

# Du dépôt à la séparation

**Cas concrets de l'importance du dépôt et du soin nécessaire à la migration :**

**Règles de base, astuces, anomalies rencontrées...**



**sanofi aventis**

L'essentiel c'est la santé.

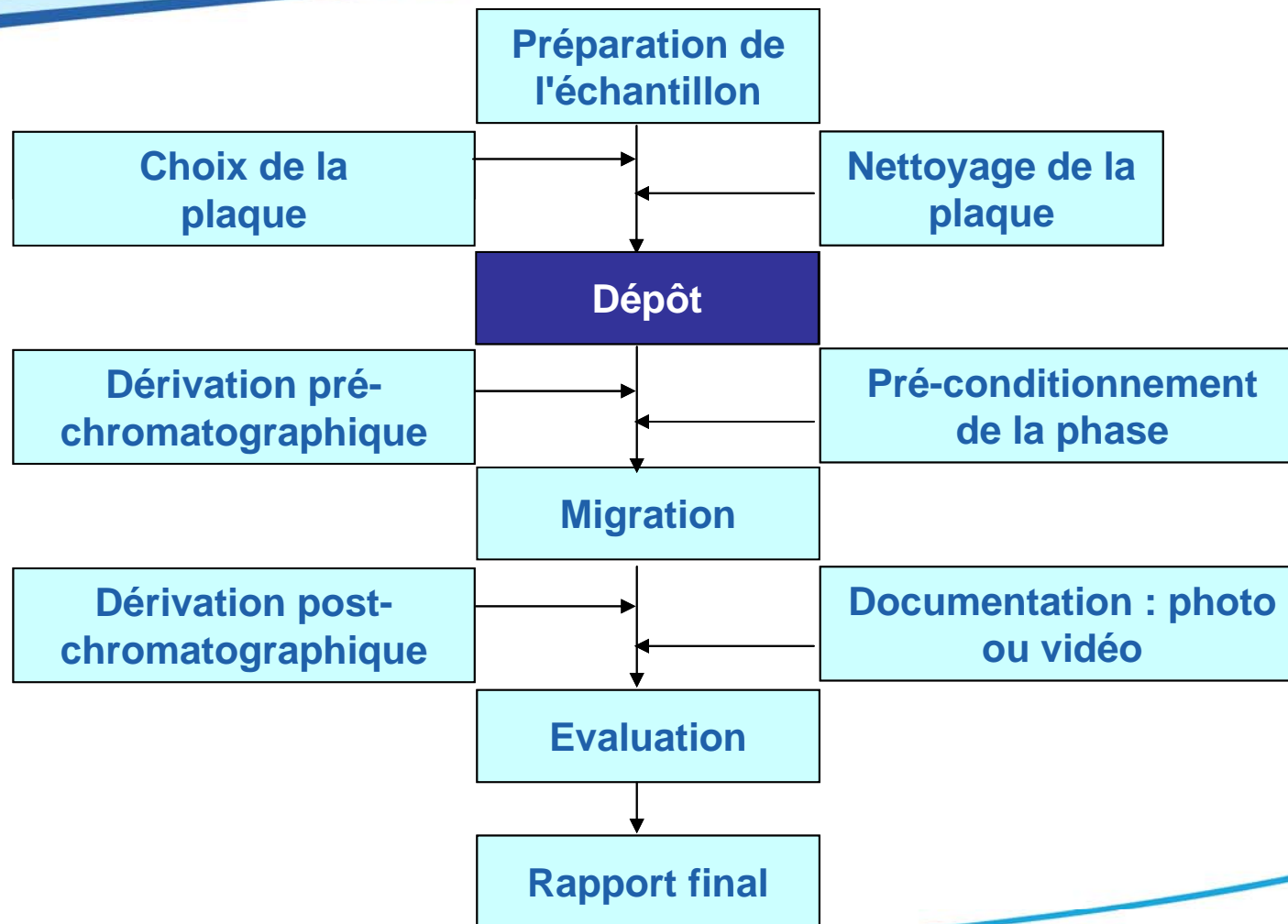


## ● Dans quels cas utiliser la CCM

- ▶ En complément de l'analyse HPLC (méthode orthogonale)
- ▶ Lorsque la substance recherchée (ou ses impuretés) n'absorbe pas en UV
- ▶ Lorsque la matrice est trop complexe pour être injectée en HPLC
- ▶ Pour diminuer le temps d'analyse lorsqu'on a de nombreux échantillons
- ▶ Pour améliorer la sensibilité en augmentant la quantité déposée
- ▶ Pour le suivi de réactions directement dans les milieux réactionnels
- ▶ Pour l'identification de composés (couleur, aspect, Rf...)

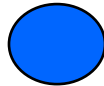


# Les étapes de la CCM



# Le dépôt : deux possibilités

## ● Par capillarité :



L'échantillon est déposé en point par contact du capillaire sur la couche, le composé pénètre dans la phase et donc se "dilue".

Avantage : méthode simple, rapide, utilisée pour un grand nombre d'échantillons et peu de composés à séparer.

Inconvénient : exige du soin pour ne pas endommager la plaque, le volume déposé est limité et dépendant du solvant de dissolution.

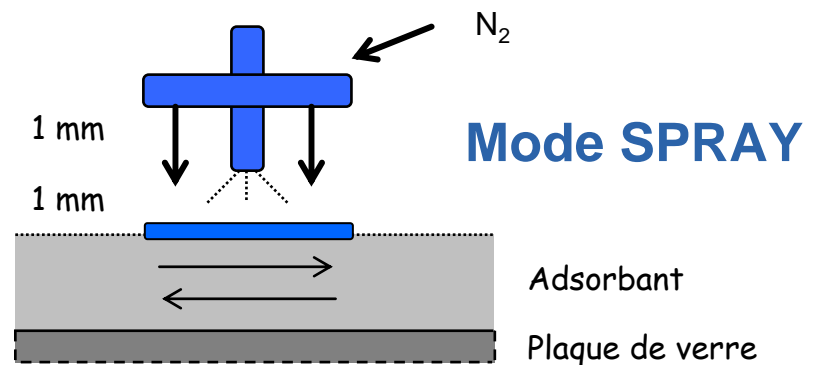
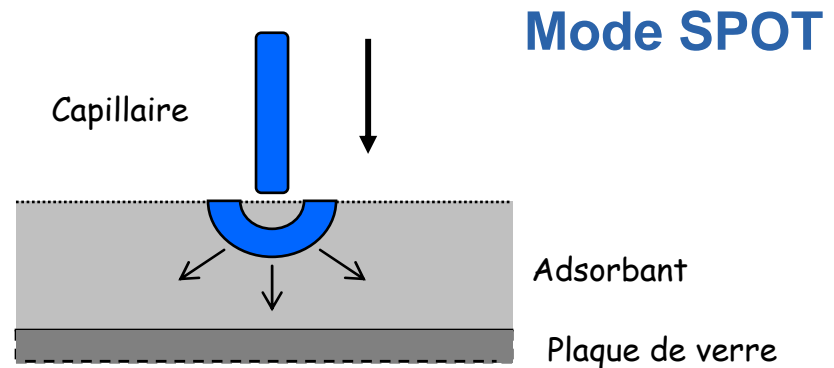
## ● Par vaporisation :



L'échantillon est vaporisé sur la surface de la plaque sous la forme d'une bande, il pénètre peu dans la couche.

Avantage : améliore la résolution et la sensibilité, moins de limite du volume déposé.

Inconvénient : nécessite une instrumentation.





# Déposeurs à notre disposition



Camag

## Manuels

- ▶ S'utilisent avec porte-capillaires et capillaires à volumes calibrés.
- ▶ Permettent le dépôt uniquement par contact.
- ▶ A gauche, le système permet au capillaire de déposer sans heurter la plaque.



SARSTEDT



## Automatiques

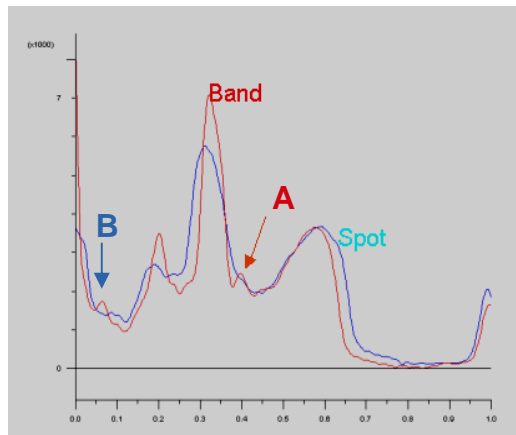
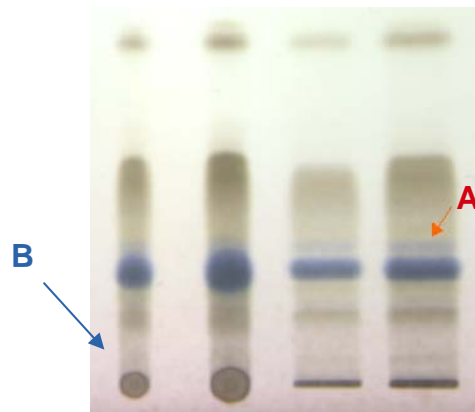
- ▶ Déposent en spray ou en contact,
- ▶ S'utilisent avec un logiciel piloté par PC.





# Comparaison des modes de dépôts

(Uva Ursi)



Solvant de dissolution

Hexane, Toluène, Méthanol

(Test dye Camag)



Mode Contact (spot)

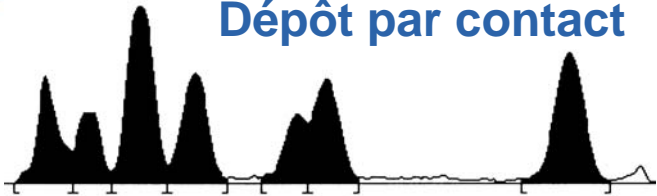
Mode pulvérisation (spray)

- Le solvant de dissolution affecte la séparation chromatographique, plus si le dépôt est effectué par contact, que par pulvérisation.
- Sur l'exemple de l'Uva Ursi, les composés A et B ne sont décelés que lorsque le dépôt est effectué par pulvérisation en bande.

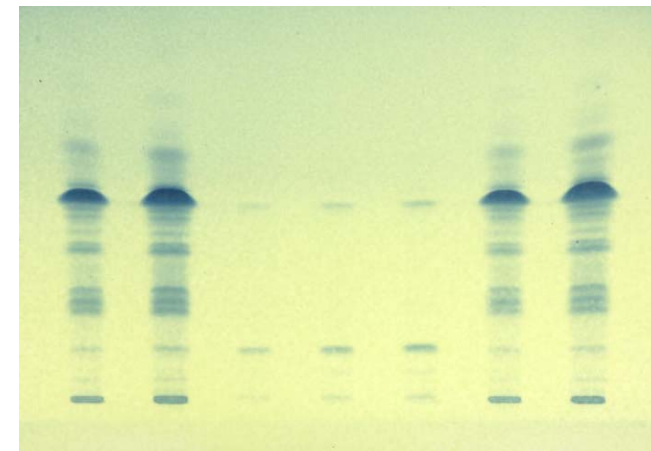
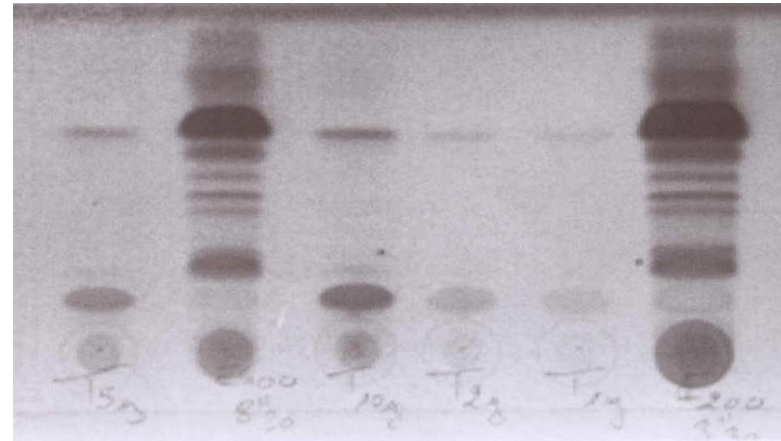
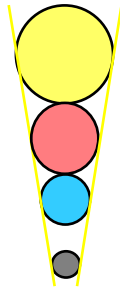
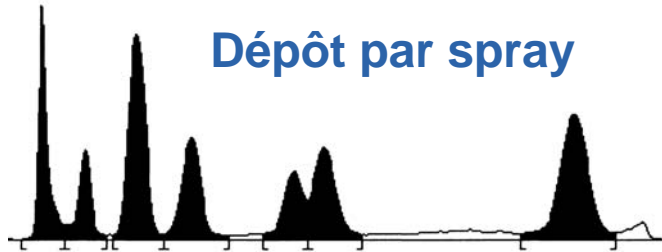


# Effets induits par le dépôt

Dépôt par contact



Dépôt par spray



- Les erreurs commises lors du dépôt ne sont jamais compensées par la suite des étapes.
- L'élargissement de bande due au dépôt ne conduira jamais à des spots fins.
- La quantification est affectée par la position du composé sur la plaque.
- Les composés migrant près du front du solvant sont plus focalisés que ceux restant au bas de la plaque.

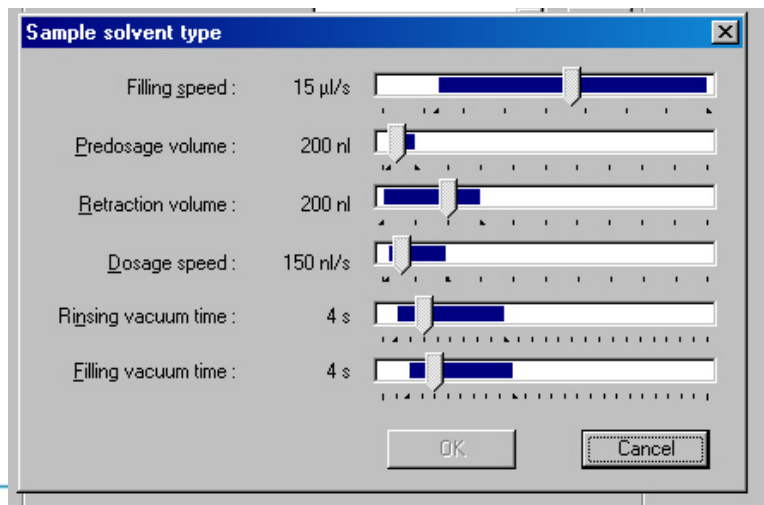
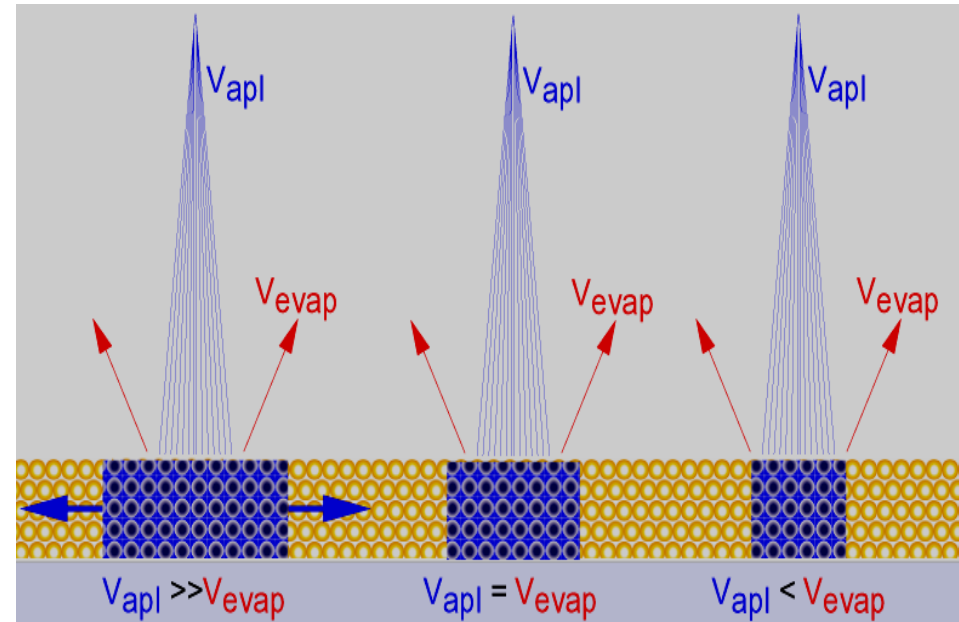




# Le dépôt par vaporisation

## Influence de la vitesse de dépôt par spray :

Il faut que la vitesse de dépôt soit inférieure à la vitesse d'évaporation du solvant de dissolution pour éviter la diffusion.



Les paramètres du déposeur  
devront être réglés en  
conséquence





# Effets induits par la vaporisation

Dépôt en SPRAY de 6 mm

Solvant de dissolution :

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$

MeOH



- Selon le solvant de dissolution, la vitesse de dépôt doit être adaptée pour éviter les projections de produit qui ensuite migreront pendant l'élution.

**Vitesses de dépôt :**

**250 nL/s**

**150 nL/s**

**50 nL/s**



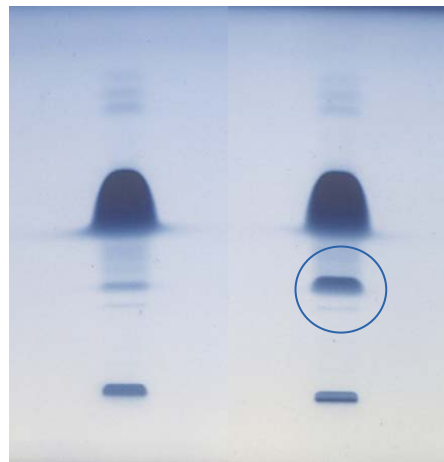


# La dissolution des composés

- Bien que le solvant de dissolution soit éliminé après le dépôt il peut influencer le résultat chromatographique. Pour s'affranchir des interférences, le solvant de dissolution doit :
  - ▶ **Etre suffisamment polaire pour bien dissoudre l'échantillon mais pas trop pour s'éliminer facilement**
    - ┌ Eviter les bases et les acides organiques (Pyridine, TEA...,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{HCOOH}$ ...)
    - ┌ Les solvants à haut point d'ébullition (DMF, DMSO, Butanol, Eau...)
    - ┌ Utiliser le Toluène pour les composés apolaires (éviter l'acétone, qui a tendance, sur la silice active, à former des produits du type Acétylacétone)
    - ┌ Utiliser le mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  pour les composés moyennement polaires
    - ┌ Utiliser le MeOH avec un faible pourcentage d'eau pour les composés polaires
  - ▶ **Avoir une force éluante faible**
    - ┌ Risque de commencer à chromatographier l'échantillon pendant le dépôt
  - ▶ **Non toxique, stable et ne pas réagir avec l'échantillon**
    - ┌ Hydrolyse de certaines fonctions
  - ▶ **Etre le plus pur possible**
    - ┌ Les impuretés du solvant seront chromatographiées avec l'échantillon.



# Effets du solvant de dissolution



$\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Méthanol



$\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{TEA}$



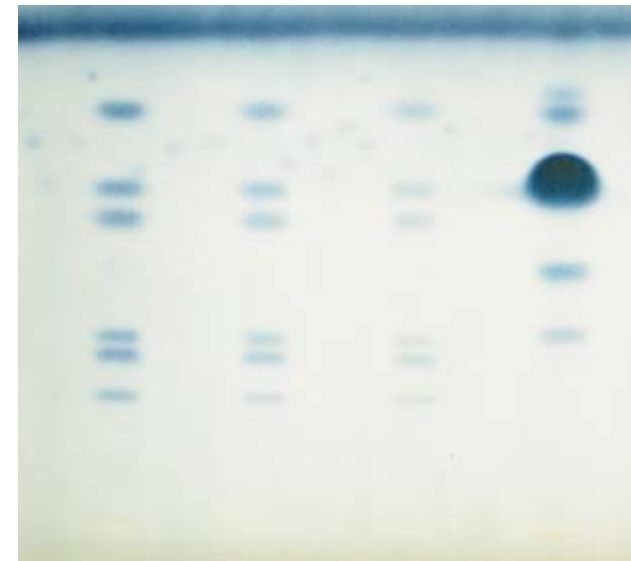
Butanol

- En fonction du solvant de dissolution utilisé, on observe :
  1. Une réaction sur la plaque en présence du solvant de dissolution.
  2. Le solvant qui est resté sur la plaque après le dépôt, qui migre avec les composés et perturbe l'évaluation
  3. Le solvant qui migre et fait éluer les composés



# La concentration de la solution

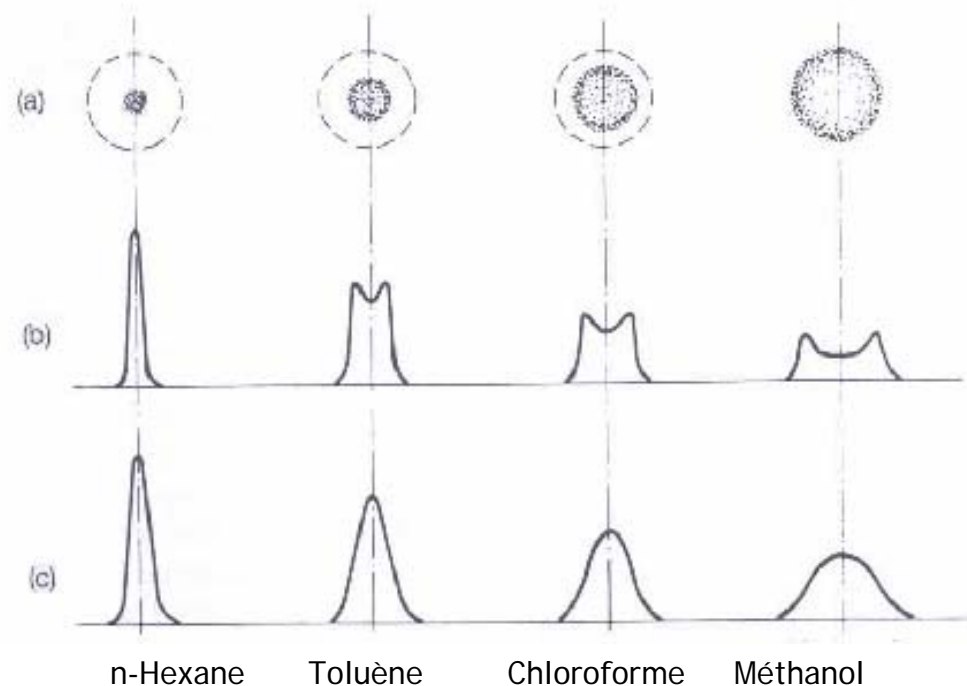
- La concentration de l'échantillon doit :
  - ▶ Pour un standard être de l'ordre de 0,1 mg/mL
  - ▶ Eviter des solutions trop concentrées (> 2%) pour les échantillons.
- Les solutions trop concentrées ont tendance à créer, lors du dépôt en spray des étalements et des éclaboussures qui peuvent souiller la plaque.
- Le solvant de dissolution des standards et des solutés doit être le même pour des conditions de dépôts optimum.





# Influence du solvant de dissolution

- La qualité du dépôt par contact ou capillarité est dépendante du solvant utilisé.
- La distribution de la substance selon le solvant utilisé affecte la forme du spot avant même la migration.



(a) Après application  
(Vu du dessus)

(b) Après application  
(profil)

(c) Après développement  
(profil)



# Exemples

## Solvant de dissolution

1 - CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH/TEA	: 8 / 2 / 0,1
2 - CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /TEA	: 10 / 0,1
3 - CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /TEA	: 10 / 0,1
4 - CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH/TEA	: 1 / 9 / 0,1
5 - MeOH/TEA	: 10 / 0,1

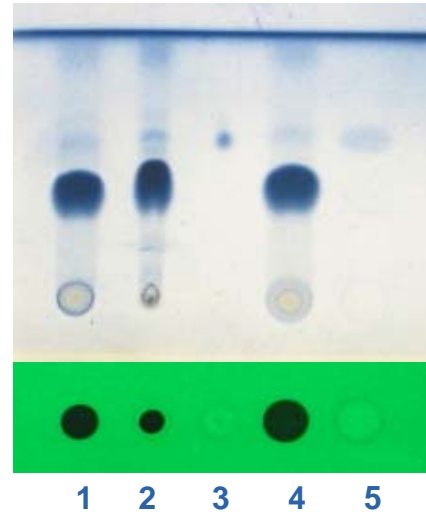
1, 2 et 4 : Substance à analyser  
3 et 5 : Standard

**Note** : on peut limiter les effets de la diffusion en effectuant une ou des migrations sur quelques mm à l'aide d'un solvant fort ou en utilisant des plaques avec zone de concentration.

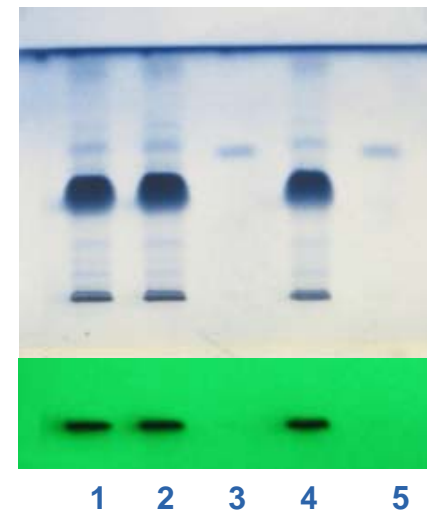
**CCM 1** : le point à gauche a été focalisé 3 fois, à droite dépôt par spray.

**CCM 2** : dépôt sur plaque avec zone de concentration.

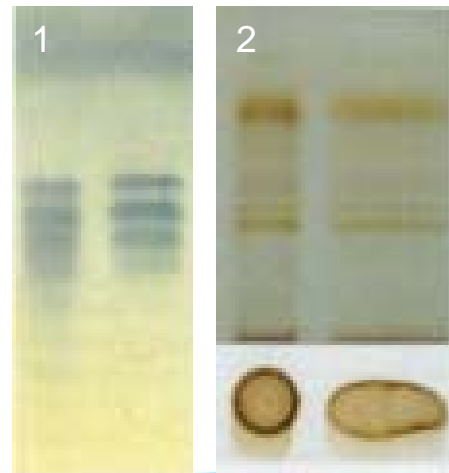
Contact



Dépôt de 2 µL



Spray  
bandes  
de 4 mm



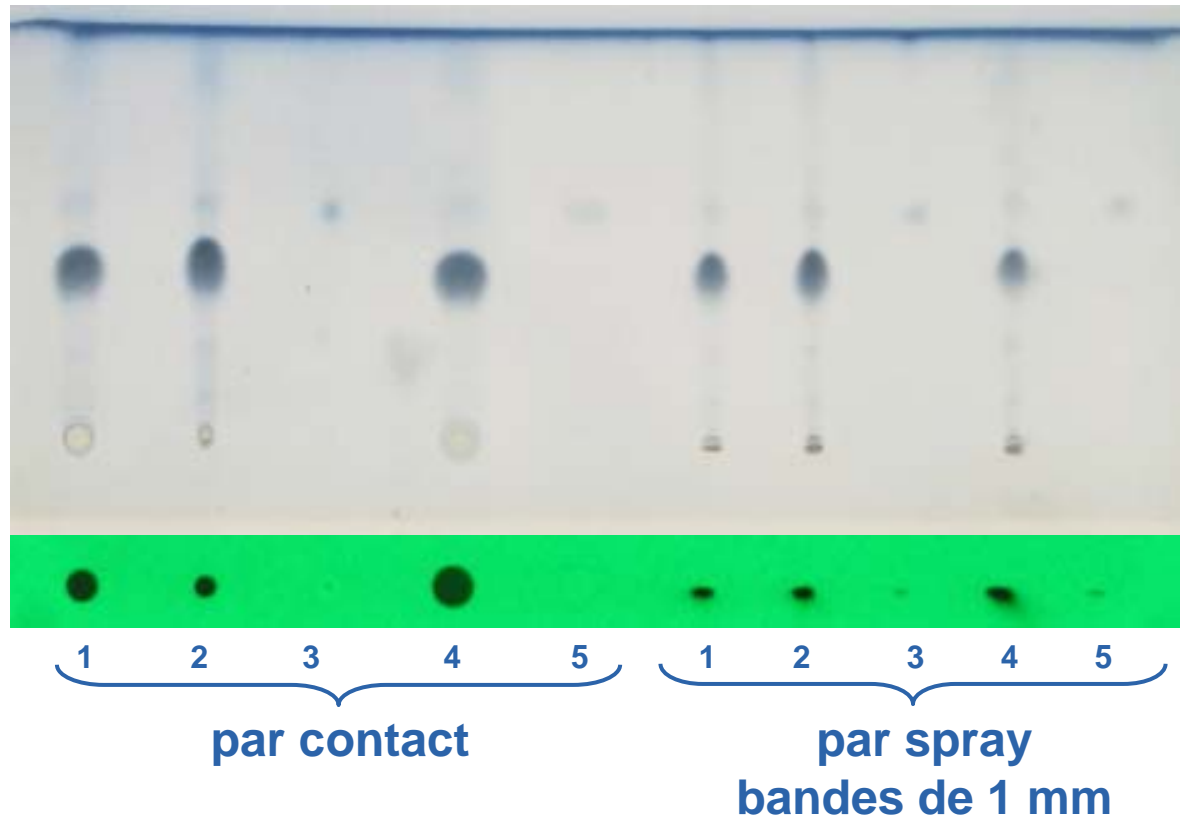
# Autre exemple

Dépôt de 1  $\mu$ L

## Solvant de dissolution

- 1 - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/TEA : 8 / 2 / 0,1
- 2 - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TEA : 10 / 0,1
- 3 - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TEA : 10 / 0,1
- 4 - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH / TEA: 1 / 9 / 0,1
- 5 - MeOH/TEA : 10 / 0,1

1, 2 et 4 : Substance à analyser  
3 et 5 : Standard





# Positionnement du dépôt

## ● Hauteur de dépôt sur la plaque (distance y ou d)

Déposer au-dessus et le plus près possible (2 à 3 mm au dessus) du niveau du solvant dans la cuve. Normalement à 8 mm du bas de la plaque, ou à 4 mm dans le cas des cuves horizontales (le démarrage s'effectue par contact et capillarité et non par immersion dans le solvant).

## ● Distance du bord de la plaque (x ou a)

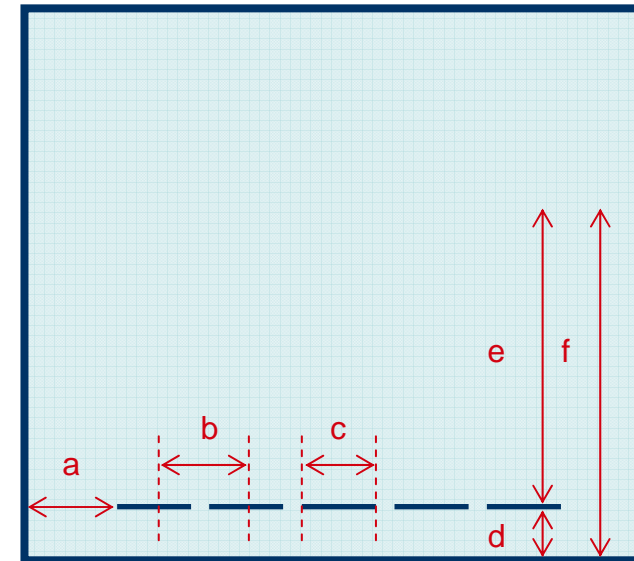
Laisser 1 à 2 cm libres aux bords de la plaque et espacer les dépôts au minimum.

## ● Recommandations

**HPTLC** : dépôt en bande de 8 mm (c), volume pas moins de 1  $\mu\text{L}$ , à 15 mm du bord (a), la distance entre les bandes de 10 mm (b) à 8 mm du bas (d). Pour les dépôts en spot a = 10 mm, d = 8 mm, b = 2 mm et volume pas moins de 0,5  $\mu\text{L}$ .

**TLC** : dépôt en bande de 15 mm (c), volume pas moins de 5  $\mu\text{L}$ , à 15 mm du bord (a), la distance entre les bandes de 20 mm (b) à 15 mm du bas (d). Pour les dépôts en spot a = 15 mm, d = 15 mm, b = 5 mm et volume pas moins de 5  $\mu\text{L}$ .

**Laisser sécher la plaque à température ambiante 5 mn.**

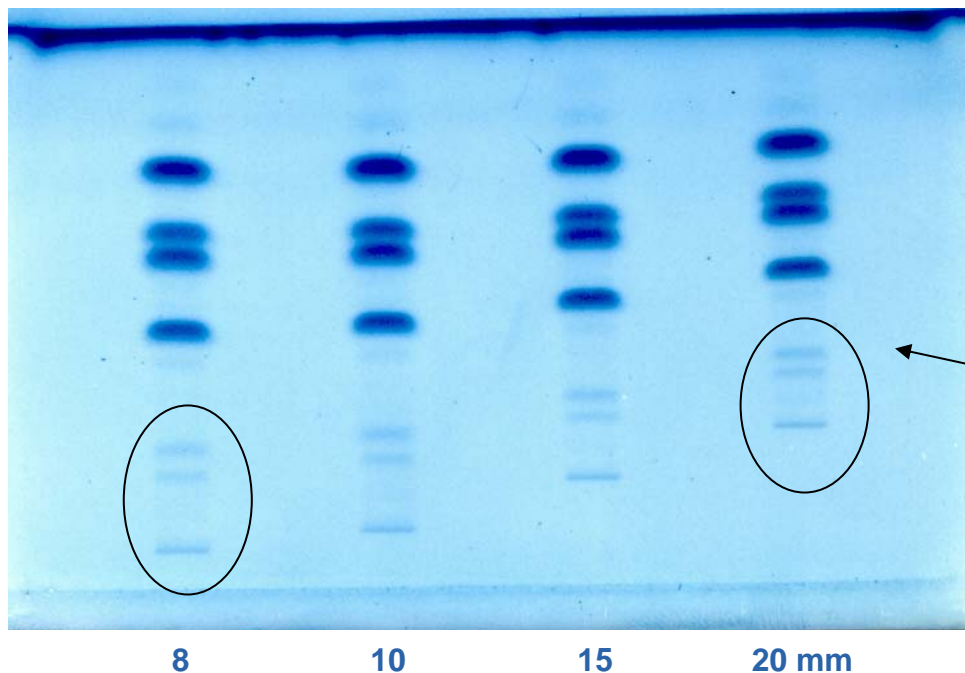






# Influence de la position du dépôt

- Distance du bas de la plaque : Dépôts effectués en traits de 5 mm à différentes distances, en mm du bas de la plaque.



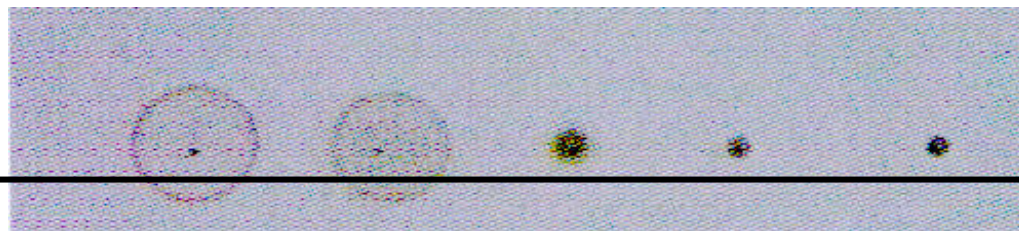
- On n'observe que peu d'impact sur la séparation, que le dépôt soit effectué à 8 ou 20 mm du bas de la plaque.
- La distance parcourue par le solvant d'éluion a plus d'effet sur l'élargissement des spots que le dépôt : il est préférable de déposer près du bas et de réduire la distance de migration pour gagner en sensibilité, efficacité et temps.



# Influence de la position du dépôt

## Distance du bas de la plaque

- ▶ Si le dépôt est effectué trop près du solvant d'éluion, il y a risque de "mouiller" le dépôt et de diluer l'échantillon : on obtiendra des traînées.
- ▶ Ce risque augmente avec les dépôts en contact, à cause de l'élargissement des spots, lors du dépôt, et en fonction du solvant de dissolution de l'échantillon choisi.



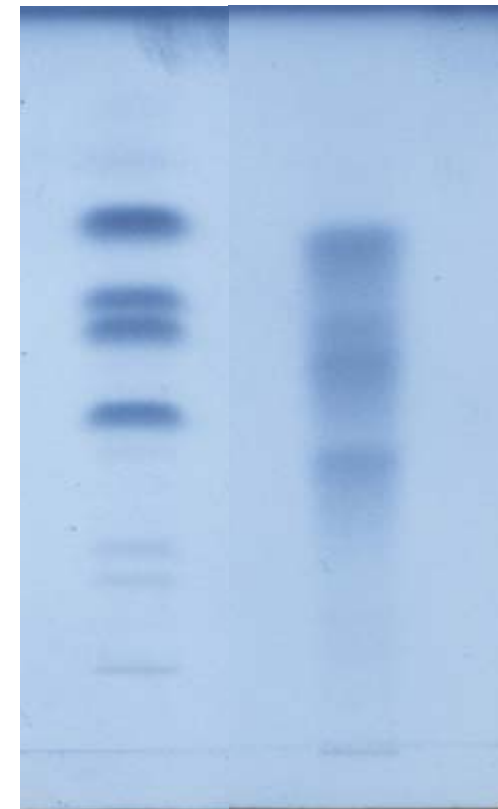
Eau

Acétone

Toluène

Hexane

CHCl<sub>3</sub>



Dépôt normal

Dépôt ayant trempé dans le solvant d'éluion

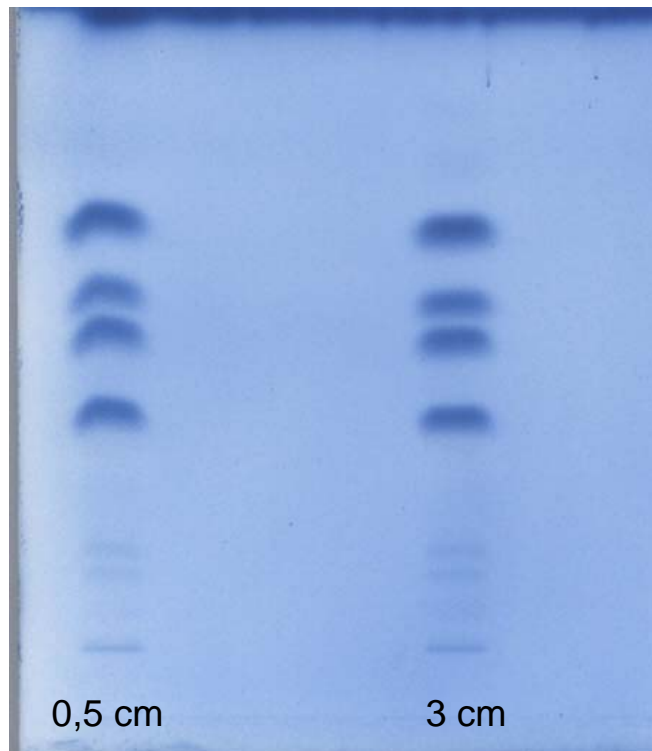




# Influence de la position du dépôt

## Distance du bord de la plaque

Dépôts effectués en traits de 5 mm à différentes distances, en cm, du bord de la plaque

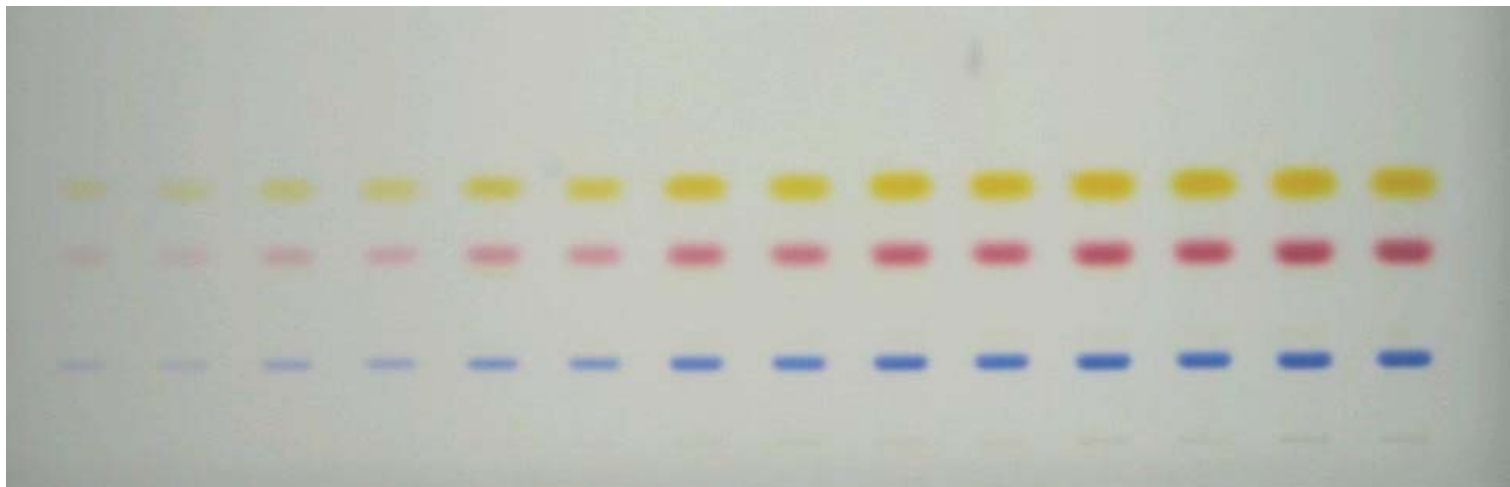


L'épaisseur de gel plus importante sur les bords de la plaque induit une déformation du chromatogramme si le dépôt est effectué trop près de ce bord.



# Influence du volume déposé

Comparaison de dépôts en spray de 6 mm

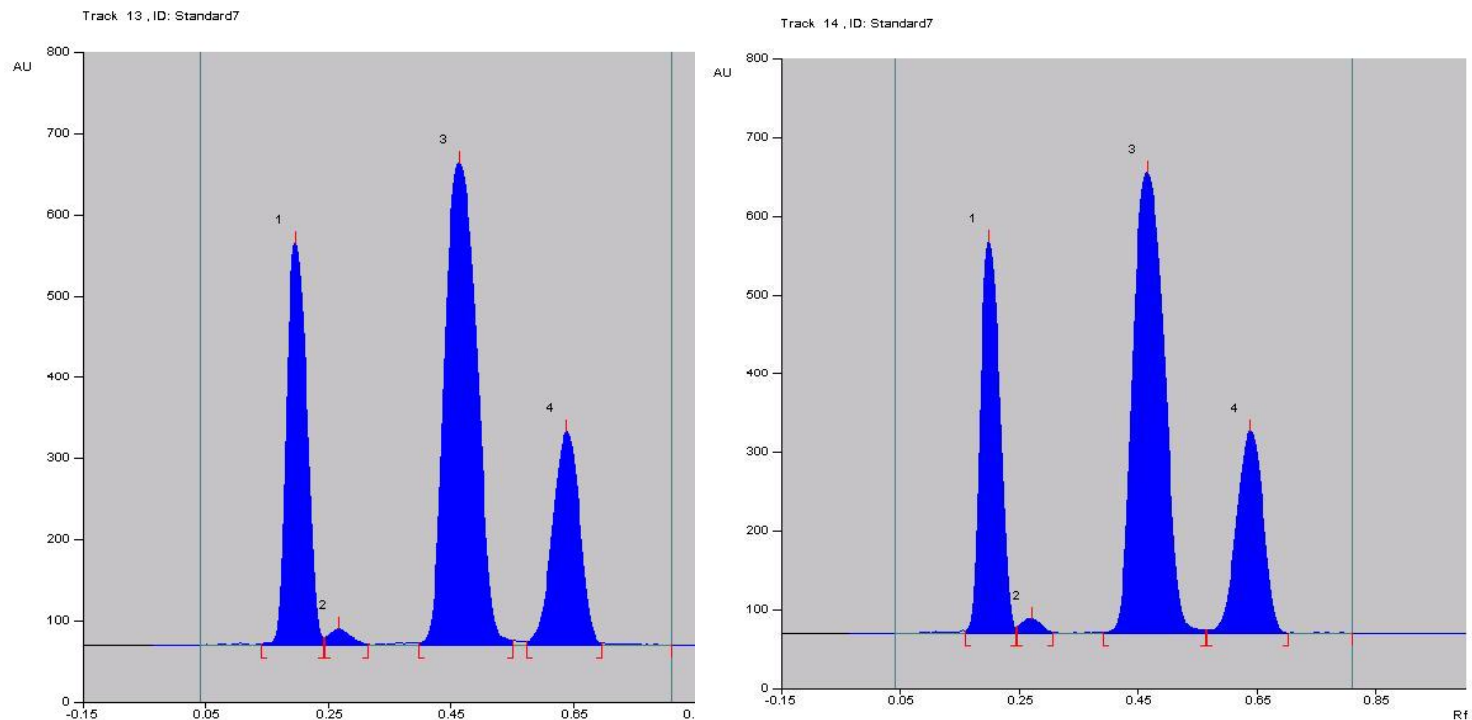


Gamme d'étalonnage réalisée à partir de 2 concentrations de solution, dans le toluène du Test dye 1 (Camag)

Dépôts de : 0.5 – 1 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10  $\mu$ L d'une solution à 10 mg/L  
5 – 10 – 20 – 40 – 60 – 80 – 100  $\mu$ L d'une solution à 1 mg/L



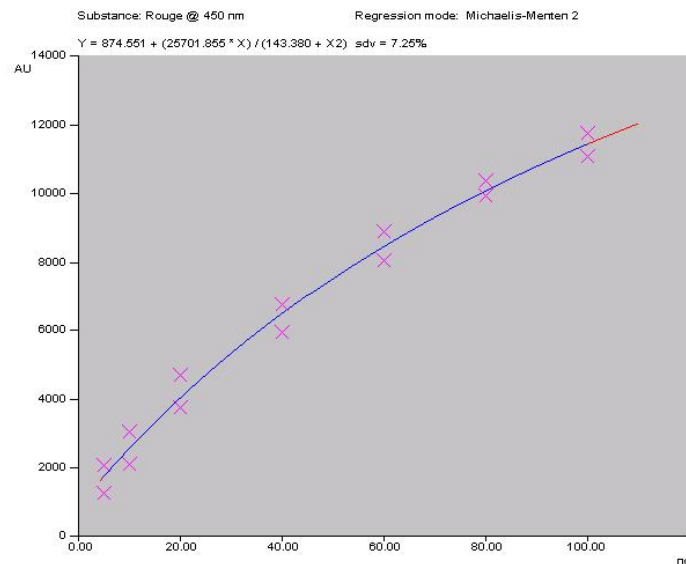
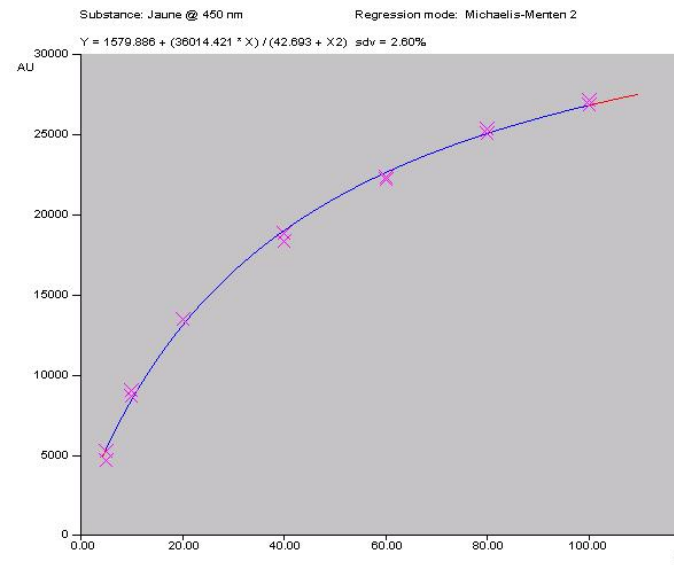
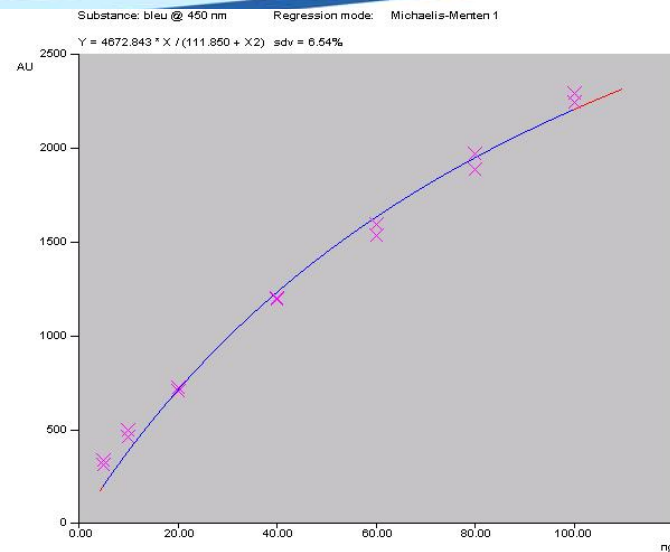
# Chromatogrammes obtenus



Dépôt de : **10  $\mu\text{L}$**  de la solution à 10 mg/L et de **100  $\mu\text{L}$**  de la solution à 1 mg/L dans le toluène : on n'observe pas d'élargissement des pics.



# Calibrations obtenues

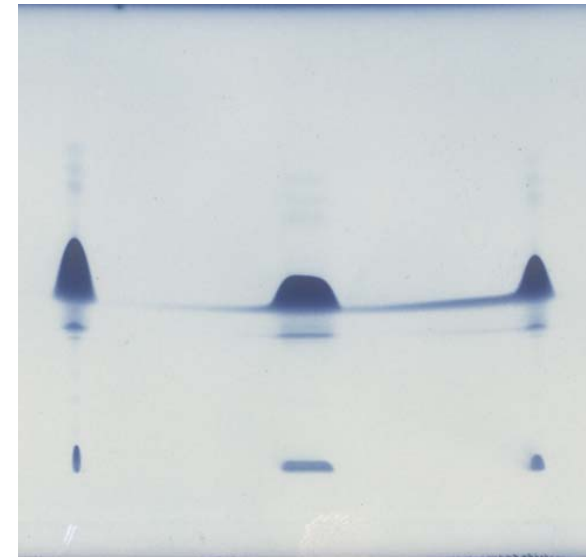
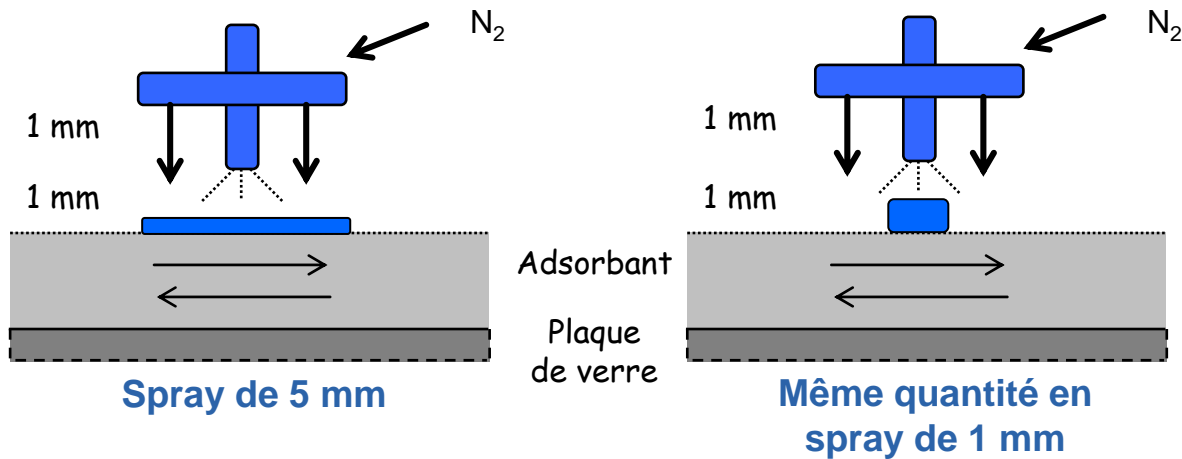


Courbes d'étalonnages réalisées sur les surfaces à partir de l'ensemble des dépôts, des 3 colorants et aux 2 concentrations.

**Les dépôts sont reproductibles** : on peut donc gagner du temps en s'affranchissant des dilutions d'un même échantillon.



# Effet de la largeur de bande déposée



1 2 3

Dépôts de 5  $\mu$ L de solution à 1% de composé dans l'AcOEt :

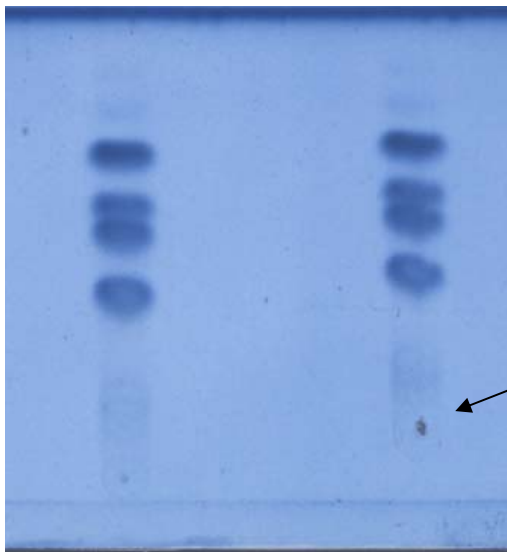
- 1 – Contact
- 2 – Spray de 5 mm
- 3 – Spray de 1 mm

- L'épaisseur pour une même quantité déposée, est plus importante avec un spray de 1 mm, on peut ainsi expliquer pourquoi dans le chromatogramme, la diffusion latérale du composé principal est accentuée sur le dépôt en spray de 1 mm.
- Cette diffusion s'explique par le faible pouvoir de dissolution du solvant de migration.



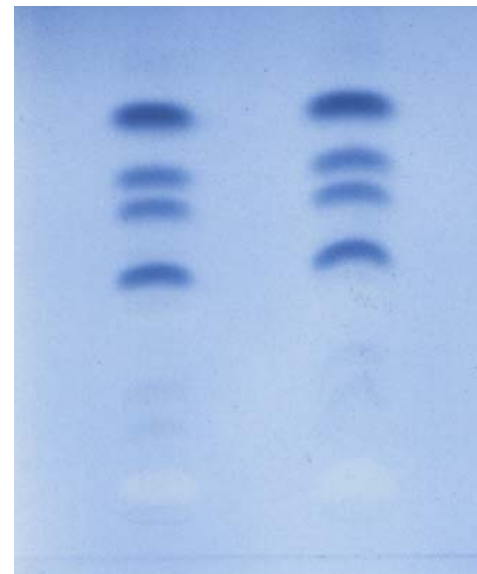
# Autres effets

- Une anomalie des spots peut être observée dans certains cas :



Rayure  
de la  
plaque

Dépôts manuels en contact,  
à droite avec marquage  
de la plaque avec la pointe  
du capillaire ou une marque  
au crayon

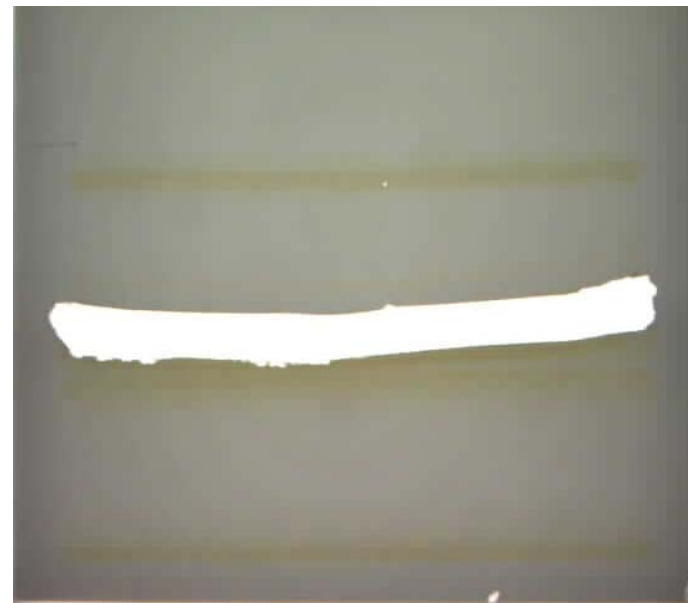
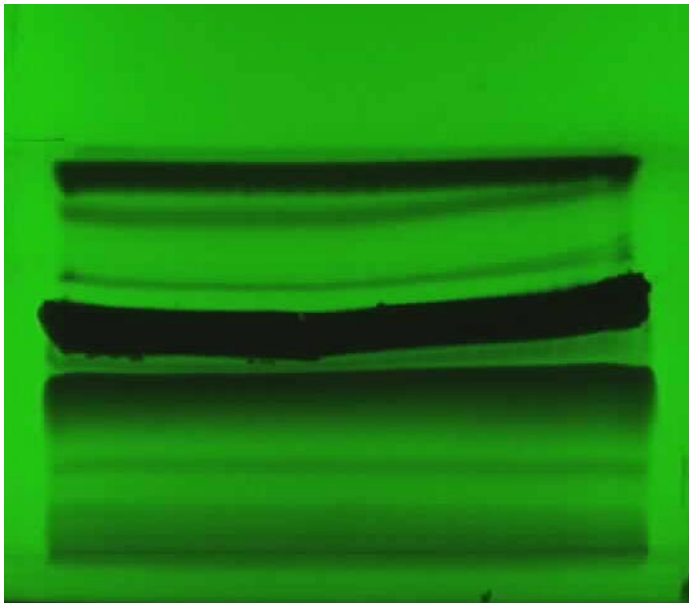


Dépôts par spray, en solution MeOH  
- à gauche bien séché,  
- à droite non séché avant élution



# Dépôt préparatif

- **Objectif** : purification de 160 mg d'échantillon issu de chimie parallèle plaque de 0,5 mm d'épaisseur
  - 1 – vue sous UV à 254 nm
  - 2 – vue après retrait de 120 mg sous lumière visible.



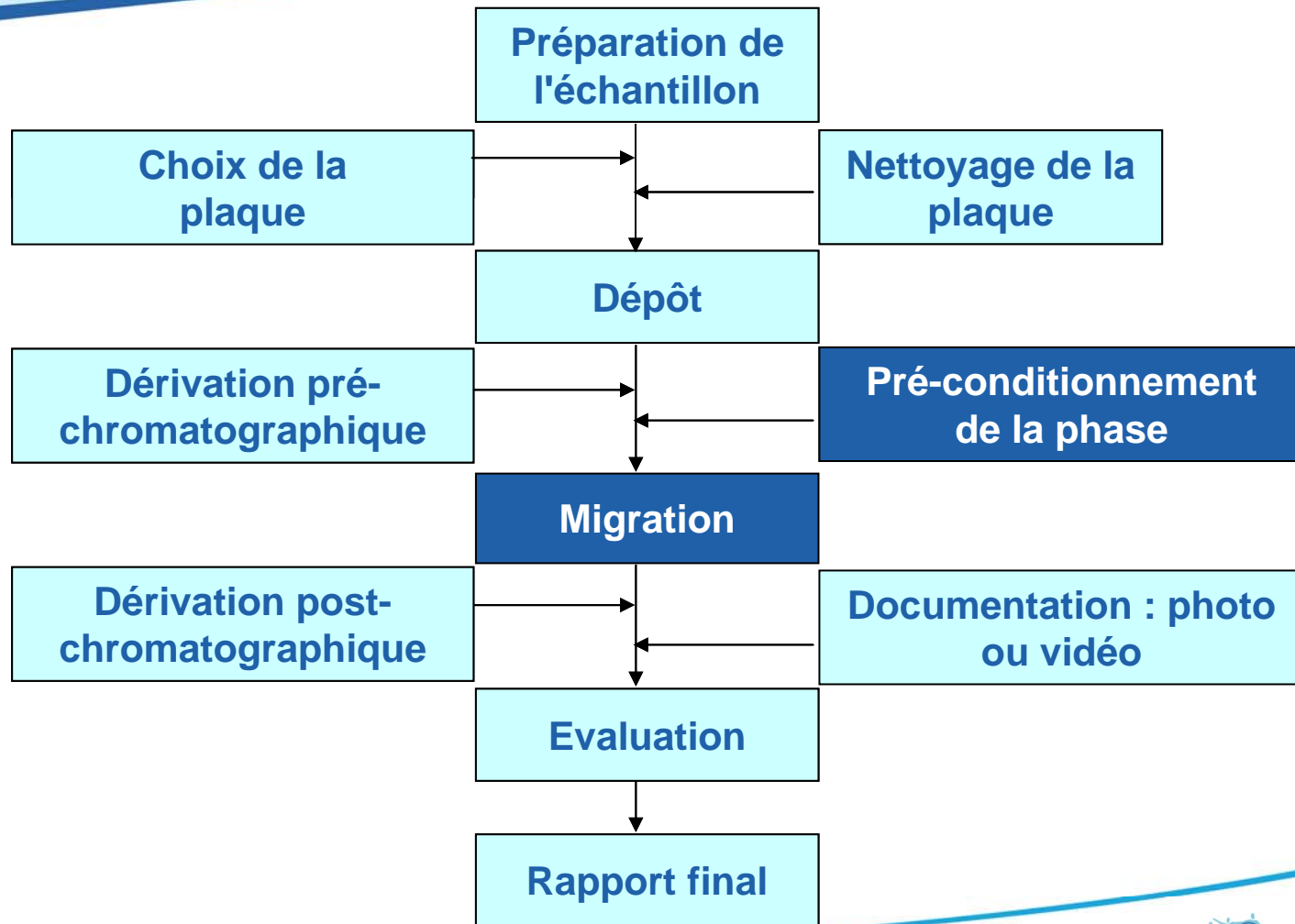


# Conclusion sur le dépôt

- La qualité du dépôt a un impact direct sur le résultat chromatographique, il faudra vérifier que :
  - ▶ Le solvant de dissolution de l'échantillon est inerte et ne perturbe pas le chromatogramme
  - ▶ Le dépôt est bien sec avant le développement de la plaque
  - ▶ La plaque CCM est exempte de rayures
  - ▶ Les dépôts sont bien positionnés sur la plaque
- Le dépôt par spray est préférable pour la quantification : il est pratiquement indépendant du volume déposé et des caractéristiques physico-chimiques du solvant de dissolution.
- Si on dépose par contact, le volume déposé pour les standards et les substances à analyser doit être le même en ayant soin de choisir un solvant qui diffuse peu.



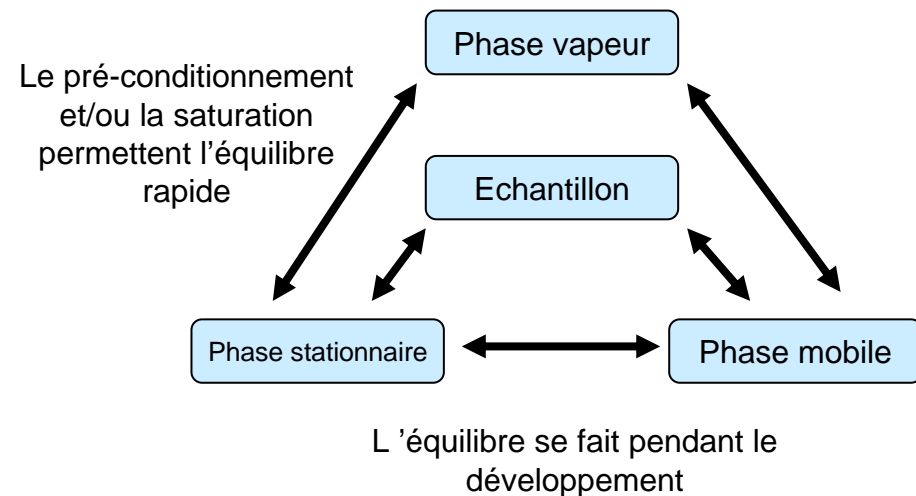
# Les étapes de la CCM





# Rappels : la spécificité de la CCM

- La CCM est une technique séquentielle (off line).
- Chacune de ses étapes est caractérisée par des paramètres qui n'existent pas dans les méthodes de séparation continues (on line) comme :
  - ▶ Le débit de la phase mobile
  - ▶ L'influence d'une phase vapeur
  - ▶ Le processus de développement





# Les grands principes

- En CCM, la phase mobile se déplace par capillarité, force qui aspire le liquide mais comme il y a une résistance au transfert de masse, il en résulte une différence d'énergie  $\Delta E$  :

$$\Delta E = \frac{\gamma \cdot V_m}{D}$$

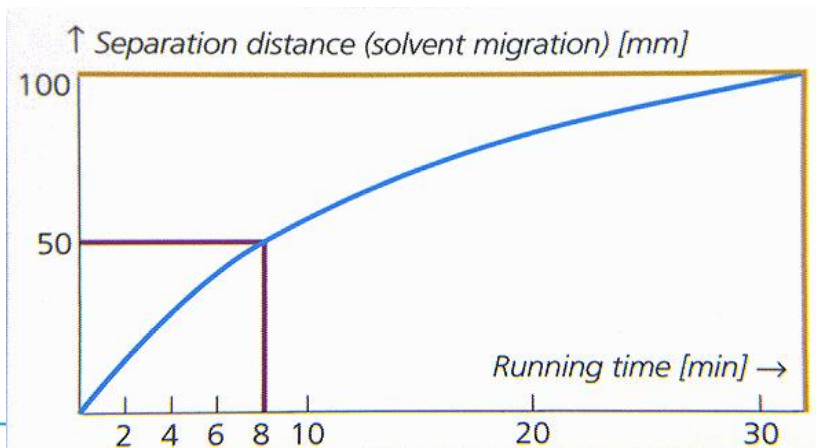
**$E$**  = énergie

**$\gamma$**  = tension de surface

**$V_m$**  = volume molaire

**$D$**  = diamètre des pores

- Le débit de la phase mobile suit une loi quadratique :



**$z_f$**  = distance front/ligne d'immersion

**$\kappa$**  = constante de débit

**$t$**  = temps de développement

$$Z_f = \sqrt{\kappa t}$$

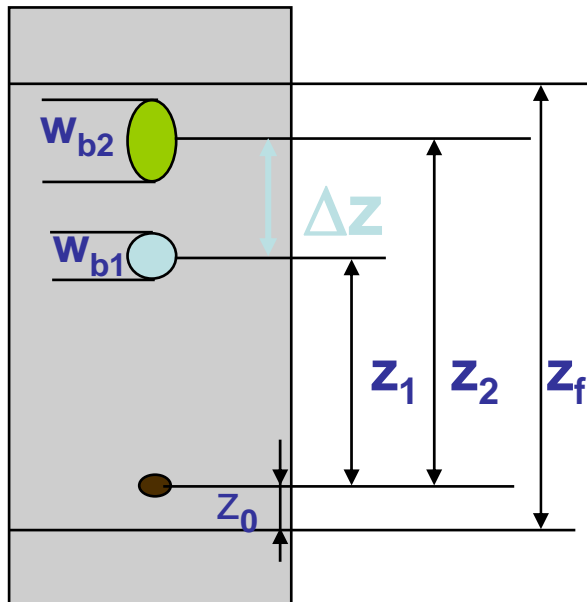


**sanofi aventis**

L'essentiel c'est la santé.



# La résolution en CCM

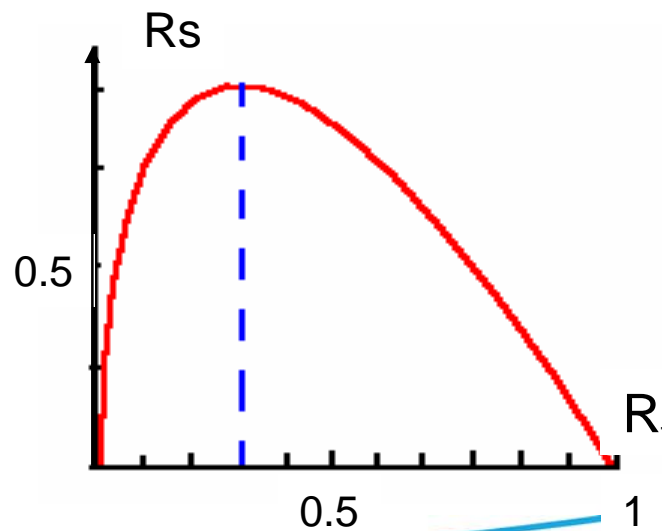


$$(1) R_s = 2\Delta z / W_{b1} + W_{b2}$$
$$(2) R_s = \frac{1}{4} (\alpha-1) \underbrace{(N R_f)^{1/2}}_b \underbrace{(1-R_f)}_c$$

La formule de la résolution (2) est adaptée de l'HPLC pour la CCM, on voit que les termes b et c sont contradictoires :

- ▶ si  $R_f = 0$  entraîne  $R_s = 0$
- ▶ si  $R_f = 1$  entraîne  $R_s = 0$

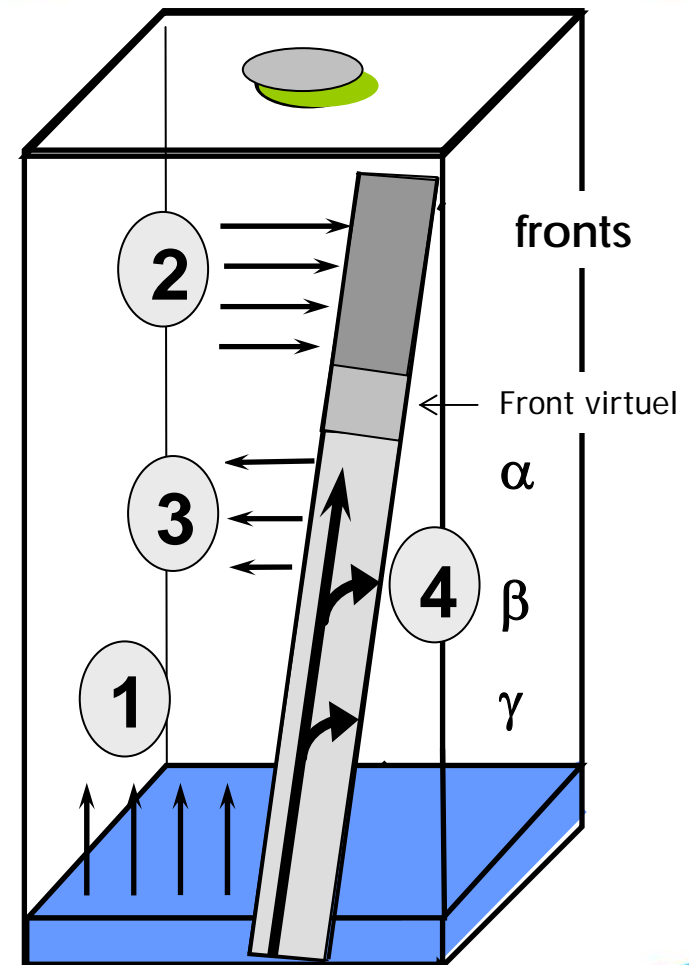
**$R_s$  est maximum pour  $R_f = 0,3$**





# Le développement

- Une autre spécificité de la CCM est la présence d'une phase vapeur dans la cuve de développement.
- Pendant le développement, on distingue 4 processus :
  1. La saturation
  2. Le pré-conditionnement
  3. L'évaporation
  4. La formation de fronts secondaires
- Ces processus dépendent :
  - Du type de cuve,
  - Du pré-conditionnement/saturation





# Le développement ou migration

- C'est l'élément central du processus chromatographique, plusieurs équilibres et plusieurs interactions sont en jeu et affectent le résultat.
- La présence d'une phase vapeur dans la cuve de développement affecte la chromatographie :
  - ▶ **Avantage on peut l'utiliser pour modifier et améliorer la séparation.**
  - ▶ **Inconvénient on ne peut pas la contrôler ni faire de prédiction sur le résultat chromatographique.**
- La géométrie de la cuve sera déterminant pour :
  - ▶ **La quantité de solvant à utiliser**
  - ▶ **Le volume et la composition de la phase vapeur**
  - ▶ **Le pré-conditionnement**
- Il n'y a pas de "bonnes" ou de "mauvaises" cuves, chacune conduira à un résultat différent, la difficulté sera de choisir la mieux adaptée.





# Différents types de cuves disponibles

Camag



Verticales



Horizontales

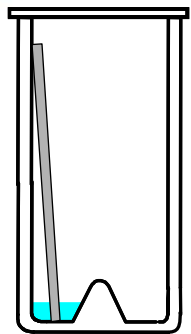


Automatiques

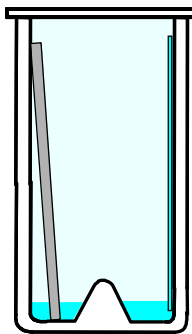
SARSTEDT



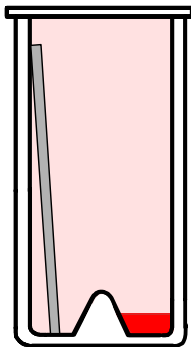
# Cuves double bac (TTC)



non-saturée



saturée

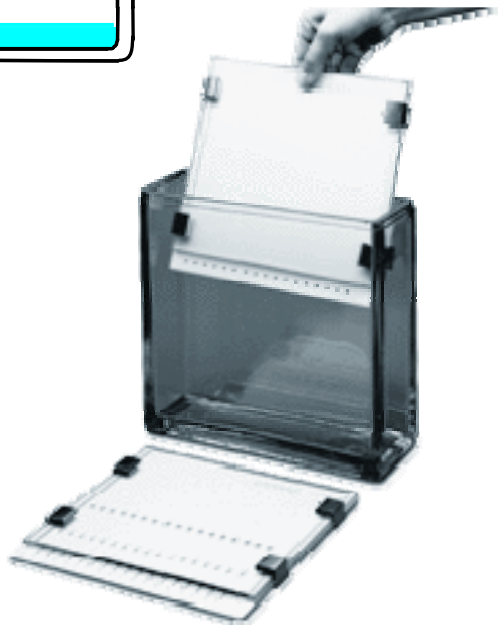
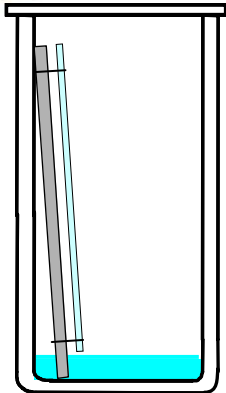


pré-conditionnée

- La plaque doit être positionnée le plus verticalement possible, le support verre contre la paroi, la couche exposée aux vapeurs de solvant.
- En cuve non-saturée, introduire :
  - 5 mL pour cuve 10x10,
  - 10 mL pour une 20x10,
  - 20 mL pour une 20x20.

- **En cuve non-saturée**, introduire le solvant juste avant de positionner la plaque, il s'évapore et la cuve s'équilibre pendant la migration.
- **En cuve saturée**, introduire le solvant dans les 2 bacs, le 2<sup>ème</sup> contenant une feuille de papier filtre, laisser équilibrer 20 mn pour double bac 20x10 avant d'introduire la plaque. Ce mode conduit à des chromatographies plus reproductibles.
- **En pré-conditionnement**, introduire le solvant dans un bac alors que la plaque est introduite dans l'autre. Laisser en contact les vapeurs pendant un temps défini puis introduire le solvant de développement avec précaution. Le solvant de développement peut être le même que le pré-conditionnement, dans ce cas on bascule le solvant dans le 2<sup>ème</sup> bac en penchant la cuve.
- **Les cuves TTC** sont plus chères à l'achat mais plus économiques en solvant

# Cuve fond plat et mode sandwich



- **Les cuves à fond plat**, sont les plus économiques, elles se saturent facilement particulièrement en mode saturé. Elles utilisent une plus grande quantité de solvant :
  - 50 mL pour une cuve 20x20 cm non saturée,
  - 15 mL pour une 10x10 cm.

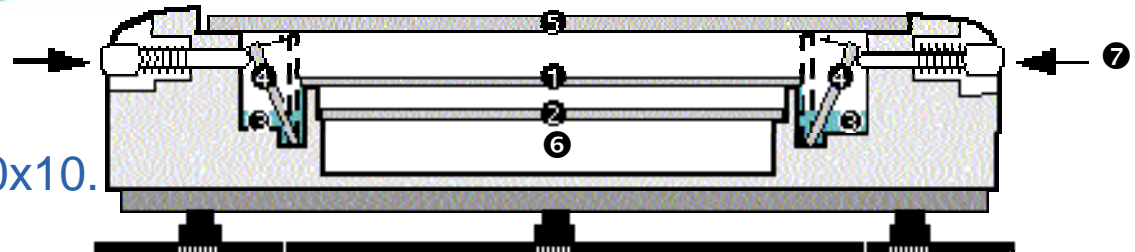
On peut déposer 2 papier filtres pour mieux saturer, celui derrière la plaque doit être plus court pour qu'il n'y ait pas transfert du solvant sur le haut de la plaque.

- **En mode sandwich**, la couche est couverte avec une contre plaque de verre propre sur des gabarits en verre, les 2 plaques sont maintenues par des pinces en inox. Le dépôt est réalisé sur la partie qui dépasse et qui correspond au bas de la plaque.

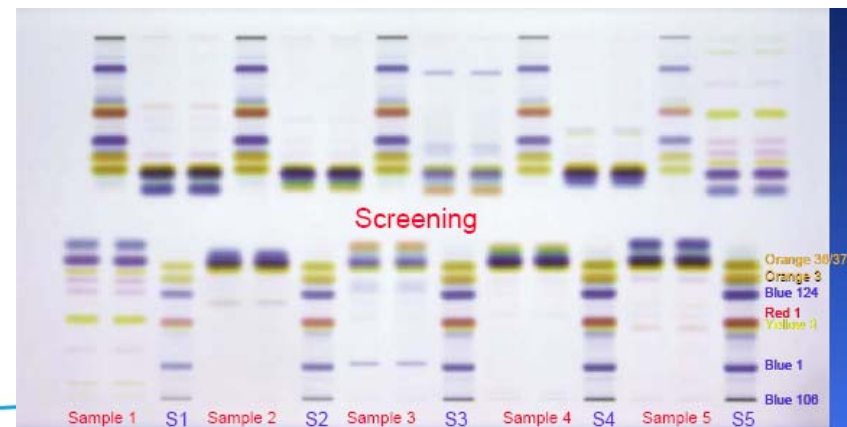


# Cuve horizontale (HDC)

- C'est la plus flexible et la plus économique : 2 mL pour cuve 10x10. On obtient les meilleures reproductibilités, particulièrement en mode sandwich.
- Introduire le solvant dans le réservoir 3, pousser la lamelle avec la vis pour toucher la plaque : un film capillaire de solvant se forme le long de la lamelle et est transféré sur la couche, la migration commence.
- On peut utiliser les 2 côtés simultanément pour doubler le nombre de dépôts : la migration des 2 bords a lieu en même temps comme dans cet exemple où on a fait 30 dépôts.



- 1 – Plaque HPTLC Silice vers le bas
- 2 – Contre plaque pour le mode sandwich (à enlever en mode saturé et non saturé)
- 3 – Solvant de développement
- 4 – Lamelle de contact (à basculer au démarrage)
- 5 – Plaque de fermeture
- 6 – Réservoir central (à remplir en mode saturé)
- 7 – Vis de déplacement de la lamelle

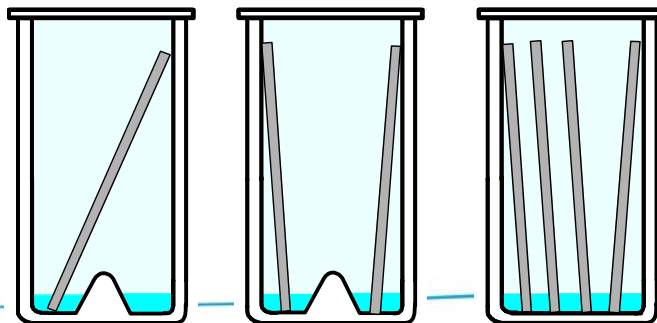




# Règles de base

- **En cuve saturée** : pour ne pas perturber l'équilibre lors de l'introduction de la plaque, faire glisser le couvercle latéralement.
- **En théorie** : il n'est pas nécessaire de pré-conditionner lorsque le solvant de migration est pur ou se comporte comme tel (mélanges azéotropiques) : la migration en sandwich est une excellente solution dans ce cas. Au contraire il faudra saturer la cuve et éventuellement la plaque si l'on utilise des mélanges de solvants complexes et en particulier lorsque l'on utilise un acide ou une base dans le mélange.
- **En pratique** : dans certains cas de mélanges complexes la migration en mode sandwich est avantageuse.

A éviter



# Cuves automatiques

- Leur objectif :
  - ▶ **Rendre plus reproductible le développement**
  - ▶ **Etre indépendant de l'humidité relative (pour les derniers modèles)**
- Le niveau de migration est mesuré à l'aide de diodes, quand le solvant atteint le bon niveau, il est éliminé et la plaque séchée.
- Une adaptation de la méthode sera nécessaire quand on passe de cuve en verre à cuve automatique.

Le grand avantage des cuves automatiques est la répétabilité, il n'y a pas de risque "d'oublier" la plaque et de dépasser la distance de migration voulue.



# Différences induites par la migration

- La finesse des bandes
  - ▶ En cuves non-saturées les bandes sont plus fines,
  - ▶ En cuves saturées les zones sont souvent plus diffuses.
- Les fronts secondaires
  - ▶ Mieux vus dans les cuves non-saturées, plus particulièrement en mode sandwich, dus à la démixtion du solvant et interfèrent avec la séparation.
- Valeurs de  $R_f$ 
  - ▶ Plus la chambre est saturée plus les valeurs de  $R_f$  sont petites.
  - ▶ Les valeurs les plus faibles se trouvent sur les plaques pré-conditionnées.
- Fronts virtuels
  - ▶ Ne sont pas vus dans les chambres horizontales dont le volume est plus petit et donc moins saturées en vapeurs.
  - ▶ Dans les cuves double bac, on observe des fronts virtuels plus prononcés quand la saturation augmente.



# Exemple d'application

Effets observés selon le type de cuve et la présence ou non d'une saturation lors de la séparation de 2 espèces de Schisandra

Plaque : HPTLC Si60,

Eluant : Toluène/AcOEt/CH<sub>3</sub>COOH (70:33:3),

Détection : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lumière blanche

## Cuve double bac (TTC)

## Cuve horizontale (HDC)

Pré-conditionnée

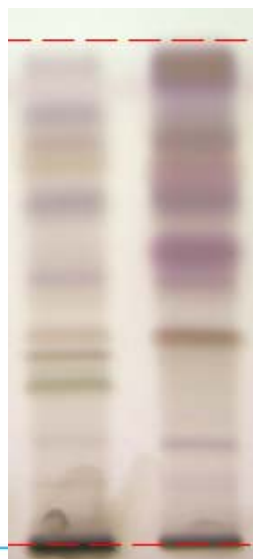
Saturée

Non-saturée

Pré-conditionnée

Saturée

sandwich



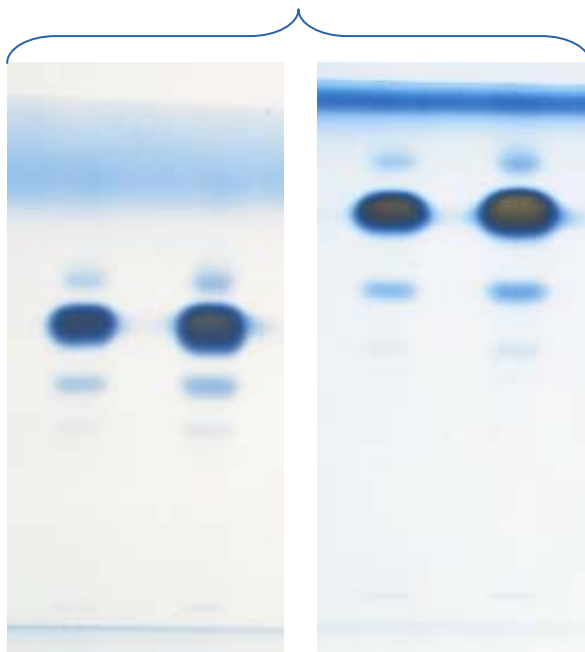


# Autres exemples

Migrations réalisées dans les mêmes conditions sauf la cuve de développement

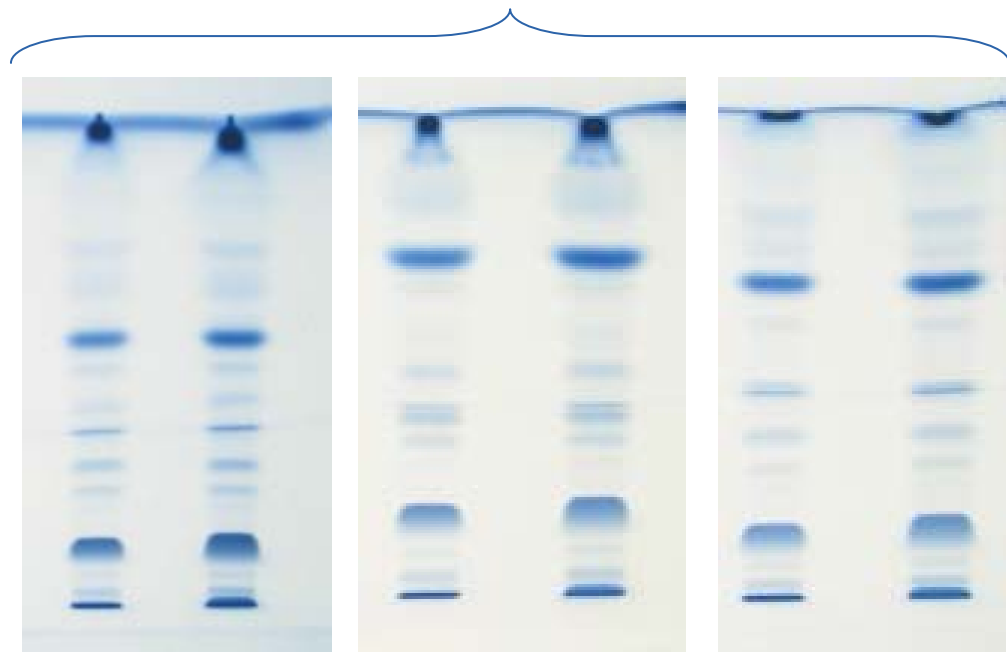
Front plus diffus, Rf plus élevés

Modifications de la résolution et des Rf



Cuves  
TTC  
saturée

TTC  
normale



TTC  
normale

ADC  
sans contre plaque

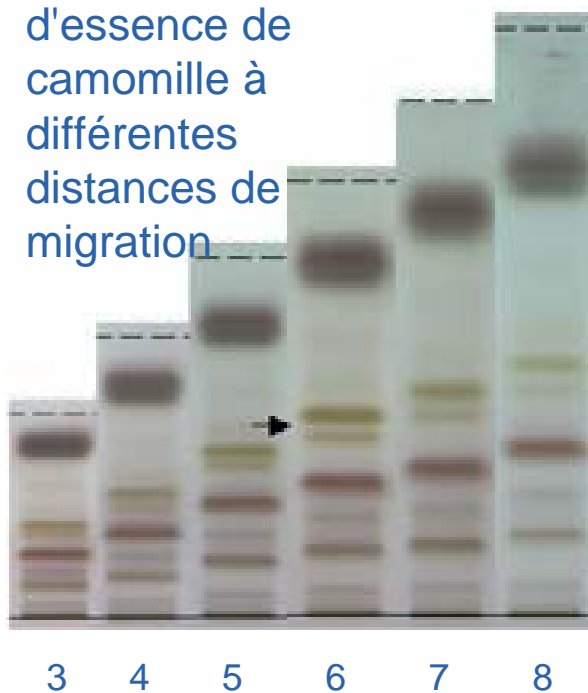
ADC  
avec contre plaque



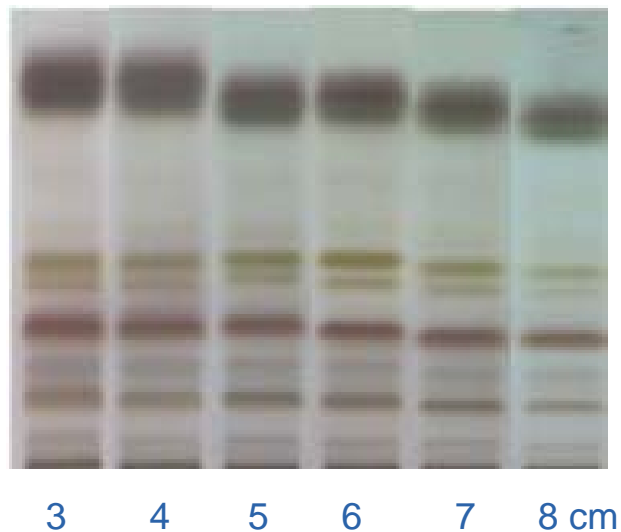
# Impact de la distance de migration

La distance de migration est nécessaire pour obtenir un nombre de plateaux correct, la contre partie est la diffusion qui détériore la séparation et diminue la sensibilité.

Séparation d'essence de camomille à différentes distances de migration



Mêmes chromatogrammes mais avec standardisation à 6 cm.



A gauche, on dirait que plus la distance de migration augmente, mieux on sépare.

Après standardisation, la différence est moins flagrante. Plus la distance de migration est grande plus les spots sont diffus, plus on perd en sensibilité. La meilleure résolution, est obtenue pour une distance de 6 cm.

Distance de migration pour résolution optimum  
En HPTLC : 5 et 7 cm  
En TLC : 10 et 15 cm

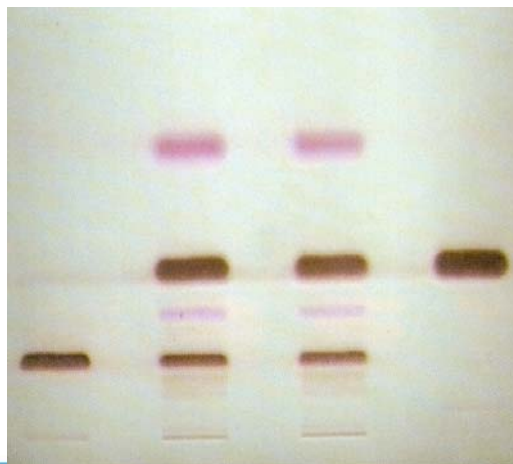




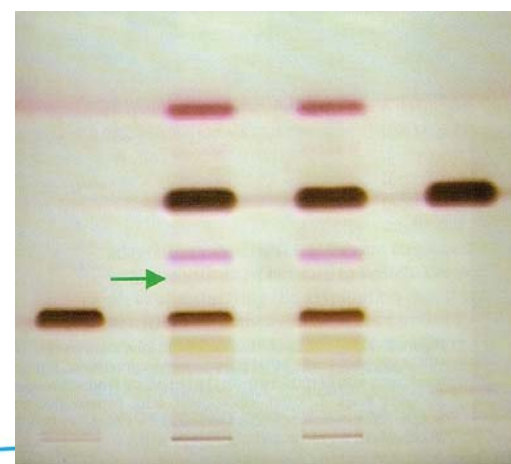
# Distance de migration : astuces

- Pour les échantillons contenant :
  - ▶ Peu de composés si le système est sélectif, une faible distance de migration est conseillée.
  - ▶ Beaucoup de composés avec une séparation délicate, la distance de migration est à augmenter.
- Le développement multiple :
  - ▶ Utile lorsque les composés sont mal séparés en présence de composés ayant un  $R_f$  très faible, la double migration a pour effet de focaliser les spots

Simple migration



Double migration



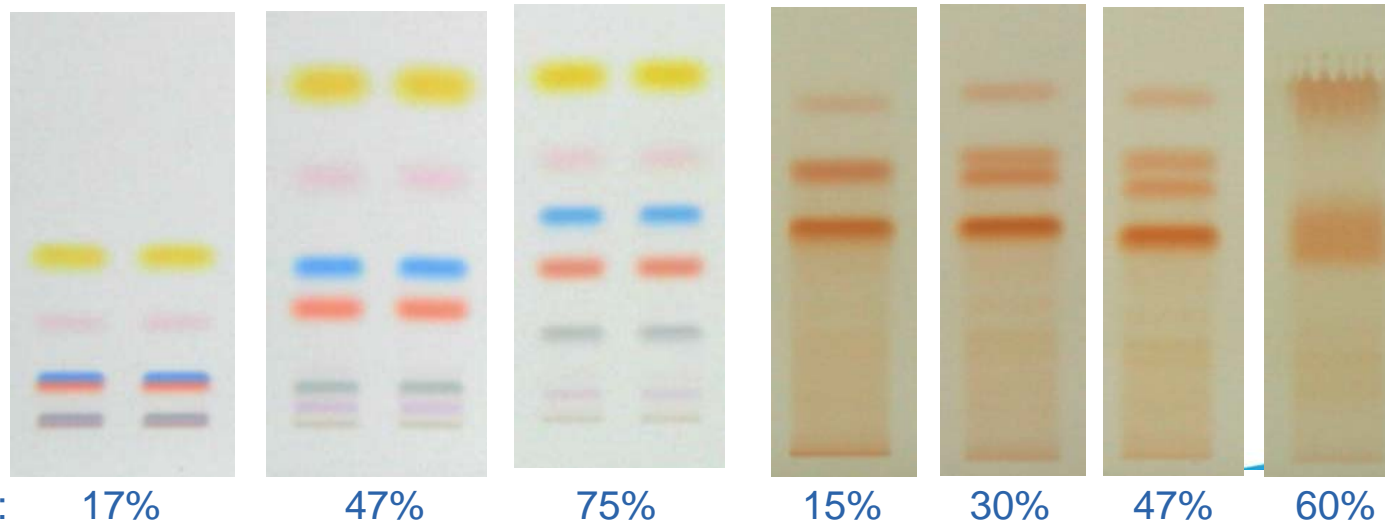


# Influence de l'humidité

- En CCM d'adsorption, le taux d'humidité de l'air a un effet sur l'activité de la silice et engendre des résultats non reproductibles comme montré dans les 2 exemples ci-dessous : plus le taux d'humidité est élevé plus la plaque est désactivée moins les composés seront retenus.
- Dans ce cas, on aura intérêt à bien maîtriser le taux d'humidité. Cette opération peut être programmée dans les cuves automatiques.
- On peut aussi changer de système et choisir la chromatographie de partage sur plaque polaire (CN ou DIOL).

**CCM 1 :**  
Colorants,  
Eluant : Toluène

**CCM 2 :**  
Polyphénols du thé,  
Eluant : Toluène,  
Acétone, HCOOH  
(4,5 : 4,5 : 1)





# Le développement multiple (AMD)

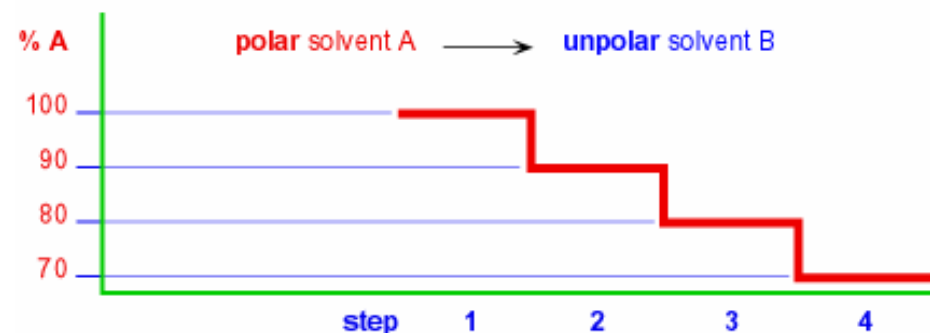
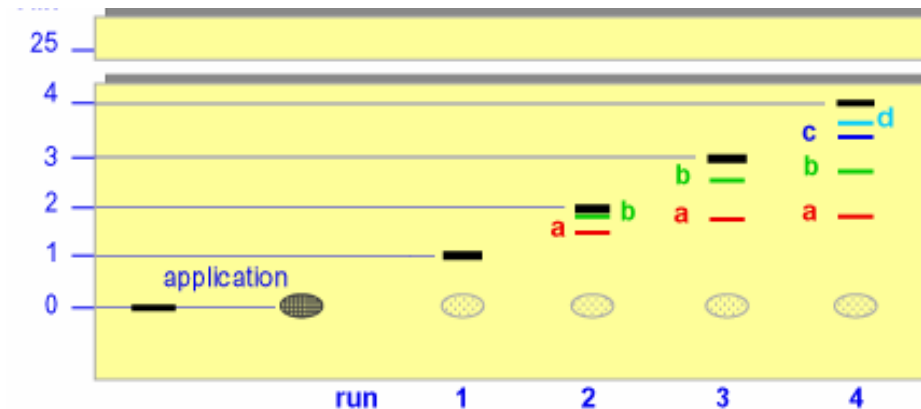
C'est l'équivalent CCM du gradient d'éluant HPLC mais en commençant la migration avec le solvant le plus polaire pour terminer avec le moins polaire.

Principe de fonctionnement :

- ▶ Migrations successives avec des solvants de force éluante décroissante
- ▶ Séchage sous vide entre chaque étape
- ▶ Distances de migration linéairement croissantes de 1, 2 ou 3 mm
- ▶ Nombre d'étapes de 5 à 35

Ceci a pour effet la focalisation des bandes quelle que soit leur position sur la plaque.

Ce principe permet par ailleurs de s'affranchir de l'effet de la matrice.



# Principe de l'AMD

**1<sup>ère</sup> étape** : avec un solvant polaire (en rouge), pour focaliser le dépôt.

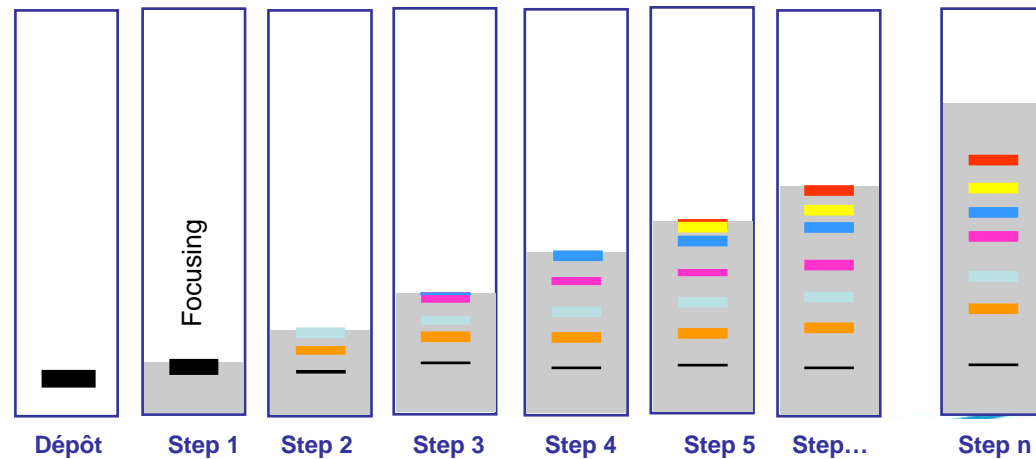
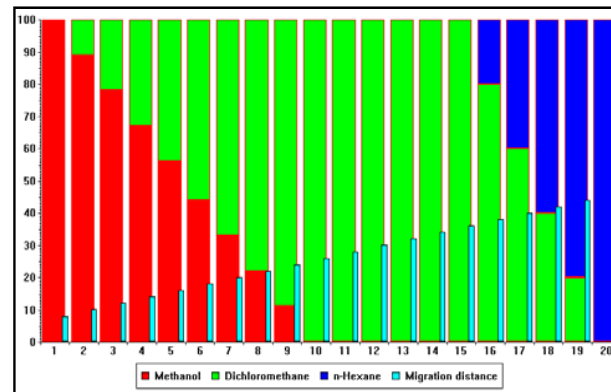
**Étapes suivantes** : diminuer régulièrement la proportion en solvant polaire (rouge) pour augmenter la proportion du solvant moins polaire (vert). Terminer en augmentant la proportion du solvant totalement apolaire (bleu).

Les composés sont entraînés sur la plaque selon leur polarité : lorsque le solvant n'est pas assez polaire, le composé est "abandonné", il ne migrera plus lors des étapes suivantes, les solvants (moins polaires) n'auront pas d'effet de diffusion sur lui.

**A chaque étape**, la distance de migration augmente régulièrement du pas indiqué sur le graphe bleu clair.

La grande reproductibilité et la grande efficacité de ce système sont ses points forts. La mise au point des méthodes est délicate, le temps de migration est allongé par rapport à une cuve normale.

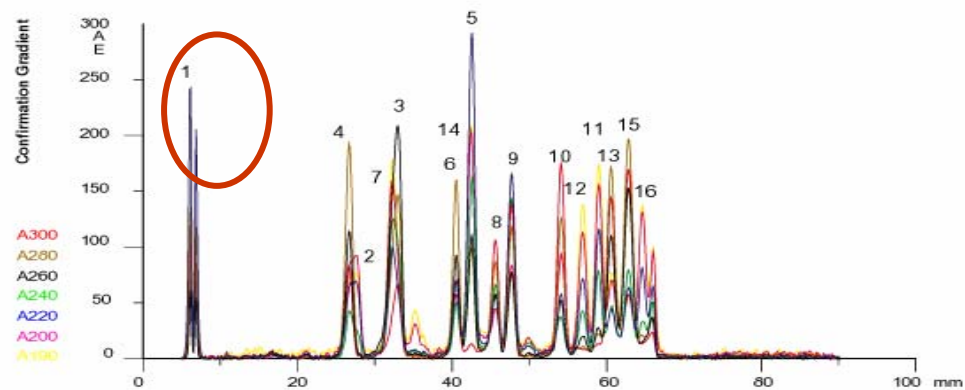
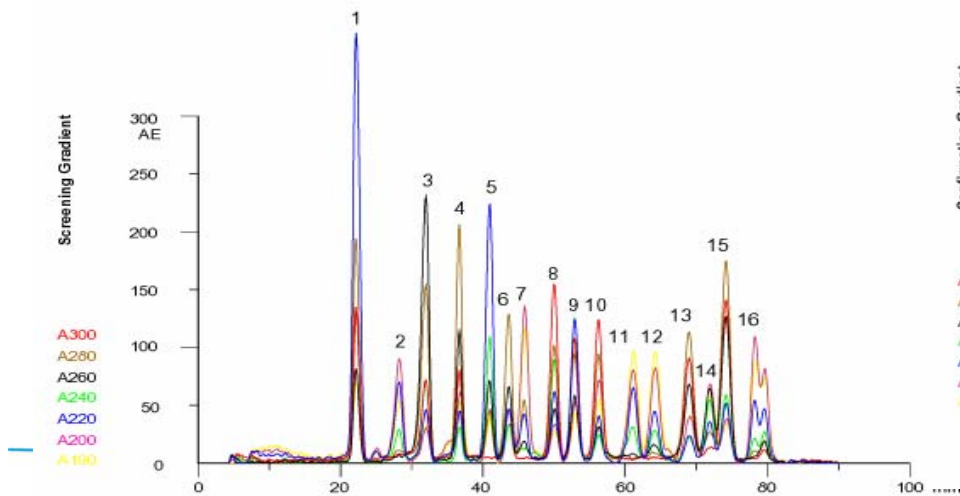
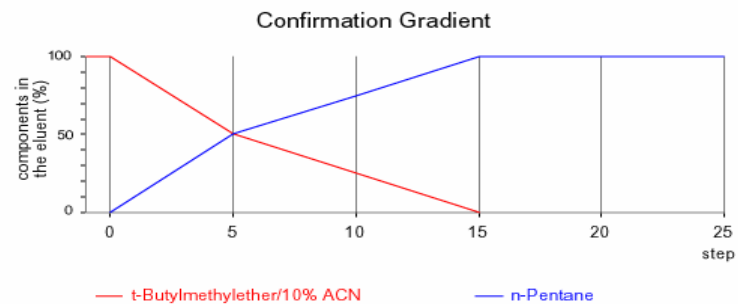
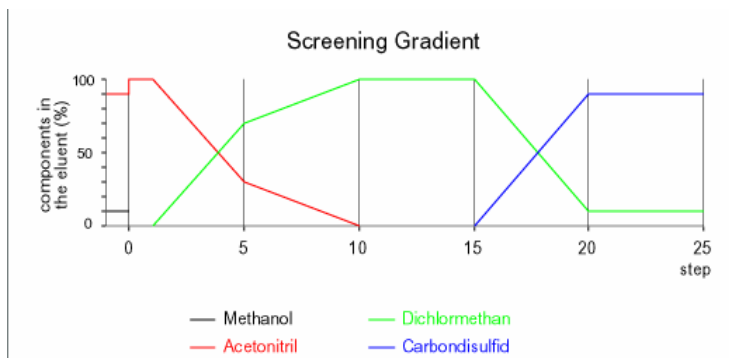
Rouge : MeOH – Vert : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – Bleu foncé : Hexane  
Bleu clair : distance de migration





# Méthode AMD : avantages

Dans cet exemple 2 gradients avec des solvants de polarité différente sont appliqués pour confirmer la présence de pics cachés dans cette recherche de pesticides dans les eaux de rejet.





# Conclusion sur la migration

- Du fait du grand nombre d'interactions, il est indispensable, pour une bonne reproductibilité, de décrire de manière détaillée les conditions à appliquer
  - ▶ Rédiger éventuellement un processus de bonnes pratiques opératoires
- Optimiser la distance de migration au cas par cas
  - ▶ Ne pas standardiser ce paramètre
- Faire attention à l'humidité relative
  - ▶ Plus particulièrement dans le cas d'éluants peu polaires
- Ne pas conserver les éluants plus de 24 h
  - ▶ Une évaporation du composé le plus volatil peut générer des distorsions
- Penser à faire du développement multiple
  - ▶ De manière manuelle ou automatique





# Quelques mots sur le choix de l'éluant

- Le choix de l'éluant ou phase mobile, est primordial pour obtenir une bonne séparation.
- Trouver le bon mélange peut être long et fastidieux.
- La société Camag a développé une méthode systématique et rapide pour optimiser une séparation, c'est-à-dire déterminer rapidement le système éluant.
- Cette méthode est basée sur les 2 paramètres fondamentaux que sont la force éluante et la sélectivité des solvants selon la théorie du triangle de SNYDER

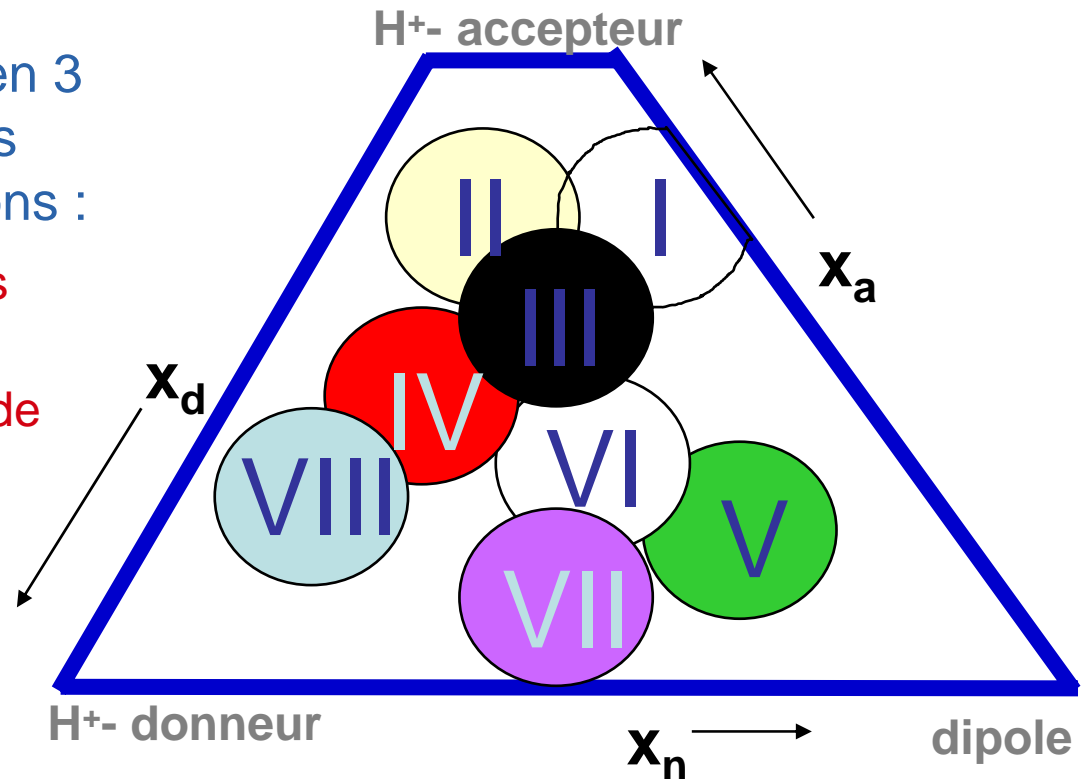


# Le triangle de sélectivité de Snyder

Snyder a classé les solvants en 3 catégories en fonction de leurs capacité à créer des interactions :

1.  $X_a$  qui mesure les accepteurs de protons  $H^+$
2.  $X_d$  qui mesure les donneurs de protons  $H^+$
3.  $X_n$  qui mesure les attractions dipolaires

Les valeurs varient lorsqu'on se déplace vers les pointes du triangle.





# Les différents groupes de sélectivité

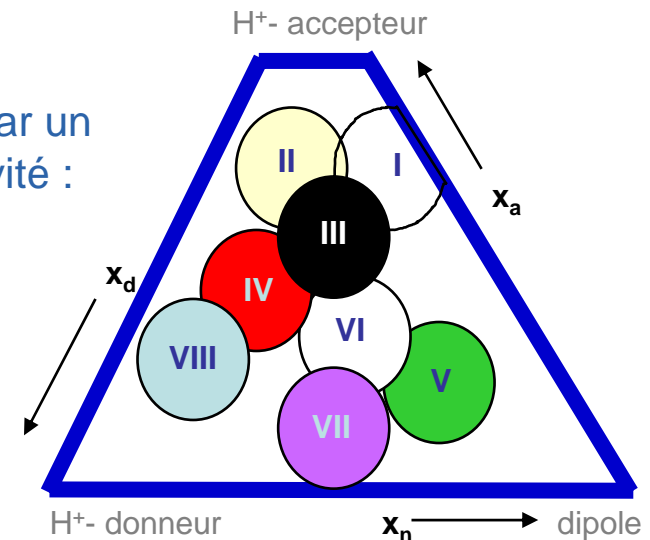
SNYDER a classé les solvants en VIII groupes de sélectivité en fonction de leur aptitude à donner les types différents d'interactions soluté-solvant.

Le remplacement d'un solvant d'un groupe de sélectivité par un autre solvant du même groupe ne changera pas la sélectivité : l'ordre d'éluion sera le même mais cela peut jouer sur la solubilité de l'échantillon et la force éluante.

- I Ethers aliphatiques, Trialkylamines
- II Alcools aliphatiques
- III Pyridine, THF
- IV Alcool Benzylque, Ethylène Glycol, Acide Acétique
- V  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
- VI Cétones et Esters aliphatiques, Dioxane, Nitriles
- VII Hydrocarbures aromatiques (halogénés), Composés nitrés
- VIII Chloroforme, Eau

Pentane, Hexane, Heptane : force éluante nulle et pas de sélectivité

**Groupe IV** : peu utilisé car Acide Acétique, plus utilisé comme modificateur acide, EG et Alcool Benzylque, visqueux et non volatils.





# Force éluante et sélectivité

Comparaison de la migration avec des mélanges de solvants à force éluante équivalente :

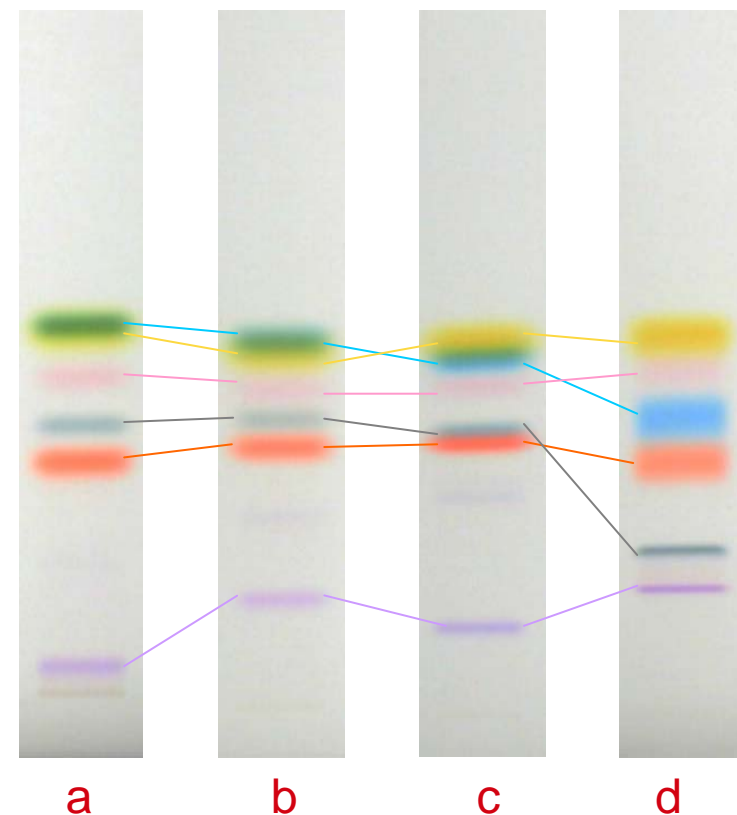
- |                                   |             |
|-----------------------------------|-------------|
| a) 15 % Acétate d'Ethyle / Hexane | Groupe VI   |
| b) 20 % Acétone / Hexane          | Groupe VI   |
| c) 10 % Isopropanol / Hexane      | Groupe II   |
| d) Chloroforme pur                | Groupe VIII |

Dans les 4 cas :

- ▶ Les composés migrent sensiblement au même  $R_f$  : les solvants de développement ont une force éluante voisine.
- ▶ Les composés ne sont pas séparés dans le même ordre : le solvant de développement n'a pas la même sélectivité.

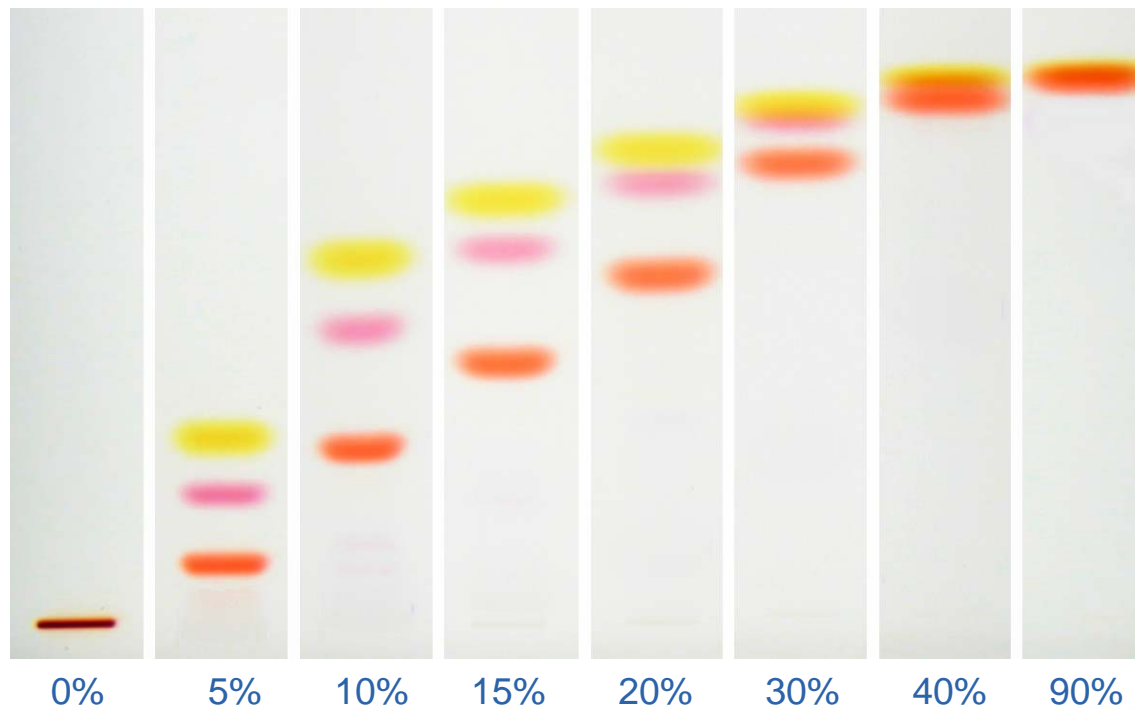
**La force éluante** c'est ce qui fait positionner les composés sur la plaque.

**La sélectivité** c'est ce qui les fait se séparer.



# Force éluante

- On augmente la force éluante en ajoutant un solvant fort : MeOH, HCOOH... ou un autre solvant dans l'exemple c'est l'AcOEt.
- On diminue la force éluante en ajoutant un solvant faible : Hexane, Heptane, Cyclohexane...

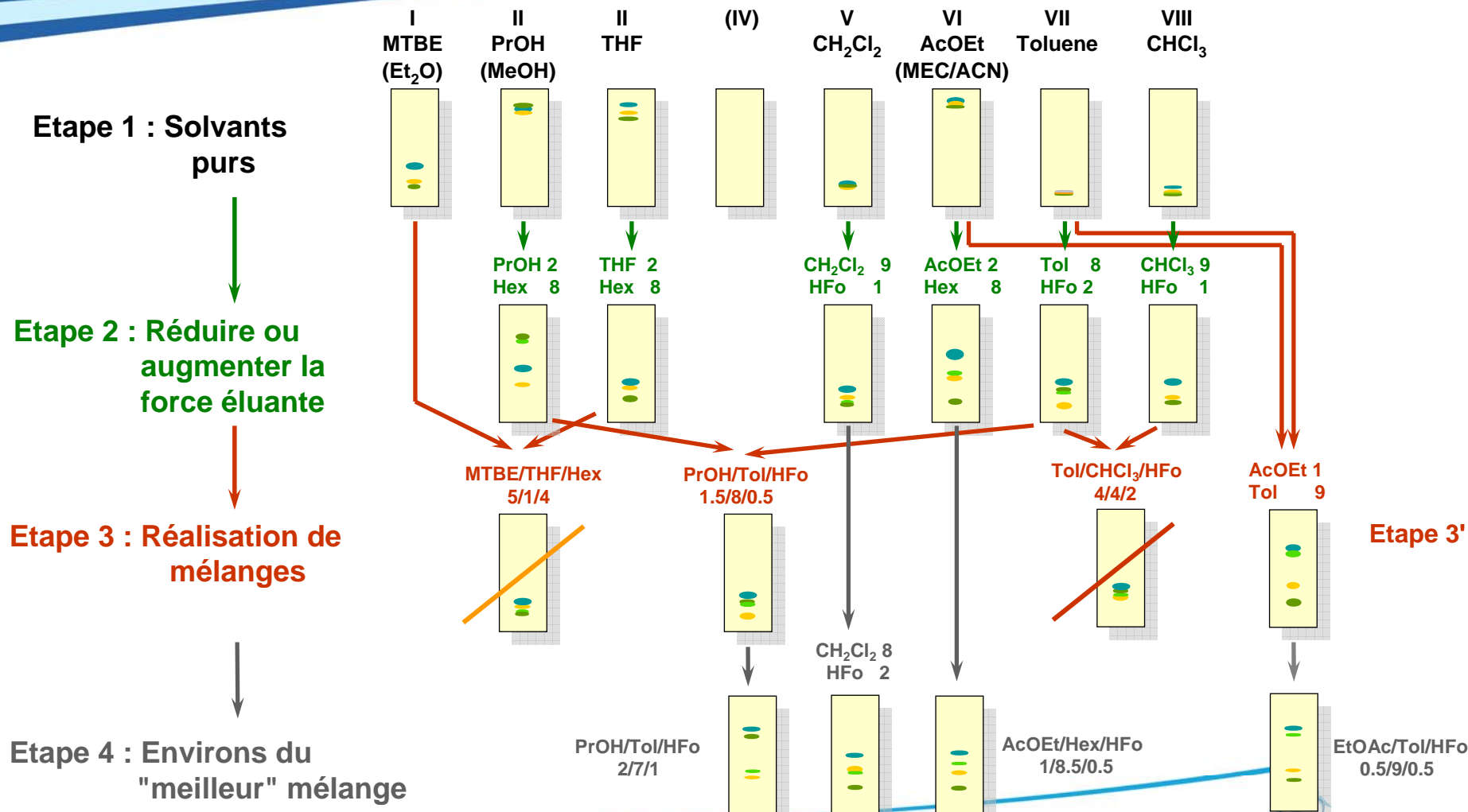


Phase mobile :  
Hexane + x% AcOEt

Quand il y a une majorité  
d'AcOEt, on ne peut pas savoir  
si le solvant est sélectif vis-à-vis  
des composés



# Méthode d'optimisation CAMAG



HFo = Acide Formique ; PrOH = Propanol ; Hex = Hexane ; AcOEt = Acétate d'Ethyle ; Tol = Toluène



# Méthode d'optimisation CAMAG

Méthode expérimentale basée sur la sélectivité des solvants selon SNYDER.

En réalisant une chromatographie après avoir sélectionné un (ou 2) solvant(s) de chaque groupe de sélectivité, on couvre tous les domaines de sélectivité, on peut ainsi rapidement éliminer les solvants qui n'ont pas d'affinité avec les composés à analyser. Procéder en 4 étapes comme suit :

- **ETAPE 1** : choisir 1 ou 2 solvants dans chaque groupe (sauf Groupe IV). Réaliser, la migration avec les solvants purs. Trois cas se présentent :

1 – Les composés ont un  $R_f$  acceptable (entre 0,2 et 0,8) : la séparation est correcte, la mise au point est terminée sinon, passer à l'étape 3.

2 – Tous les composés sont à un  $R_f > 0,8$  : la force éluante est trop élevée, remplacer le solvant par un autre du même groupe mais ayant une force éluante plus faible ou diminuer la force éluante en "diluant" le solvant avec un solvant apolaire type hexane.

3 – Tous les composés sont à un  $R_f < 0,2$  : le solvant a une force éluante trop faible, remplacer ce solvant par un autre du même groupe mais ayant une force éluante plus forte ou augmenter la force éluante en ajoutant un modificateur polaire comme Eau, Acide ( $\text{HCOOH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ ), Base (Diéthylamine/ $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ou MeOH.

- **ETAPE 2** : on procède à l'ajustement de la force éluante pour les cas 2 et 3 :

- ▶ Cas 2 : Si le solvant a une force éluante très forte (tous les composés sont situés sur le front du solvant) commencer par diluer au  $\frac{1}{4}$ , s'il y a déjà une amorce de séparation, diluer au  $\frac{1}{2}$ .

- ▶ Cas 3 - Ajouter # 10 % de modificateur.

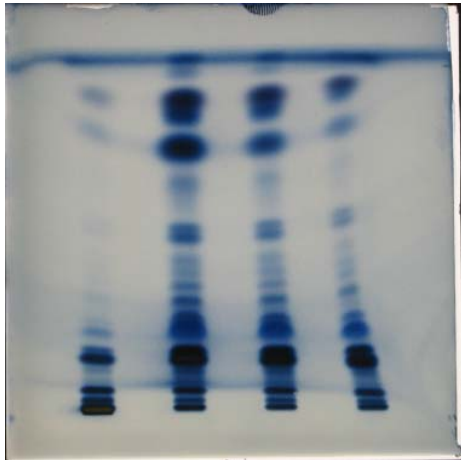
Si la séparation est satisfaisante, la mise au point est terminée sinon passer à l'étape 3

- **ETAPE 3** : Réaliser des combinaisons de solvants de différents groupes en fonction de la séparation obtenue aux étapes précédentes en mélange 1 pour 1 : s'il y a amélioration, passer à l'étape 4, s'il n'y en a pas abandonner. Dans tous les cas, si la séparation est dégradée, abandonner le mélange.

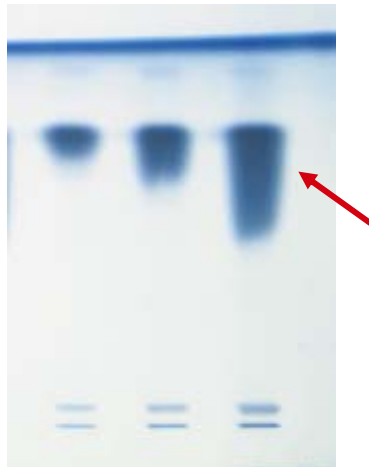
Ne pas essayer toutes les combinaisons, les réaliser une à une et si on obtient la séparation, arrêter.



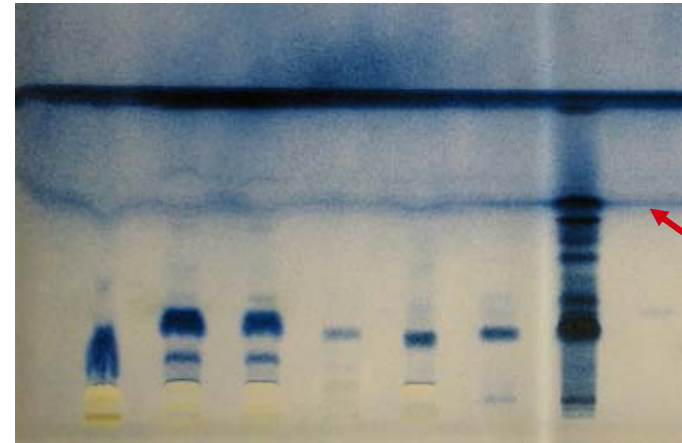
# Quelques anomalies



Effet de bord, la plaque a été coupée en laissant un bord à nu



L'éluant n'est pas assez solvant du composé pendant la migration : remplacer par un autre du même groupe



Front de solvant dû à la présence d'ammoniaque dans l'éluant et qui a un effet de lavage de la plaque : une saturation devrait diminuer ce phénomène







# Bibliographie

- High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants
  - ▶ de Eike Reich et Anne Schilbli, Ed. Thieme
- Applied Thin-Layer Chromatography : Best Practice and Avoidance of Mistakes
  - ▶ de Elke Hahn-Deinstrop, Ed. WILEY-VCH
- Extraits des CBS (Camag Bibliography Service)



Merci de votre attention