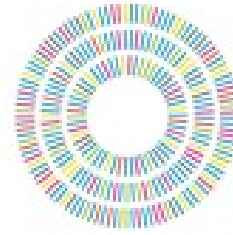




Laboratoire
Pluridisciplinaire de
Criminalistique

Les Sciences Physiques et Chimiques
au Service de la Justice



GENOPOLE
VIVRE L'INNOVATION

fête de
la Science
2020

CRIMINALISTIQUE

DIFFÉRENCIATION DES ENCREs PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE PARTIE 2/2

Dr. Guillaume BOUDARHAM – LPC-EXPERT (Campus 1 – Bât. 8 – Port. 06 88 61 52 00)

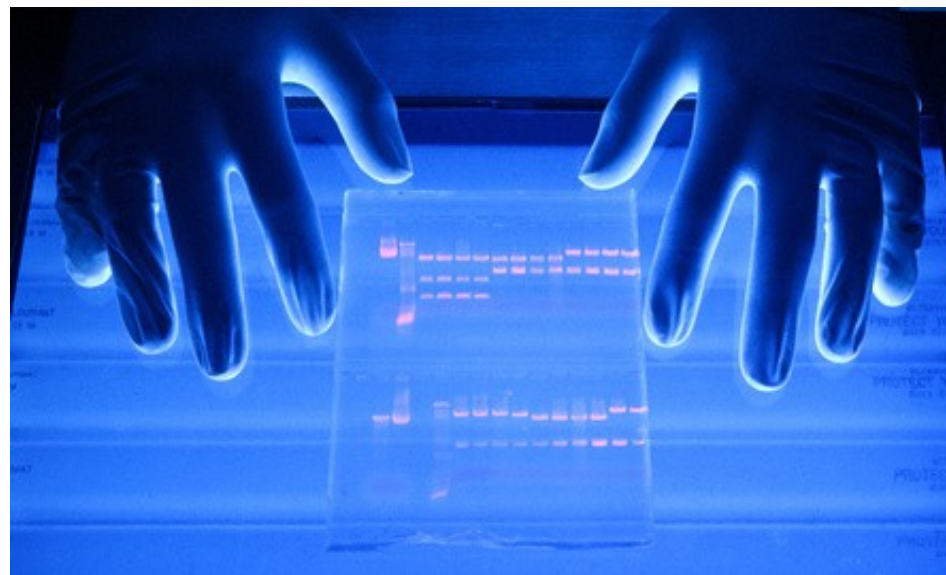
Contact : guillaume.boudarham@lpc-expert.fr



Définition de la chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique qui sert à séparer les différents composés présents dans un mélange

C'est une technique simple à mettre en œuvre, rapide, économique et polyvalente





Historique des techniques chromatographiques

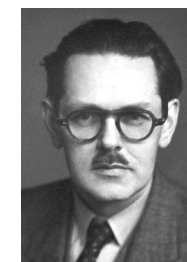
- 1906 : le botaniste russe M. Tswett a séparé des pigments végétaux colorés en les entraînant avec de l'éther de pétrole sur une colonne remplie de carbonate de calcium



- 1930 : E. Lederer a purifié par la méthode de Tswett la lutéine du jaune d'œuf



- 1940 : J.P. Martin et R. Synge ont développé la pratique et la théorie de la chromatographie et obtiennent le prix Nobel en 1952



- 1952 : mise au point de la chromatographie en phase gazeuse (CPG)

- 1968 : mise au point de la chromatographie liquide haute performance (HPLC)

- 1979 : première séparation chirale par HPLC



Applications de la chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince peut être utilisée dans différents domaines pour analyser rapidement un grand nombre de substances :

- médicaments (contrôle qualité...)**
- aliments (pesticides, substances interdites...)**
- cosmétiques (constituants des parfums...)**
- analyses environnementales (polluants...)**
- lutte contre la fraude**
- sciences forensiques (analyse des encres, stup...)**

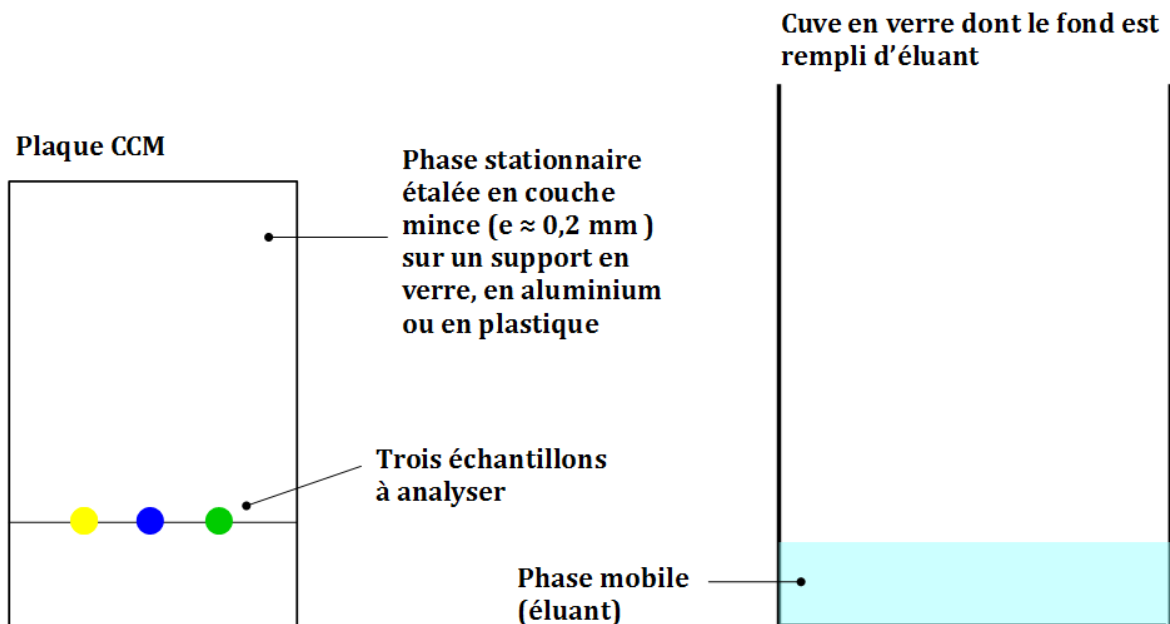




Principaux éléments pour faire une chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince comprend :

- **une cuve chromatographique : récipient en verre fermé par un couvercle étanche**
- **une phase stationnaire (solide) : matériau étalé en couche mince sur une plaque CCM**
- **une phase mobile (liquide) ou éluant : solvant ou mélange de solvants qui migre le long de la plaque en entraînant les composés du mélange à séparer**





Choix des conditions opératoires pour une analyse par chromatographie

Choix de la phase stationnaire :

Il en existe trois sortes : silice, alumine et cellulose

- *Silice* : c'est la phase la plus courante. On commence toujours par celle-là !
- *Alumine* : on l'utilise généralement pour les composés à caractère basique
- *Cellulose* : on l'utilise pour les composés fortement polaires (sucres, acides aminés...)

Choix de la phase mobile (éluant) :

- Le choix de l'éluant est essentiel
- L'éluant est souvent un mélange de plusieurs solvants (deux ou trois) dans des proportions judicieusement choisies

→ On s'appuiera sur la littérature (normes, etc) et ses propres essais pour le choisir



Choix des conditions opératoires pour l'analyse des encres

En s'appuyant sur la norme E1422-05* et nos propres travaux, nous proposons d'utiliser le matériel suivant pour vos TP (voir le protocole de TP détaillé) :

Phase stationnaire

→ Plaques « gel de silice 60 » sur plaque d'aluminium et sans indicateur fluorescent (Fournisseur : Merck Millipore)

Phase mobile (éluant)

→ Système I : Acétate d'éthyle - Éthanol - Eau (70 : 35 : 30)

→ Système II : N-butanol - Éthanol - Eau (50 : 10 : 15)

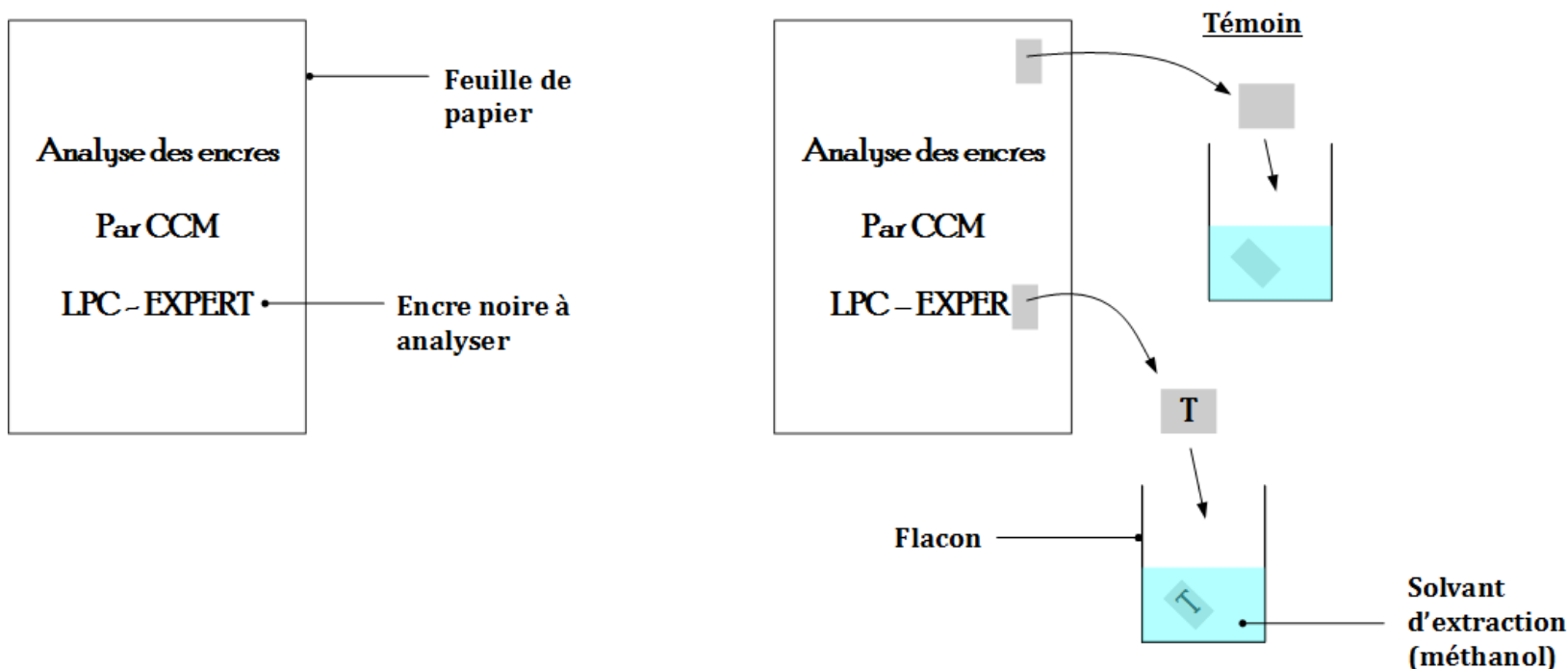
L'éluant devra être préparé le matin avant chaque manipulation (les proportions des constituants du mélange peuvent en effet changer au cours du temps à cause de leur évaporation)



Réalisation d'une chromatographie sur couche mince

Étape 0 : Préparation des échantillons : extraction des encres du papier (voir TP)

- Prélever une petite fraction de papier où se trouve l'encre à analyser
- Introduire ce prélèvement dans un pilulier (flacon)
- Ajouter du méthanol (volume précisé en TP)
- Fermer le pilulier et agiter jusqu'à ce que toute l'encre soit passée en solution
- Refaire la même chose en prélevant la même fraction de papier exempt d'encre (témoin)

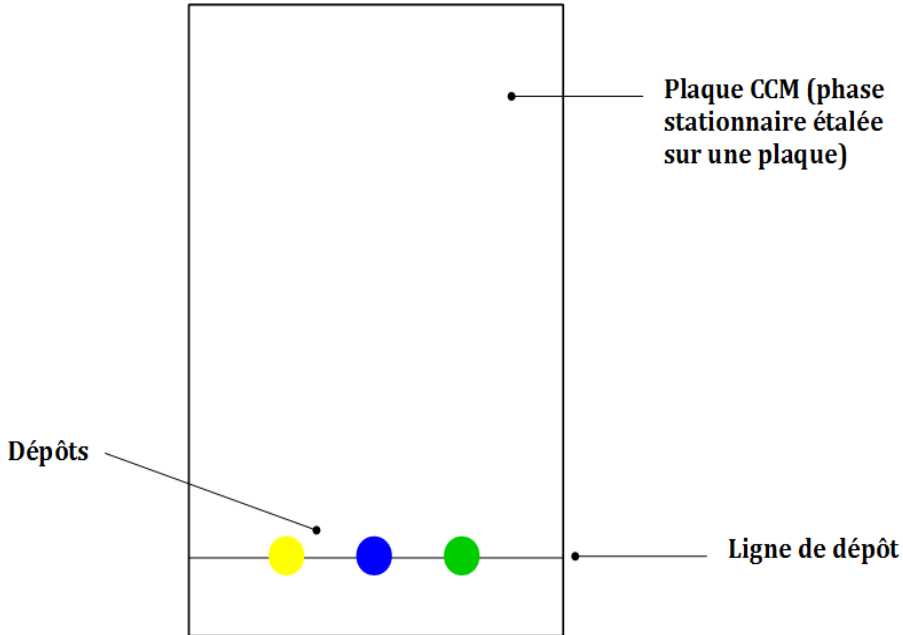




Réalisation d'une chromatographie sur couche mince

Étape 1 : Préparation de la plaque (voir protocole de TP)

- Découper soigneusement une plaque aux dimensions souhaitées
- Tracer au crayon un trait horizontal à environ 1 cm du bas de la plaque (ligne de dépôts)
- Marquer sur ce trait des points où seront déposés les dépôts (encres) à examiner
- Déposer sur chaque point à l'aide d'un capillaire les solutions à analyser (« spots »)



Analyse par CCM de trois pigments jaune, bleu et vert

Remarques :

Les plaques CCM sont très fragiles !

→ il faut mettre des gants pour les manipuler

→ il ne faut pas trop appuyer dessus avec le crayon et le capillaire

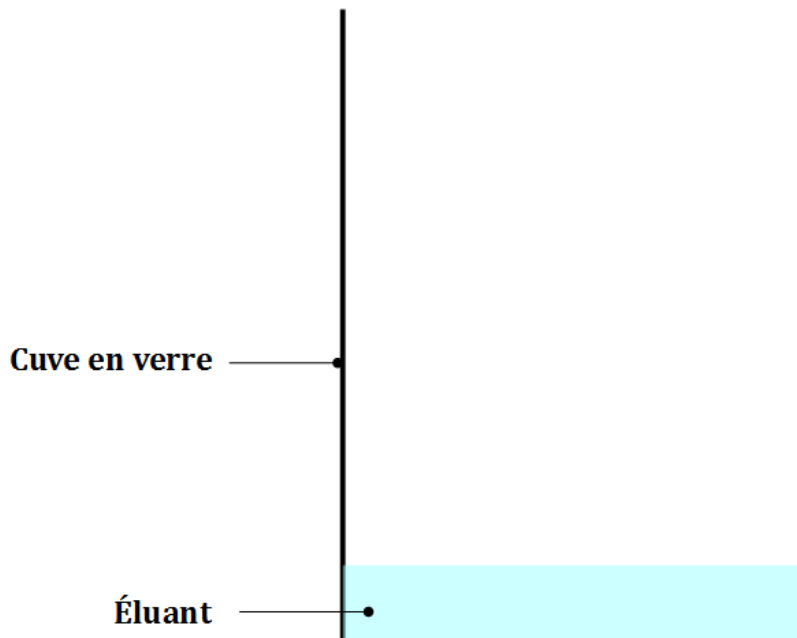
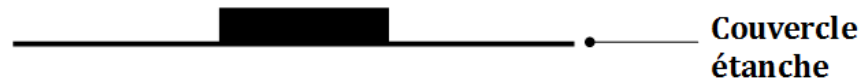
→ les coins inférieurs de la plaques pourront être retirés pour limiter les effets de bords



Réalisation d'une chromatographie sur couche mince

Étape 2 : Préparation de la cuve (voir protocole de TP)

- Préparer l'éluant sous la hotte en respectant les proportions fixées par le protocole
- Verser 6 mL d'éluant dans le fond de la cuve puis recouvrir avec le couvercle
- Attendre une dizaine de minutes pour saturer l'atmosphère de la cuve en vapeur de solvant



Remarques :

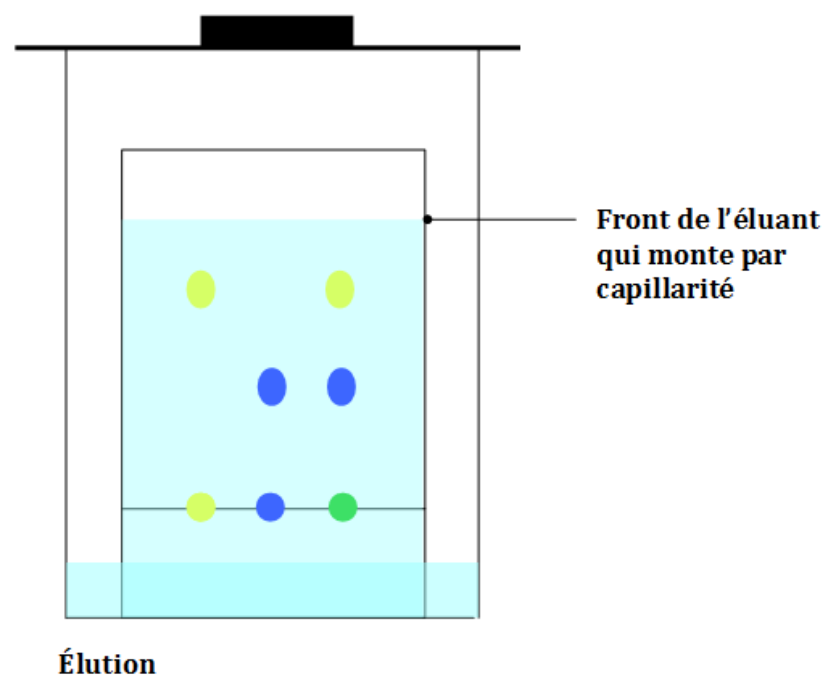
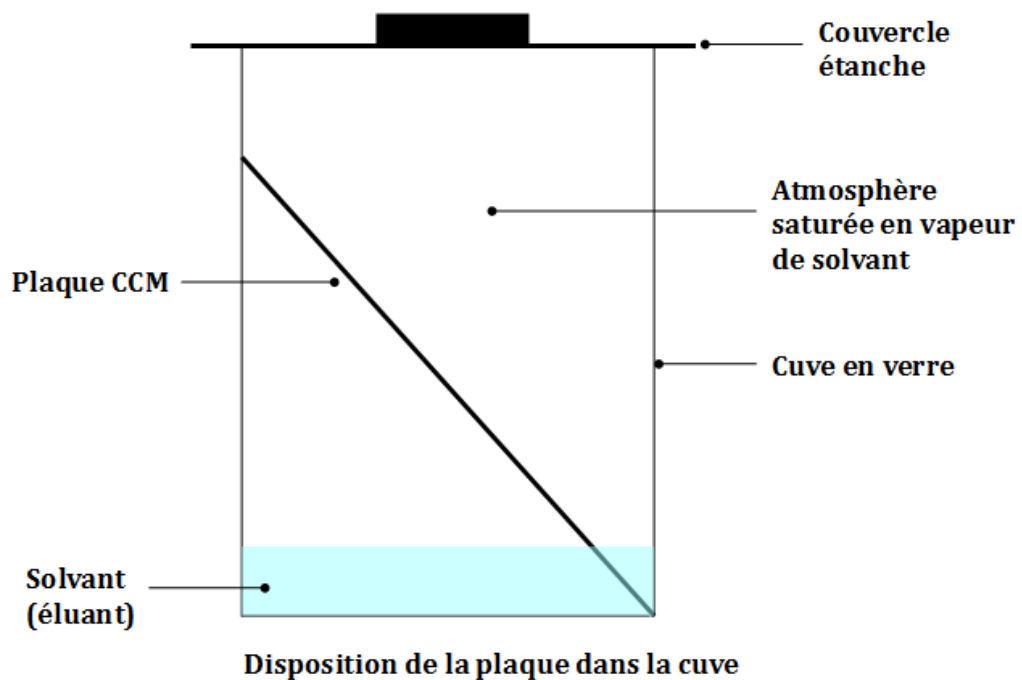
- la saturation de la cuve permet d'avoir des résultats reproductibles
- cette étape n'est pas toujours proposée dans les protocoles



Réalisation d'une chromatographie sur couche mince

Étape 3 : Développement (ou élution) (voir protocole de TP)

- Placer délicatement la plaque dans la cuve, mettre le couvercle et laisser l'éluant monter
- Arrêter la CCM lorsque le front de l'éluant est arrivé à 1 cm du haut de la plaque
- Sortir la plaque et tracer au crayon le front de l'éluant
- Sécher la plaque sous la hotte avec un sèche-cheveux

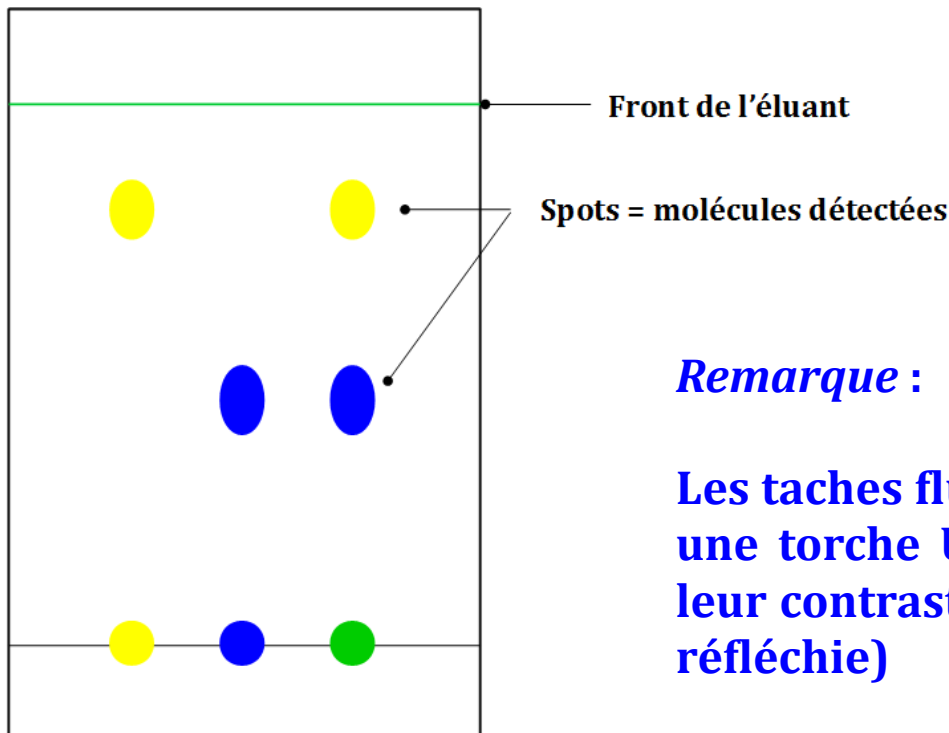




Réalisation d'une chromatographie sur couche mince

Révélation des plaques

- Les composés colorés séparés peuvent être observés en lumière blanche
- D'autres composés sont invisibles en lumière blanche mais sont fluorescents sous rayonnement UV



Remarque :

Les taches fluorescentes peuvent être révélées en utilisant une torche UV et des lunettes oranges afin d'augmenter leur contraste (filtrage de la composante lumineuse bleue réfléchi)

Un chromatogramme

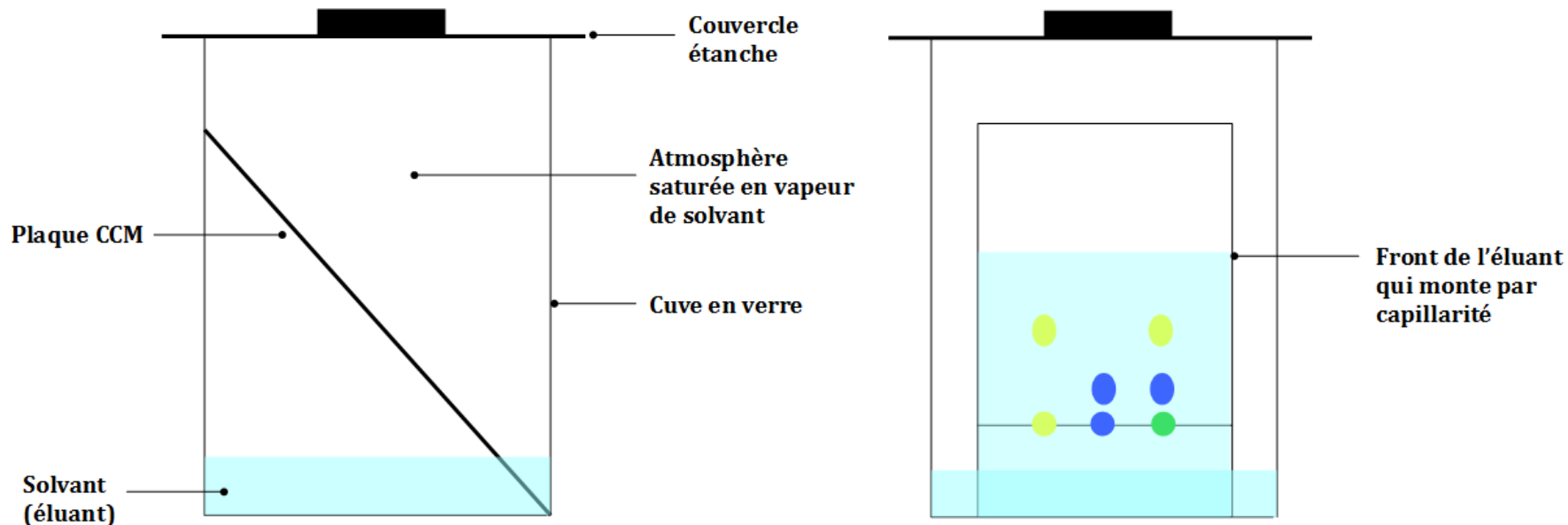


Principe de la chromatographie sur couche mince

Lorsque la plaque est placée dans la cuve, l'éluant monte par capillarité à travers la plaque en entraînant avec lui différemment les composés du mélange analysé :

→ plus le composé a d'affinité avec l'éluant plus il va monter haut (tendance à être entraîné par l'éluant)

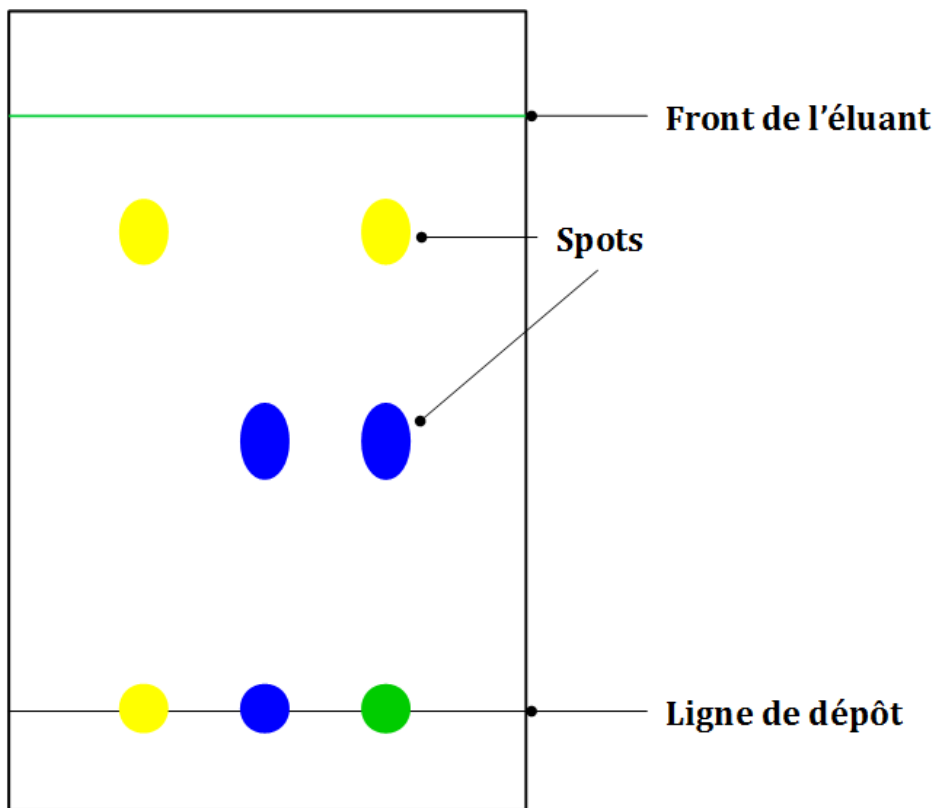
→ plus le composé a d'affinité avec la phase stationnaire (la plaque) moins il va monter haut (tendance à rester accroché à la plaque)





Calculs et interprétation des chromatogrammes

- Chaque tache du chromatogramme correspond à une espèce chimique détectée
- Chaque tache est caractérisée par un nombre appelé « rapport frontal » et noté R_f



Un chromatogramme

Remarques

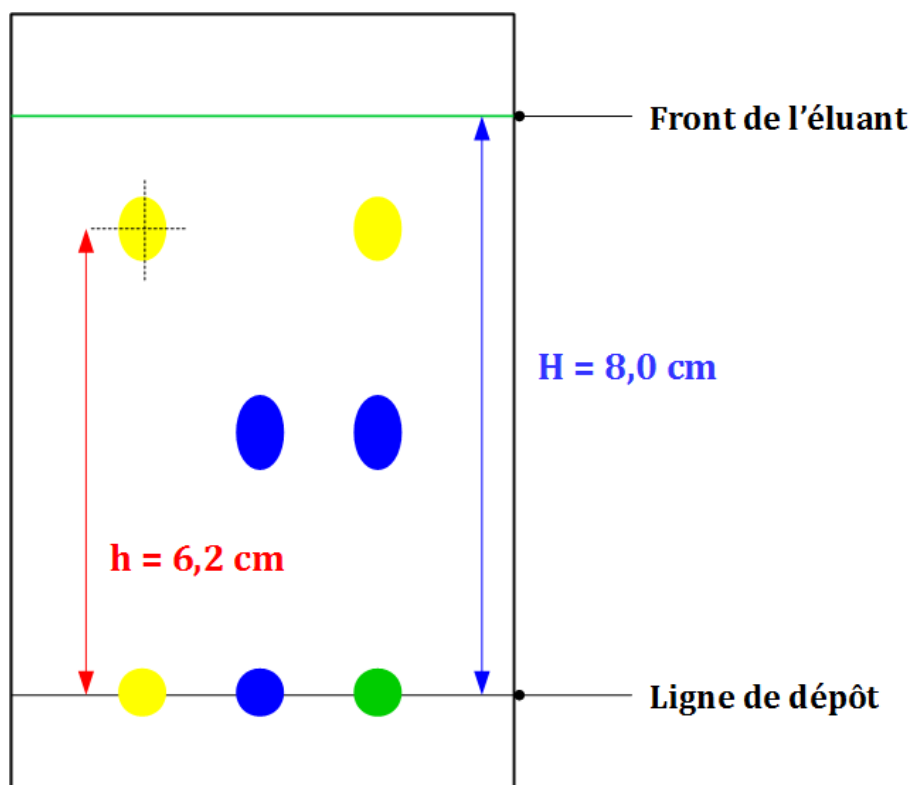
- Ce rapport est caractéristique de l'espèce étudiée et des conditions expérimentales (éluant...)
- Numérisation des plaques à l'aide d'un scanner UV-VIS (TLC Scanner CAMAG)
- Taches caractérisées par leur couleur, fluorescence, intensité et position (R_f)
- Par comparaison, il permet d'identifier une molécule (utilisation d'une base de données)
- Différentes molécules peuvent avoir le même rapport frontal (co-élution)



Calculs et interprétation des chromatogrammes

Le rapport frontal

Le rapport frontal R_f est par définition égal à la distance parcourue par le composé d'intérêt (h) divisée par la distance parcourue par l'éluant (H) :



$$R_f = \frac{h}{H}$$

Exemple (tache jaune)

$$R_f = \frac{6,2}{8,0} \approx 0,78$$

Remarques

→ Le résultat final devrait être donné avec son incertitude absolue (ex : $R_f = 0,8 \pm 0,2$)

→ En TP, vous pourrez donner votre résultat avec deux chiffres significatifs

→ Réalisation des manips au moins 3 fois dans les mêmes conditions (estimation de la moyenne et de l'écart-type)



Conclusions attendues dans un rapport

En comparant deux chromatogrammes, trois conclusions sont attendues dans un rapport :

« Les deux chromatogrammes ne présentent aucune différence significative »

→ Hypothèse 1 : les encres examinées sont identiques (même composition) :

- les encres examinées proviennent d'un seul et même stylo*
- les encres examinées proviennent de stylos différents*

→ Hypothèse 2 : les encres examinées sont différentes (mêmes « colorants » mais additifs différents) :

- les encres examinées proviennent de stylos différents*

« Les deux chromatogrammes présentent des différences significatives »

→ Conclusion : les encres examinées sont différentes :

- les encres examinées proviennent de stylos différents*

« Aucune conclusion possible » : observations incertaines (couleurs et positions des taches trop proches, etc.)