

Expérience # 4

Caractérisation d'un analgésique par CCM

1. But

Le but de l'expérience consistera à identifier et à prouver les composés chimiques trouvés dans un comprimé d'analgésique commercial par chromatographie sur couche mince.

2. Théorie

La chromatographie est une technique utilisée pour séparer les constituants d'un mélange et pour purifier des substances. Bien que cette technique ait été développée à l'origine pour séparer des substances colorées (d'où le nom, Chroma (grec signifie couleur)), la chromatographie est de nos jours utilisée pour séparer tous les types de substances, y compris celles qui sont incolores.

Le principe de base de la technique réside dans la différence d'affinité d'un soluté envers une phase stationnaire (l'adsorbant) et une phase mobile (l'éluant). Évidemment, ces phases ne doivent pas réagir chimiquement l'une avec l'autre. Au contact de ces deux phases, un soluté sera séparé des autres solutés selon sa plus ou moins grande affinité pour ces phases.

Lors de cette expérience, nous utiliserons la technique de chromatographie sur couche mince. La phase stationnaire sera un gel de silice déposé en couche mince sur un support inerte (plaque de verre, de polymère...). L'échantillon qui contient les solutés à séparer sera déposé sur la plaque à l'aide d'un capillaire. L'usage d'un tube capillaire est nécessaire car nous souhaitons utiliser une très petite quantité de produits. Enfin, un solvant de polarité différente de celle de la phase stationnaire sera utilisé en guise d'éluant. Lorsque la plaque de ccm sera mise en contact avec la phase mobile, il y aura ascension du solvant (de l'éluant) sur la couche mince par effet de capillarité. Lorsque l'éluant entrera en contact avec les gouttes d'échantillon déposées sur la couche mince, il y aura élution de ces dernières... Les particules ayant le plus d'affinité avec l'éluant migreront avec le front de solvant (le front d'élution). La figure 1 qui suit montre un exemple de la séparation d'un mélange de 2 composés.

Le point de départ indique le niveau auquel le mélange a été déposé à l'aide du capillaire. Comme nous pouvons le constater, ce niveau est supérieur à celui de l'éluant dans le contenant. Il faut retenir que le but est d'éluer, d'entraîner les solutés... Si la tâche était déposée à un niveau inférieur à celui de l'éluant, les composés migreraient dans la solution d'éluant au lieu de migrer sur la plaque chromatographique ☺.

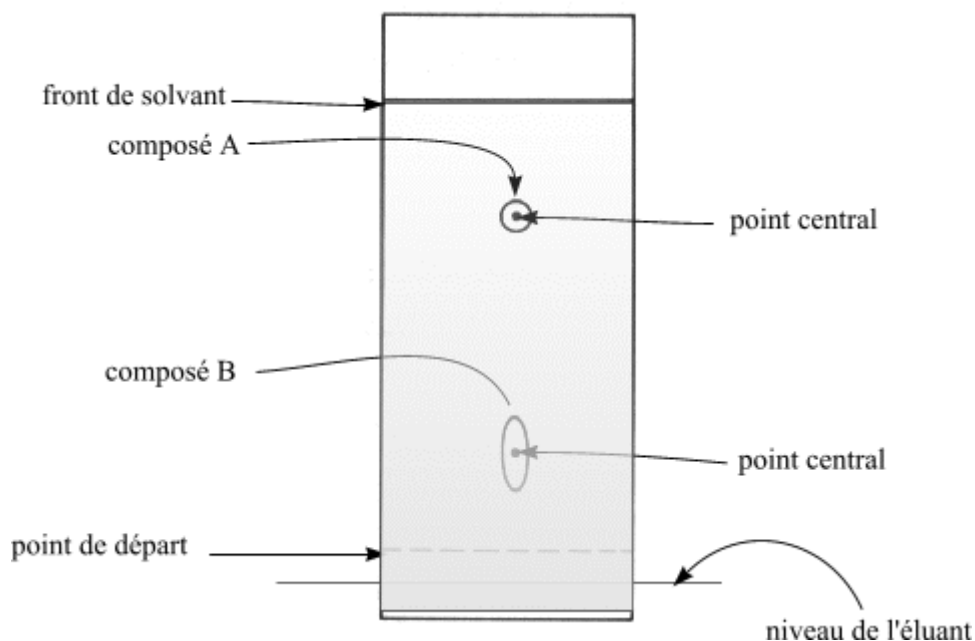


Figure 1. Exemple de l'éluion sur CCM

La figure 1 nous montre clairement que le composé A possède une plus grande affinité pour l'éluant. C'est donc pour cette raison qu'il migre (élué) plus facilement avec ce dernier. Il est possible de quantifier ce facteur pour chaque composé dans les conditions de l'expérience (type de support et d'éluant). C'est pour cette raison que l'on peut calculer le R_f (Rate of flow).

$$R_f = \frac{\text{distance (cm) parcourue par le composé}}{\text{distance (cm) parcourue par l'éluant}} \quad \text{éq. 1}$$

Le R_f permettra donc de confirmer l'identification d'une substance inconnue par rapport à un standard. La distance parcourue par le composé correspond à la longueur entre le point de départ et le centre de la tâche (point central). Celle de l'éluant correspond à la distance entre le point de départ et le front de solvant (d'éluion). Il est évidemment très important de marquer ces deux derniers points sur la plaque chromatographique (le point de départ est marqué avant de déposer la plaque dans l'éluant). Ces coordonnées doivent être indiquées avec un crayon et non pas avec un stylo car les encres migreront avec le front d'éluion.

La dernière difficulté consiste à identifier la position des composés sur la plaque après l'éluion. Dans certains cas, lorsque les composés sont colorés dans le visible, cela ne pose pas de difficultés. Cependant, ce n'est pas le cas de la majorité des composés!!! Dans la plupart des cas, il faudra utiliser un révélateur. Pour notre expérience, les plaques sont enduites d'un substrat fluorescent qui permettra de détecter les tâches à l'aide d'une

lumière ultraviolette. Il est impératif de marquer la tâche à l'aide d'un crayon ou d'un stylo afin de pouvoir se rappeler de la forme et de la position de cette dernière.

Une autre technique employée pour révéler les plaques chromatographiques consiste à les exposer à la vapeur d'iode moléculaire. Cette technique permet de brûner (de marquer) les tâches sur le chromatogramme.

Enfin, il existe plusieurs autres techniques chromatographiques qui s'appuient sur des principes similaires :

- La chromatographie gazeuse (GC) : elle consiste à faire passer les vapeurs du mélange (phase mobile) à travers un tube chauffé renfermant un liquide non volatil (phase stationnaire) adsorbé sur un support solide. La séparation est alors principalement fonction de la température d'ébullition des solutés.
- La chromatographie sur papier : un papier filtre sert de support solide et l'eau adsorbée par la cellulose du papier sert de phase stationnaire. Une petite quantité du mélange à séparer est placée sur le papier et l'éluant se déplace à travers et tout le long du papier par capillarité. Cette technique ressemble étrangement à la chromatographie sur couche mince.
- La chromatographie sur colonne : Une solution du mélange à séparer sera versée au haut d'une colonne (semblable à une burette) remplie d'un solide finement pulvérisé (la phase stationnaire) précédemment humecté de solvant. L'éluant est effectuée en laissant couler l'éluant au travers la colonne. Durant son passage à travers la colonne, il entraînera avec lui les constituants du mélange qui seront sélectivement adsorbés et désorbés.

L'ampleur de l'adsorption est une fonction des structures moléculaires des différents composés à séparer. Généralement les composés polaires sont plus fermement adsorbés et restent dans la colonne plus longtemps, tandis que les composés moins polaires se déplacent à travers la colonne plus rapidement. Quelquefois plusieurs solvants ou mélanges de solvants peuvent être requis pour éluer les substances de la colonne. On utilise généralement au départ un solvant relativement non polaire, puis on passe graduellement à des solvants plus polaires. (Cela dépend de la polarité de la phase stationnaire).

* Skoog, West et Holler, *Chimie analytique*, 7^{ième} édition, De Boeck Université, Paris (1997). pages 721-4; 660-4.

3. Mode opératoire

1. Préparez quelques capillaires en étirant une pipette pasteur à l'aide d'un brûleur. Une démonstration sera effectuée au début du laboratoire.

***** Il est IMPÉRATIF d'effectuer cette étape AVANT de commencer à préparer l'éluant... *****

Les solvants utilisés pour la préparation de l'éluant sont très volatils et surtout TRÈS inflammables. Nous ne voulons absolument pas risquer d'en enflammer les vapeurs ☺. *Les éluants A et B seront déjà préparés. La recette est quand même indiquée ci-après.*

2. Préparez environ 20 mL de l'éluant (*éluant A*) suivant en travaillant sous une hotte: 50% dichlorométhane, 40% éther diéthylique, 10% acide acétique. Assurez-vous d'une bonne homogénéité. Versez une partie de ce mélange dans un bécher de 100 mL et déposez un verre de montre sur le tout. La hauteur de l'éluant dans le bécher devrait être entre ½ et 1 cm.
3. Versez une partie d'un mélange similaire dans lequel l'acide acétique est substitué par du méthanol (*éluant B*) dans un bécher de 100 mL et déposez un verre de montre sur le tout. La hauteur de l'éluant dans le bécher devrait être entre ½ et 1 cm.
4. Dissolvez individuellement une petite quantité de vos étalons d'aspirine, de caféine et de tylenol dans un peu de méthanol. Chaque solution peut être réalisée dans une petite éprouvette munie d'un bouchon (n'oubliez pas de bien identifier).
5. Broyez un comprimé quelconque et préparez une solution comme à l'étape précédente (Cette étape est déjà faite. N'oubliez pas de noter la nature du comprimé étudié).
6. Procurez vous une éprouvette de la solution inconnue dont vous noterez le numéro.
7. Estimez la distance que vous pouvez laisser entre les taches que vous déposerez sur vos plaques. Vous devrez préparer trois plaques qui comprendront chacune vos trois étalons ainsi qu'un inconnu (sur une plaque, l'analgésique et sur l'autre, votre inconnu. Sur la troisième, vous n'utiliserez que vos trois étalons). Marquez aussi le point de départ sur votre plaque (choisissez-le et marquez-le intelligemment). Déposez des taches de 1 à 2 mm de diamètre sur les plaques (au niveau que vous aurez choisi).
 - Il est fortement suggéré de vous pratiquer à déposer les taches sur un papier filtre avant de commencer sur vos plaques.

- Il est important de prévoir un capillaire différent pour chaque solution et il serait encore une fois important de l'essayer avant de déposer sur votre plaque chromatographique.
8. Laissez sécher les points et déposez doucement vos plaques dans les béchers prévus pour l'élution (la troisième plaque sera immergée dans l'éluant que vous n'avez pas préparé vous-même). Laissez éluer aussi longtemps que possible.
 9. Sortez les plaques, notez le front d'élution et laissez-les sécher à l'air.
 10. Essayez de localiser les taches à l'oeil nu et dessinez ce que vous voyez. Utilisez ensuite une lampe à rayons ultraviolets et reproduisez encore ce que vous observez. Mesurez la hauteur de déplacement des taches afin de reproduire aussi fidèlement que possible vos observations. Déposez enfin vos plaques dans un contenant saturé de vapeurs d'iode et laissez les taches révéler. Assurez-vous de ne pas coller les plaques ensemble (du côté où le gel de silice est déposé). Sortez le tout et reproduisez vos observations.

4. Cahier de laboratoire

1. Titre de l'expérience
2. But
3. Données et observations
 - Reproduisez le plus exactement possible (à l'échelle) vos observations des trois chromatogrammes à l'œil nu, avec une lampe UV et après révélation à l'iode.

5. Rapport de laboratoire

1. Page titre
2. Données observations et calculs (4,0 pts)
 - Reproduisez le plus exactement possible (à l'échelle) vos observations des deux chromatogrammes à l'œil nu, avec une lampe UV et après révélation à l'iode. N'oubliez pas de bien indiquer l'éluant (nature), le point de départ, la nature des points, les distances et la hauteur du front d'élution. Traitez ces chromatogrammes de la même façon qu'un graphique.
 - Donnez l'exemple du calcul d'un Rf.
3. Résultats et explications (6,0 pts) ***** La qualité est évaluée*****
 - Dressez deux tableaux des Rf's calculés pour chaque espèce des étalons et des inconnus. Disposez ces Rf's dans deux tableaux afin de comparer facilement les composés. Le premier tableau sera pour l'identification des inconnus dans l'éluant # 1 et le second comparera les Rf's des étalons dans les deux éluants.
 - Dressez la composition de votre comprimé inconnu de marque _____ et de votre échantillon inconnu # _____.
 - Donnez la formule chimique (sous forme stylisée) des trois étalons.
 - Classez les trois étalons par ordre de polarité croissante et justifiez tous vos choix en fonction des résultats des chromatographies... Soyez aussi clair que possible tout en étant bref ☺. L'éluant sans acide acétique vous donnera des informations très utiles pour comparer la polarité.
 - Comparez les deux éluants (polarité, ordre d'élution, qualité de la séparation, effet de l'acide acétique sur les composés).