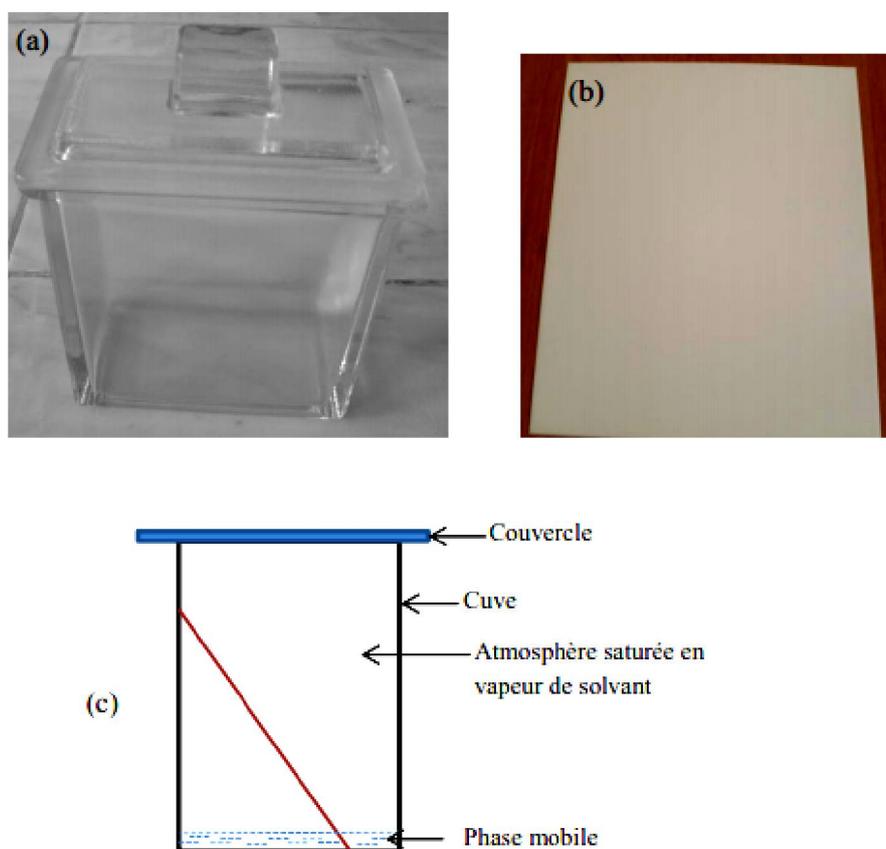


Fig.1 (a) Cuve chromatographique (b) Plaque CCM

(c) Schéma d'un montage CCM.

#### 2. Appareillage

*La cuve chromatographique* : un récipient habituellement en verre de forme variable ; fermé par un couvercle étanche.

## Chapitre V. Méthodes physico-chimiques d'analyse des médicaments

---

*La phase stationnaire* : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixé sur une plaque de verre ou une feuille de matière plastique ou d'aluminium à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté, l'amidon ou polymère organique.

*L'échantillon* : environ 1 µl de solution diluée (2 à 5% de mélange à analyser) déposé en un point repère 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.

### 3. Adsorbants

Les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine et la cellulose. Ils sont utilisés dans une granulométrie plus grande en chromatographie sur colonne. La taille des grains, leur surface spécifique, le volume des pores, leur diamètre et la répartition granulométrique définissent les propriétés des matériaux utilisés. Pour la nano-CCM, la taille des particules est de l'ordre de 4 µm et celle des pores de 6 nm.

### 4. L'éluant

L'éluant peut être composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants ; il ne doit pas être ni trop polaire (entraînant les composants) ni trop apolaire (empêchant leur migration). Les solvants sont caractérisés par leur différence de polarité et leur non miscibilité.

A l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée de l'autre d'environ 1 cm. L'éluant qui aura entraîné le soluté à une distance proche de la moitié de la plaque sera considéré comme bon éluant.

Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'éluant et le soluté.

✚ **La solubilité** : on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.

✚ **La polarité** de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre.

### 5. Dépôt de l'échantillon

De faible quantité de l'échantillon dissous dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant. On trace sur la plaque à 1 cm du bord inférieur un très fin trait au crayon de papier qui servira à repérer les dépôts ; on veillera surtout à ne pas abîmer la surface de la plaque. L'échantillon est déposé ensuite à l'aide de micropipette ou de tube capillaire en un point sur le trait. Les produits non volatils sont aisément analysables ; les composants de l'échantillon sont volatils : aldéhydes, cétones aliphatiques ou aromatiques, acides monocarboxyliques, amines primaires ou secondaires ; nécessaire de les chromatographier sous forme de sels.

### 6. Développement de la plaque

La plaque préparée est introduite en position verticale dans la cuve et l'éluant qui en recouvre le fond monte par capillarité, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Lorsque le niveau atteint par le solvant est d'environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve.

On peut utiliser une chromatographie bidimensionnelle dans le cas où le mélange contient des solutés de polarités voisines : sur le même support, on réalise une première chromatographie à l'aide d'un système de solvants, puis une deuxième à l'aide d'un second système de solvants, dans une direction perpendiculaire à la première.

### 7. Révélation

Lorsque les composants de l'échantillon à analyser 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 :

- ✚ A l'œil nu : si le produit est coloré
- ✚ Radiation UV : en exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés apparaissent sous formes de tache brillantes.
- ✚ Fluorescence : si un indicateur de fluorescence est incorporé à l'adsorbant ; la plaque entière devient fluorescente lorsqu'elle est soumise à radiation UV. Les composés sont révélés sous forme de taches sombres.
- ✚ Iode : l'iode réagit avec un grand nombre de composé organique en formant des complexes jaunes. La révélation est réalisée en mettant la plaque, préalablement

séchée en présence de quelques cristaux d'iode dans un récipient; fermé ensuite pour saturer de vapeur.

- ✚ Atomisation : elle consiste à pulvériser un réactif sur la plaque ; ce qui entraîne une destruction ou une altération permanente des composés.

### 8. Paramètre de séparation

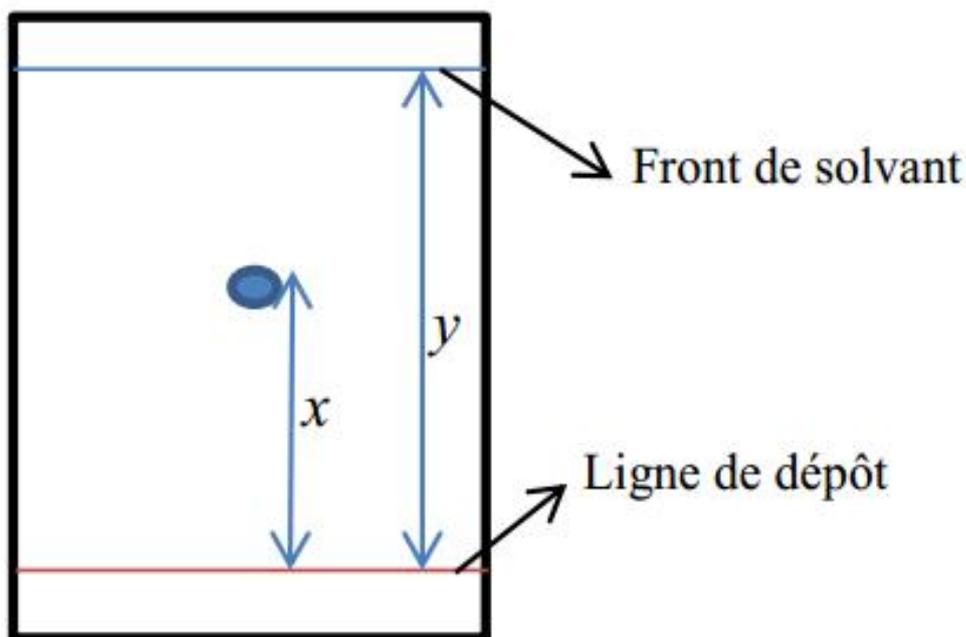
Chaque substance est caractérisée par sa mobilité appelée rapport frontal (Fig.2).

Le rapport frontal ou rétention frontale ( $R_f$ ) de chaque composé est défini par le rapport :

$$R_f = x/y = (\text{valeur entre 0 et 1})$$

$x$  : distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache)

$y$  : distance parcourue par le front de solvant.



**Fig.2** Plaque CCM : calcul du rapport frontal

Le  $R_f$  d'une substance est une constante et constitue une des caractéristiques physiques. On peut donc se servir de cette valeur pour identifier une substance inconnue. Lorsque la polarité de l'éluant augmente, le  $R_f$  augmente.

### 9. Efficacité d'une plaque CCM

L'efficacité  $N$  d'une plaque CCM et la hauteur  $H$  de plateau théorique pour un composé est donné par les relations :

$$N = 16 \frac{x^2}{w^2} \quad \text{et} \quad H = \frac{x}{N}$$

La résolution est exprimée par la relation:

$$R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_2 + w_1}$$

$w$  est le diamètre de spot

### 10. Applications

La CCM présente plusieurs applications ; elle permet le contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique, le suivi de la réaction chimique ou d'un fractionnement chromatographique sur colonne et la recherche du meilleur solvant, avant d'entamer une séparation sur colonne classique. Elle permet également la purification de petites quantités de produit (jusqu'à 100 mg). La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant.

Le succès de ce mode de chromatographie est dû notamment à la facilité de sa mise en œuvre et à la possibilité de son emploi dans le domaine analytique que dans le domaine préparatif.

#### Exercice

Un échantillon contenant deux composés A et B est séparé par CCM. Au bout de 15 min de développement, le front du solvant est à 8,3 cm du départ, le composé A à 7,5cm et le composé B à 2,3 cm. Calculer le  $R_f$  des deux composés