

Techniques chromatographiques : la CCM

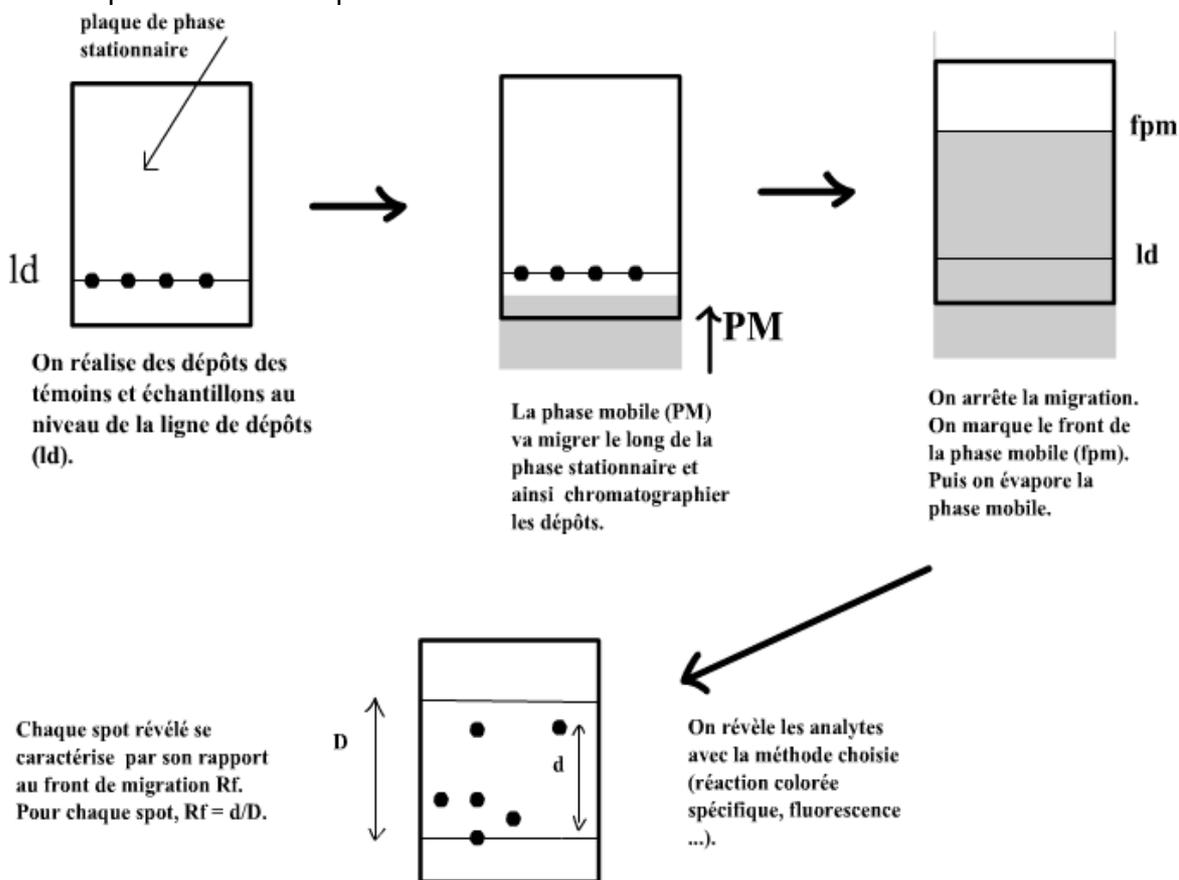
- données techniques fondamentales pour réaliser des chromatographies en phase liquide sur couche mince (CCM) ;
- applications à des chromatographies liquides d'adsorption sur phase stationnaire solide très fortement polaire (phase stationnaire gel de silice).

Voici quelques données théoriques et techniques générales concernant les CCM.

Généralités concernant les CCM

Les CCM sont des chromatographies liquides (la phase mobile est un liquide) pour lesquelles la phase stationnaire se présente sous la forme d'une couche plane de faible épaisseur devant sa surface. CCM se traduit en anglais par TLC (thin layer chromatography) En CCM classique on utilise généralement la capillarité comme moteur de la phase mobile. Les dépôts sont réalisés sous forme de « spots » de volume de 0,5 à 1 µL. Les phases stationnaires usuelles présentent une granulométrie assez élevée et donc une capacité de séparation pas toujours élevée.

Une manipulation de CCM peut se résumer à l'aide du schéma suivant :



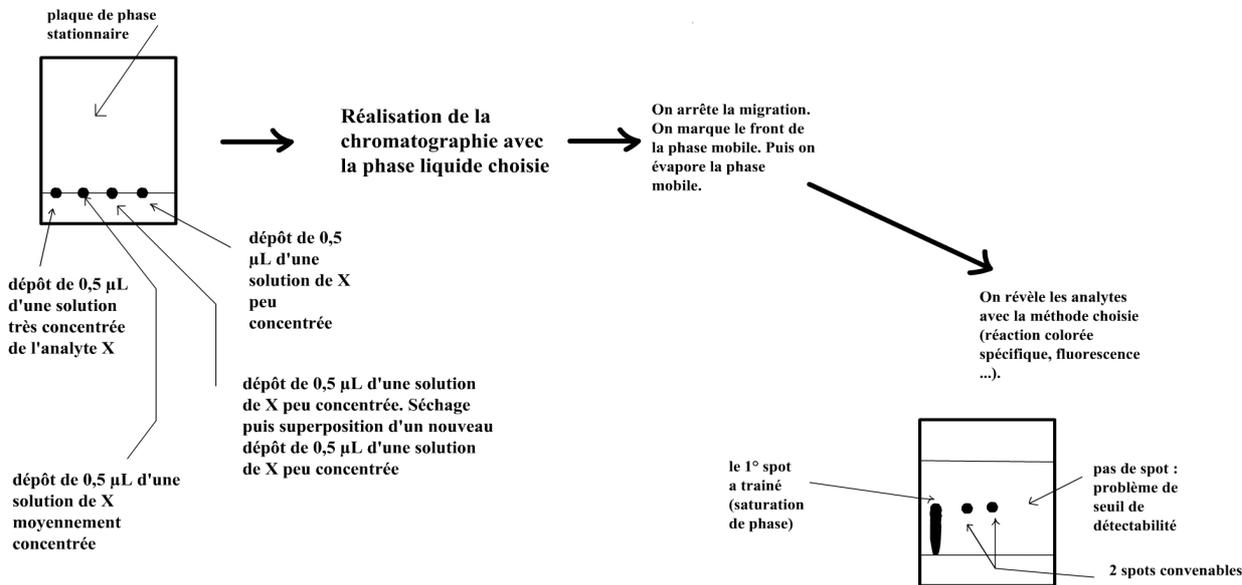
Il existe des systèmes de CCM qui mettent en œuvre des appareillages qui automatisent et miniaturisent la taille des dépôts et permettent d'utiliser des phases stationnaires de granulométrie faible à très haute performance. Les séparations sont optimisées à l'aide de systèmes autorisant les gradients de phases mobiles. La révélation est alors analysée à l'aide d'appareils balayant la plaque et associés à un traitement informatique du signal (« scanner » en lumière réfléchie, ou en fluorescence ou en bioluminescence ...). On parle alors de HPTLC : high performance thin layer chromatography.

En CCM, pour un système chromatographique donné (nature de la phase stationnaire et de la phase mobile), chaque analyte révélé possède un R_f (rapport au front de migration) qui lui est propre. En effet, le R_f d'un analyte traduit le jeu des rétentions/élutions différentielles avec la phase stationnaire et la phase mobile. Evidemment 2 molécules différentes peuvent avoir le même R_f , attention aux identifications trop rapides ...

Une molécule absolument non entraînée par la phase mobile conduit à un R_f de 0.

Une molécule absolument non retenue par la phase stationnaire conduit à un Rf de 1.
 Une molécule qui passe statistiquement x% de son temps dans la phase mobile et (1-x)% de son temps retenue par la phase stationnaire conduit à un Rf de x/100.

Un problème classique rencontré en CCM est le suivant : quelle est la quantité à déposer ? Si un dépôt ne contient pas assez de matière on risque d'être en dessous du seuil de détection de la technique de révélation. Si un dépôt est trop chargé, on risque de saturer la phase mobile lorsqu'elle atteindra la ligne des dépôts en début de migration : tout se passera alors comme si on réalisait une suite de dépôts à la queue leu-leu : on observera un effet de traînée.



Evidemment, la performance d'une CCM dépend du choix de la phase stationnaire, de la phase mobile et de la méthode de révélation face au problème chimique posé.

A l'heure actuelle les CCM sont quasiment toutes réalisées soit le support gel de silice (une phase stationnaire très polaire) soit sur le support gel de silice greffée d'un motif fluide apolaire. Le support papier (phase stationnaire = cellulose avec sa couche d'eau liée = phase polaire) est un support historique (mais on peut citer l'analyse œnologique des produits de la fermentation malolactique toujours pratiquée sur papier cellulose). Les phases stationnaires chargées d'un agent fluorescent excitable dans l'UV dans un domaine donné de longueurs d'onde (par exemple vers 254 nm) et émettant dans le visible sont très utiles pour de nombreuses révélations.

Les CCM demeurent aussi des techniques « micropréparatives » intéressantes (par exemple la préparation d'extraits lipidiques) : on « gratte » les spots après migration pour récupérer les analytes qui seront solubilisés dans un solvant adéquat puis on centrifuge pour éliminer le culot de gel de silice.

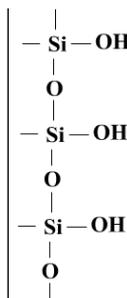
2. Pratique de la CCM : cas du support gel de silice

2.1 La phase stationnaire gel de silice

Le gel de silice est un adsorbant très polaire (il retient donc a priori les motifs polaires par interactions faibles de surface). On l'utilisera donc avec une phase mobile de polarité inférieure. Pour réaliser des CCM très reproductibles sur gel de silice, il convient de travailler avec des gels préalablement déshydratés (élimination de l'eau évaporable adsorbée en surface du gel) par séjour à 110°C. On parle de réactivation du gel pour qualifier cette étape.

Ne jamais mettre ses doigts au contact de la plaque CCM ! On peut utiliser des gants !

Remarque : lorsqu'on réalise des chromatographies sur papier-cellulose, la phase stationnaire est en fait constituée par l'eau liée à la cellulose. Il ne faut donc surtout pas réactiver.



2.2 Préparer la cuve de chromatographie

Avec moins de 1 cm de hauteur de phase mobile. Il faut laisser saturer l'atmosphère de la cuve en vapeur de phase mobile ce qui implique une fermeture étanche et du temps... Sinon les migrations seront perturbées par les courants latéraux d'évaporation de la phase mobile. (L'idéal consiste même à tapisser la paroi de la cuve avec du papier imprégné de phase mobile.)

2.3 Organiser la phase stationnaire pour les dépôts

Réaliser un tracé au crayon graphite vers 1,5 cm du bord inférieur de la plaque de gel de silice. Prévoir les emplacements des différents spots de dépôt de façon raisonnée judicieuse en sachant que les dépôts doivent être à au moins 0,5 cm du bord de la plaque et distants d'au moins 0,8 cm. Reproduire le plan des dépôts sur le compte-rendu de manipulation.

2.4 Réaliser des dépôts convenables

Pour des CCM analytiques (non préparatives), le diamètre des spots de dépôts doit être de 2 à 3 mm.

Le principe pour réaliser des dépôts convenables est le suivant :

- déposer suffisamment de matière à analyser pour avoir des tâches de migration détectées par la technique de révélation (donc cela dépend de la détectabilité de la technique de révélation) ;
- ne pas déposer trop, sinon on risque de saturer la solvant de migration lorsqu'il atteindra le spot de dépôt ce qui entraînera une migration avec traînée.

Ainsi, l'optimisation des dépôts est empirique et dépend de chaque manipulation. Une règle importante : on peut superposer des dépôts si on pense que les solutions à déposer ne sont pas suffisamment concentrées mais à condition de bien sécher entre chaque application (ceci afin de ne pas étaler les dépôts au lieu de les superposer). On sèche au thermoventilateur.

Pour appliquer un dépôt, utiliser un tube capillaire convenablement essuyé ou **mieux**, une pipette automatique réglée vers 0,5 µL avec des pointes très fines (dites « cristaux »). Tenir le capillaire ou la pointe perpendiculairement à la plaque de CCM, faire attention à ne pas abîmer le support en déposant.

2.5 Placer en cuve et laisser migrer

- pas de turbulences, pas de vagues...
- vérifier qu'au départ, la ligne des dépôts est bien au-dessus du niveau de solvant !
- refermer immédiatement la cuve après introduction de la plaque ;
- laisser migrer tant que le front de phase mobile progresse mais arrêter avant que le front de solvant n'atteigne l'extrémité supérieure de la plaque.

2.6 Révéler la CCM

- marquer le front de solvant dès la sortie de la plaque, au crayon graphite ;
- évaporer soigneusement la phase mobile de la plaque (« séchage » de la plaque) ;
- révéler selon la technique adhoc (avec ses caractéristiques propres de détectabilité et de spécificité ...) ;
- entourer les spots révélés au crayon, annoter éventuellement au crayon graphite, marquer les centres, calculer éventuellement les R_f (rapports au front de migration).

3. Bibliographie

- Portail <http://www.clubdeccm.com>
- Site iupac <http://www.iupac.org> essentiellement via <http://www.iupac.org/publications/compendium>