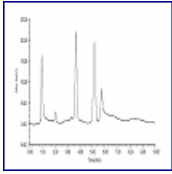


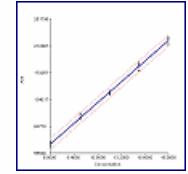
De la CCM à la CPL : Trucs et astuces

Jean-Marc Roussel

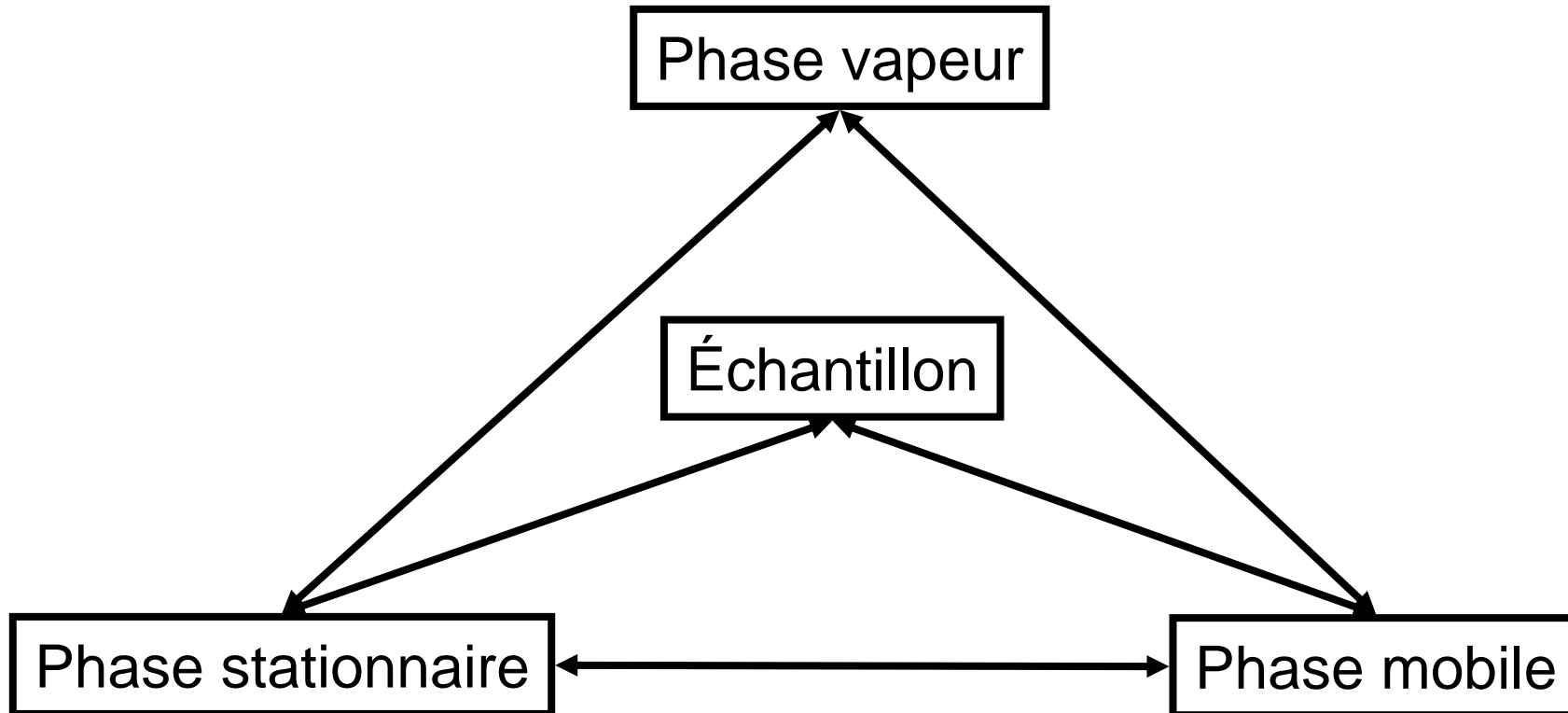
cccm – juin 2009

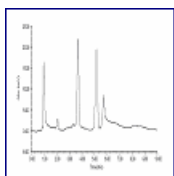


Développement de méthode en CCM

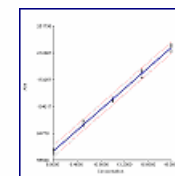


- 3 phases sont à prendre en compte :

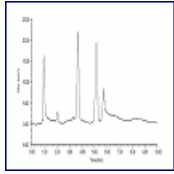




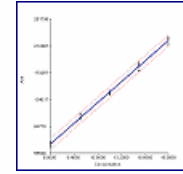
Développement de méthode en CCM



- Quelques paramètres à prendre en compte dans le choix de la plaque de CCM :
 - Activité de la phase stationnaire
 - Contamination / prélavage
 - méthanol / isopropanol par migration ou immersion
 - séchage (30 min à 120 °C)
 - Liant
 - Fabricant / reproductibilité des lots
 - Fabricant / liaison CCM chromatographie flash

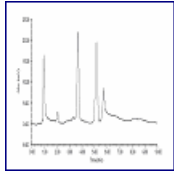


Développement de méthode en CCM

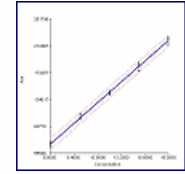


Le problème de l'eau :

- Les phases stationnaires polaires non greffées (silice, alumine) sont des matériaux extrêmement avides d'eau.
- Sur la silice, après 3 minutes 50 % de l'eau est re-adsorbée.
- Sur l'alumine, après 12 minutes 80 % de l'eau est re-adsorbée.
 - En quelques minutes, l'humidité de l'air est adsorbée.
 - Si les plaques sont activées et/ou stockées au dessiccateur, que se passe-t-il durant le dépôt ?

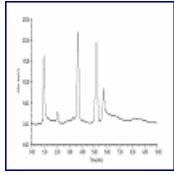


Développement de méthode en CCM

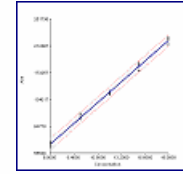


Le problème de l'eau :

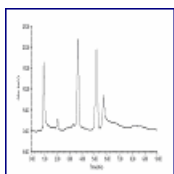
- Il n'est pas forcément nécessaire d'activer les plaques (désactivation naturelle, influence de l'humidité relative sur la séparation).
- Activer juste avant l'application est illusoire.
- Si nécessaire, il faut maintenir une humidité relative constante et contrôlée à l'aide de dilutions d'acide sulfurique ou de solutions saturées de sel.



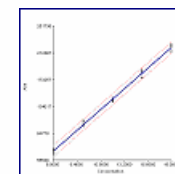
Développement de méthode en CCM



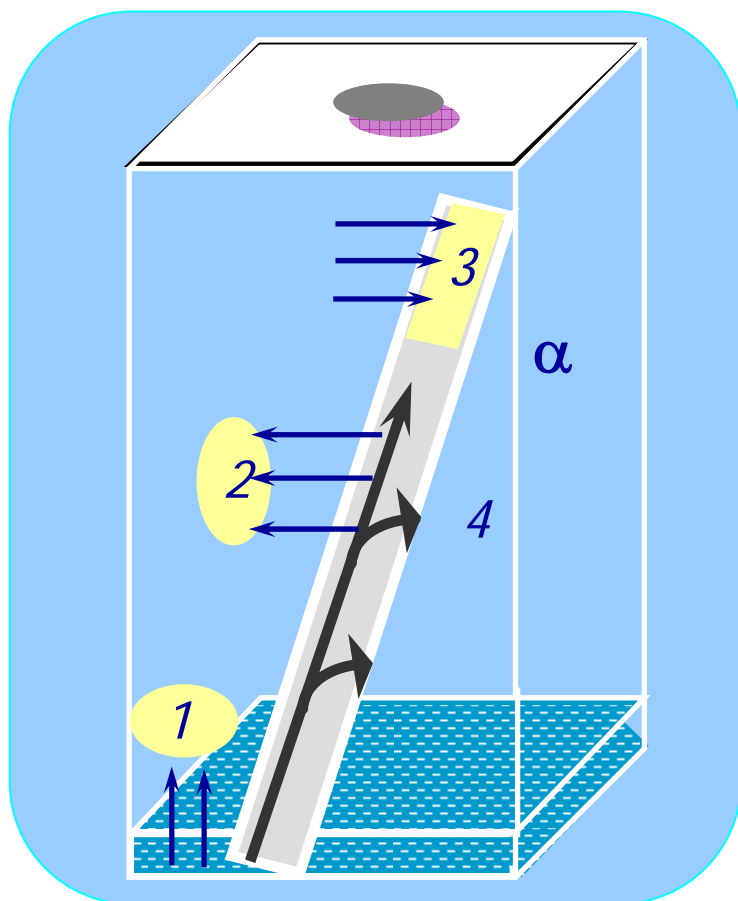
- La phase mobile a pour taches :
 - Dissolution de l'échantillon
 - Désorption de l'échantillon de la phase stationnaire
 - Transport de l'échantillon à une distance de migration acceptable
- La phase mobile doit, d'une manière générale :
 - Être simple (maximum 4 composants)
 - Être non toxique
 - Être de qualité chromatographique
 - Ne pas générer de réactions secondaires
 - Éviter la démixtion (pressions de vapeur, polarités équivalentes)
 - Avoir une faible viscosité



Développement de méthode en CCM

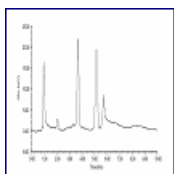


- Problèmes liés à la phase vapeur

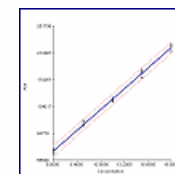


d'après © Camag

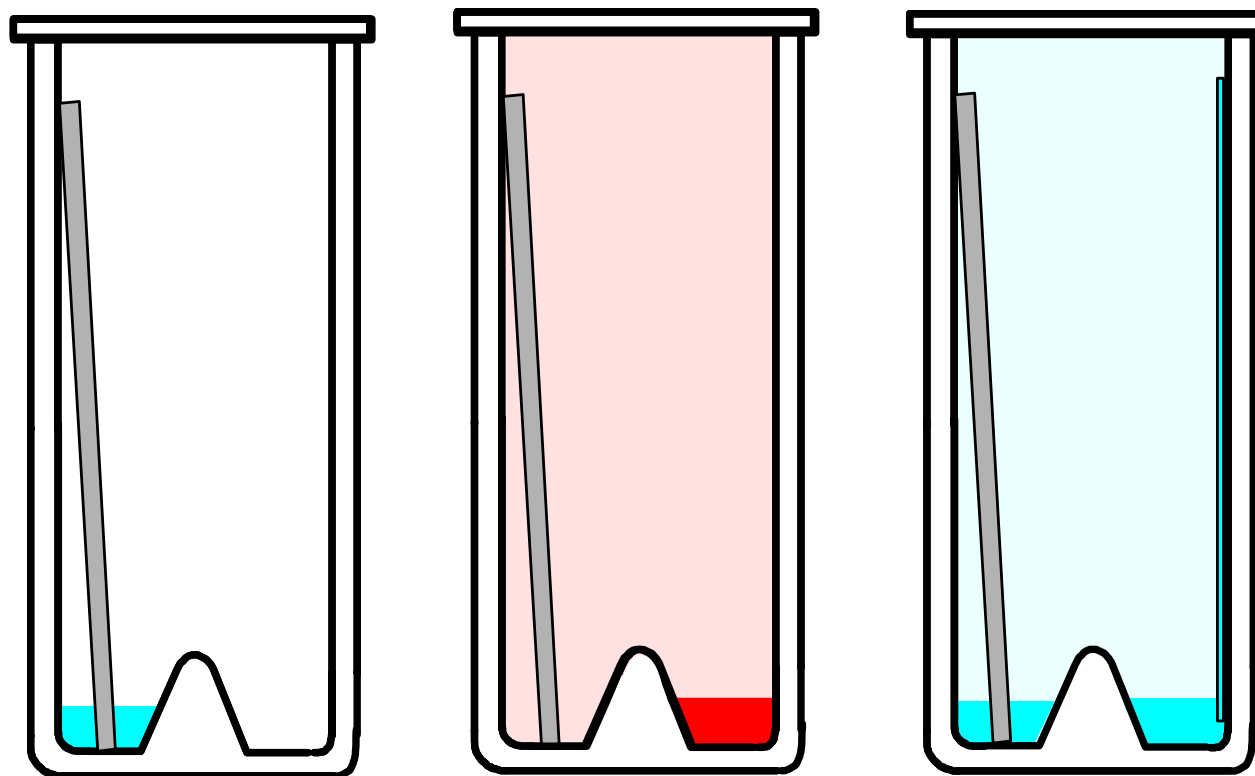
- **Elle n'existe pas sur la colonne de chromatographie flash**
- Elle influence le mélange des solvants (gradients non contrôlés)
- L'humidité relative influence l'activité de la phase stationnaire
- Avec ou sans pré-saturation ?
- Avec ou sans conditionnement de la phase stationnaire ?
- Front réel ou front virtuel ?



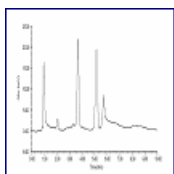
Développement de méthode en CCM



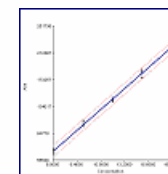
- Solution possible : cuves à double bac



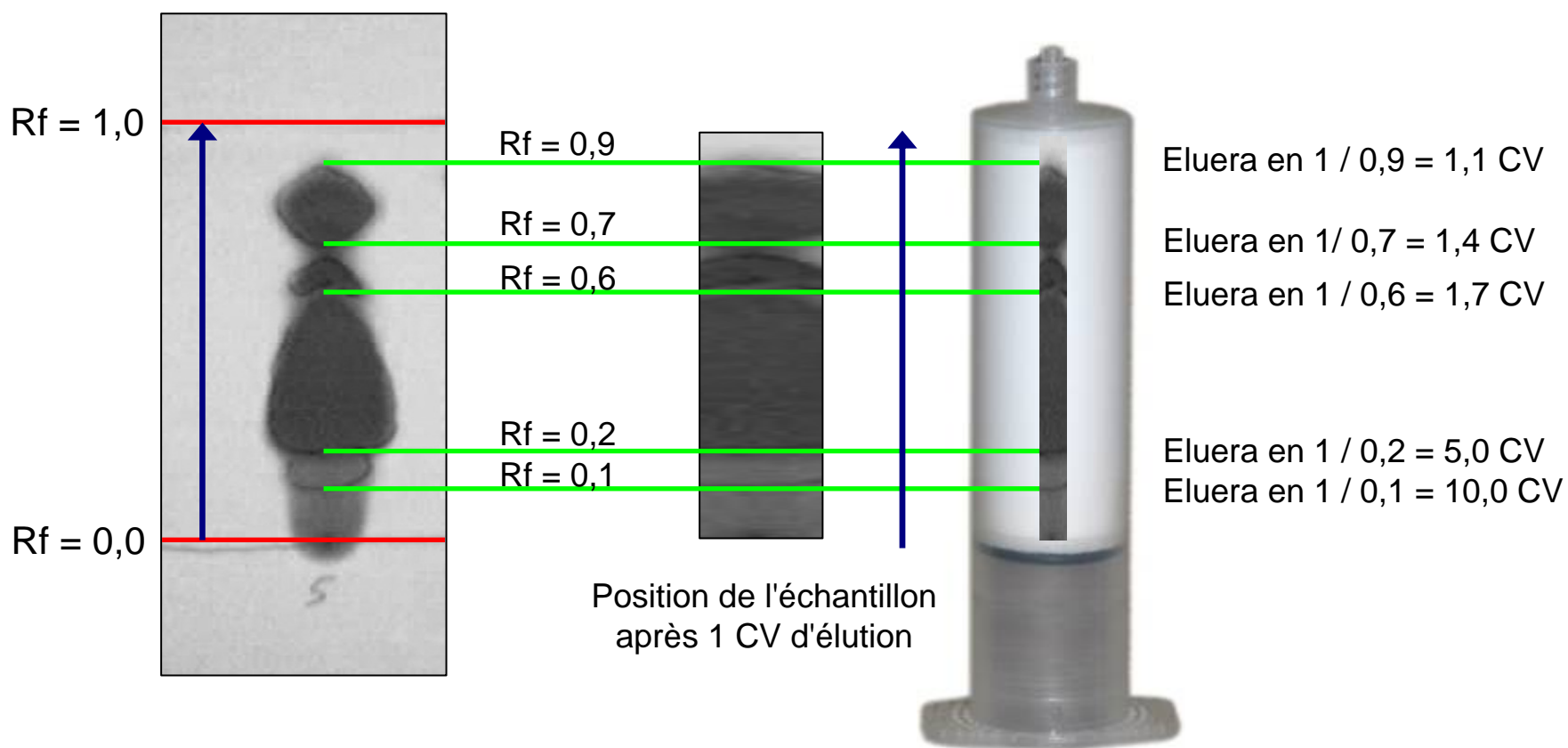
d'après
© Camag

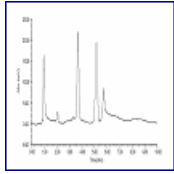


Transposition de la CCM à la CPL

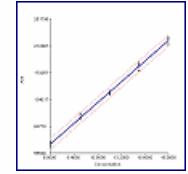


- Même si la géométrie diffère, la CPL utilise les mêmes principes de séparation qu'en CCM :

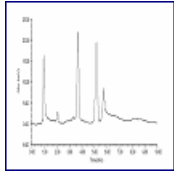




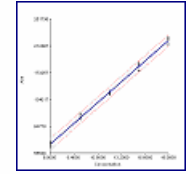
Transposition de la CCM à la CPL



- **Des essais de charge peuvent donc être réalisés en CCM, avant injection en CPL, car le comportement de l'échantillon sera similaire :**
 - Même silice
 - Mêmes solvants
 - Même solubilité / capacité vis-à-vis des solvants et de la silice
- **Principales différences entre la CCM et la CPL :**
 - L'échantillon en CCM est TOUJOURS du dépôt solide (le solvant de dépôt est évaporé avant migration) !!!
 - Une évaporation des solvants volatiles a lieu en CCM, et pas en CPL.
 - Les plaques CCM ont généralement une teneur en eau différente de celle des colonnes CPL.



Transposition de la CCM à la CPL

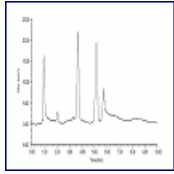


- Transposition :

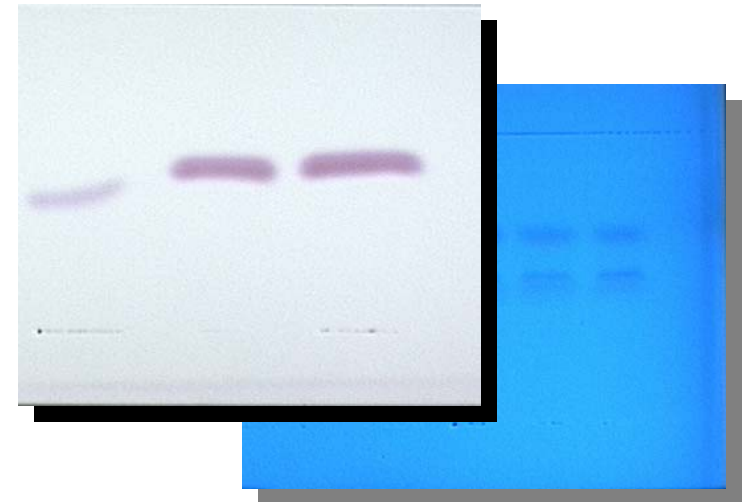
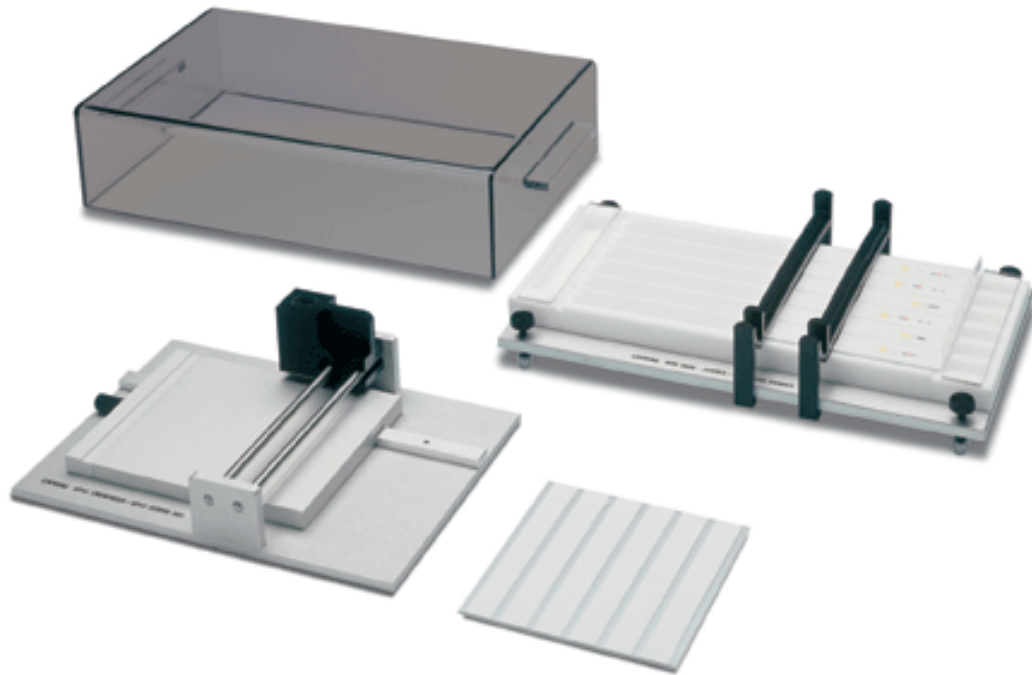
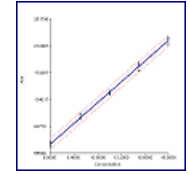
$$R_f = \frac{z_{sol}}{z_{front}} = \frac{u_{sol}}{u} = \frac{1}{1+k} \quad k = \frac{1-R_f}{R_f} \quad \text{avec} \quad k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

- En pratique :

$$dR_f = \frac{1}{1+k} \quad k = \frac{1-dR_f}{dR_f} \quad \text{avec } d = 1.3 - 1.5$$

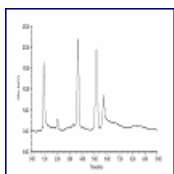


Transposition de la CCM à la CPL

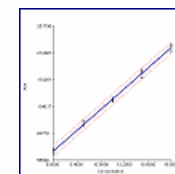


CAMAG – cuve Vario

Test en parallèle de 6 solvants
ou mélanges de solvants



Transposition, approche 1



(screening de solvants J.Dingenen, Janssen Pharmaceutica)

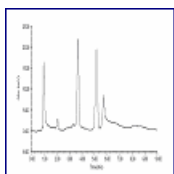
1) 2 séries de solvants purs couvrant un grand domaine de polarité et de sélectivité

Série 1 MTBE Toluene CH₂Cl₂ CH₃CN EtAc THF

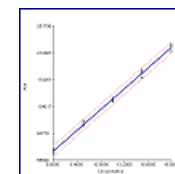
Série 2 MeOH EtOH IPA Acetic acid 2-propanone 2-butanone

2) Série de tests basée sur un mélange dichlorométhane – méthanol

| | | | | | | |
|---------|--|---------|---------|----------|----------|----------|
| Série 3 | N-Hexane 50% CH ₂ Cl ₂ 50 % | MeOH 2% | MeOH 5% | MeOH 10% | MeOH 20% | MeOH 50% |
| Ligne | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |



Transposition, approche 1



(screening de solvants J.Dingenen, Janssen Pharmaceutica)

1)

Bonne sélectivité pour un des solvants purs ou pour un des mélanges dichlorométhane - méthanol



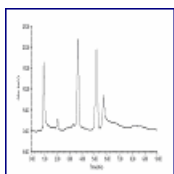
Début des tests sur colonne

2) Bonne sélectivité pour un des solvants purs mais valeurs de R_f trop fortes

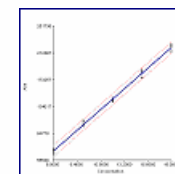
Ajout d'un solvant apolaire pour ajuster les valeurs de R_f entre 0.1 et 0.35 (correspondant à des valeurs de k comprises entre 1.85 et 9)

3) Résultats non satisfaisants

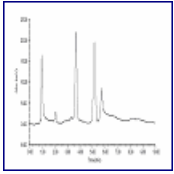
Sur la base de la forme observée des spots lors des expériences avec les solvants purs, les combinaisons les plus appropriées de solvants (binaire - ternaire) sont choisies pour plus d'investigation



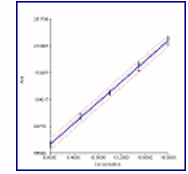
Transposition, approche 2



- Déterminer la phase mobile de CCM permettant d'obtenir des valeurs de R_f comprises entre 0.15 et 0.35 et des différences de R_f (ΔR_f) d'au moins 0.15 entre deux composés.
- Déterminer le volume mort de la colonne. Celui-ci représente le volume de solvant nécessaire pour remplir tous les espaces intra et interparticulaires dans une colonne donnée, il est déterminé par l'injection d'un composé non retenu.
- La rétention d'un soluté sur la colonne est mesurée en volume de colonne (CV, qui représente le nombre de volumes de colonne nécessaire pour éluer le composé)



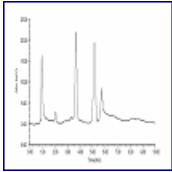
Transposition, approche 2



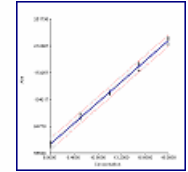
- Le système de chromatographie flash « idéal » est celui qui permet d'éluer le composé d'intérêt dans des valeurs de CV comprises entre 3 et 6 et qui sépare ce composé des autres solutés proches avec une différence de CV (ΔCV) plus grande que 1.
- La relation entre le CV et le Rf est donnée par :

$$CV = 1 / Rf$$

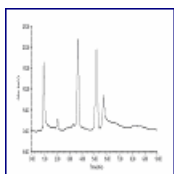
$$\Delta CV = 1 / Rf_1 - 1 / Rf_2$$



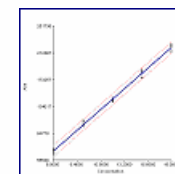
Transposition, approche 2



- Du fait des différences entre les conditions de la CCM et celles de la chromatographie flash (variations de vitesse de la phase mobile, liants, humidité relative...), les conditions optimales en CCM ne seront pas nécessairement directement transposables en chromatographie flash.
- Quelques précautions sont à prendre lors du transfert de la CCM vers la chromatographie flash.



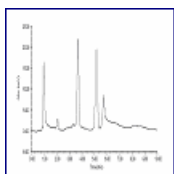
Transposition, approche 2



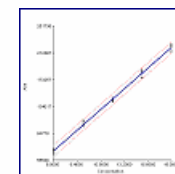
1. Utiliser des chimies de phases stationnaires identiques (même fabricant).
2. Optimiser les mélanges de solvants pour la CCM pour obtenir des valeurs de Rf comprises entre 0.15 et 0.35 avec des valeurs de ΔRf supérieures à 0.20.
3. Ne pas oublier que moins les composés sont retenus en CCM, plus les différences de CV et la capacité de charge seront faibles en chromatographie flash.

| Rf A | Rf B | ΔRf | ΔCV |
|------|------|-------------|-------------|
| 0.51 | 0.39 | 0.12 | 0.60 |
| 0.32 | 0.21 | 0.11 | 1.60 |
| 0.22 | 0.14 | 0.08 | 2.60 |

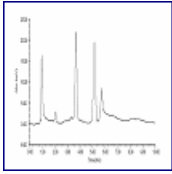
4. Ajuster la sélectivité de la phase mobile en chromatographie flash et utiliser un solvant de dépôt de force éluante plus faible que la phase mobile.



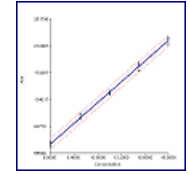
Transposition, approche 3



- Contrôler les paramètres de la CCM :
 - Phase mobile mesurée en volume/volume pour être consistant avec un éventuel mélangeur automatique en chromatographie flash.
 - Équilibrer la cuve et la plaque CCM avant séparation (cuve double bac).
 - Faire migrer le front du solvant jusqu'à 1 - 4 cm du bord de la plaque.
 - Ne pas oublier de marquer le dépôt et le front de solvant.
- Recommandations :
 - Utiliser le même type de phase stationnaire (CCM et flash)
 - Utiliser le même solvant pour la phase mobile (CCM et flash)



Transposition, approche 3



- Si le Rf du composé est compris entre 0.1 et 0.5, on peut utiliser les formules suivantes pour déterminer le nombre de volumes de colonne (CV) correspondants aux fractions de début et de fin de collecte :

$$\text{Premier tube} = (Rf^{-1} \cdot 2 \cdot Vc) / Vf$$

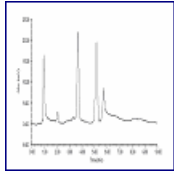
$$\text{Dernier tube} = (Rf^{-1} \cdot 3 \cdot Vc) / Vf$$

Avec :

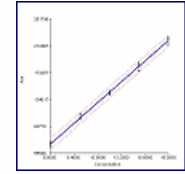
Vc : volume mort de la colonne (volume pour $CV = 1$)

Vf : volume collecté dans chaque tube

C.F. Poole, S.K. Poole, « Chromatography today », Elsevier Science Publishers B.V., 649-667, (1991)



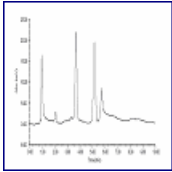
Transposition, approche 4



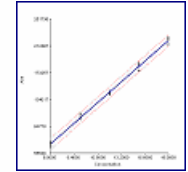
- Approche expérimentale basée sur la distance parcourue par le soluté en CCM
 - Si $R_f = 0.25$ cela signifie que le composé a parcouru $\frac{1}{4}$ de la longueur parcourue par le solvant sur la plaque (depuis le dépôt).
 - Sur une cartouche de même longueur que la plaque on ferait donc parcourir $\frac{1}{4}$ de la longueur du lit de phase stationnaire dans les mêmes conditions lorsque l'on aura élué un volume de $L \cdot \pi \cdot r^2$, soit un volume d'élution en sortie de colonne de $4 \cdot L \cdot \pi \cdot r^2$.
 - Ainsi, en tenant compte des différences CCM / Flash :

$$V_e = V_c / d \cdot R_f$$

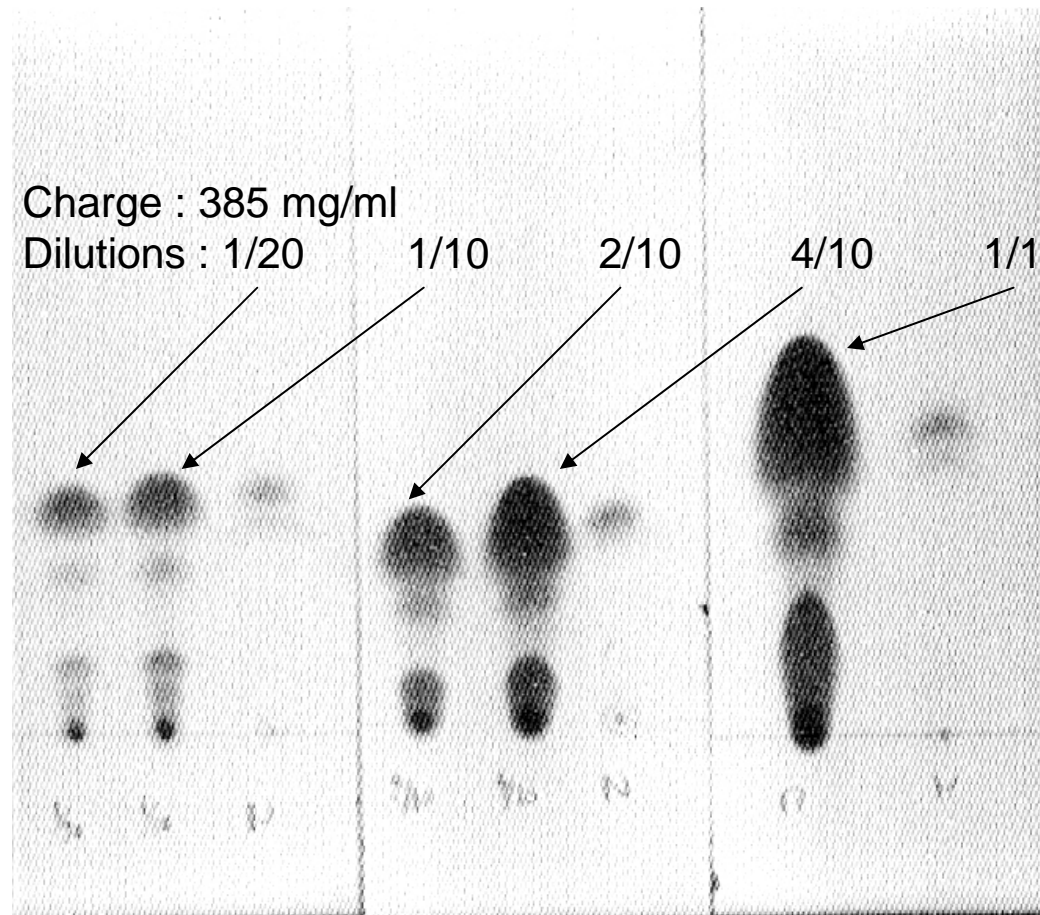
Avec V_e le volume d'élution, et V_c le volume de phase stationnaire dans la cartouche, et d le coefficient de correction ($d = 1,3$ à $1,5$).

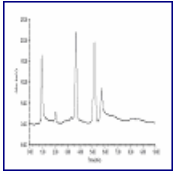


Transposition, effets de charge

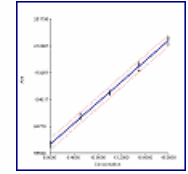


- L'étape de CCM ne doit pas seulement servir à déterminer les Rf idéaux, elle permet aussi de travailler sur la charge possible



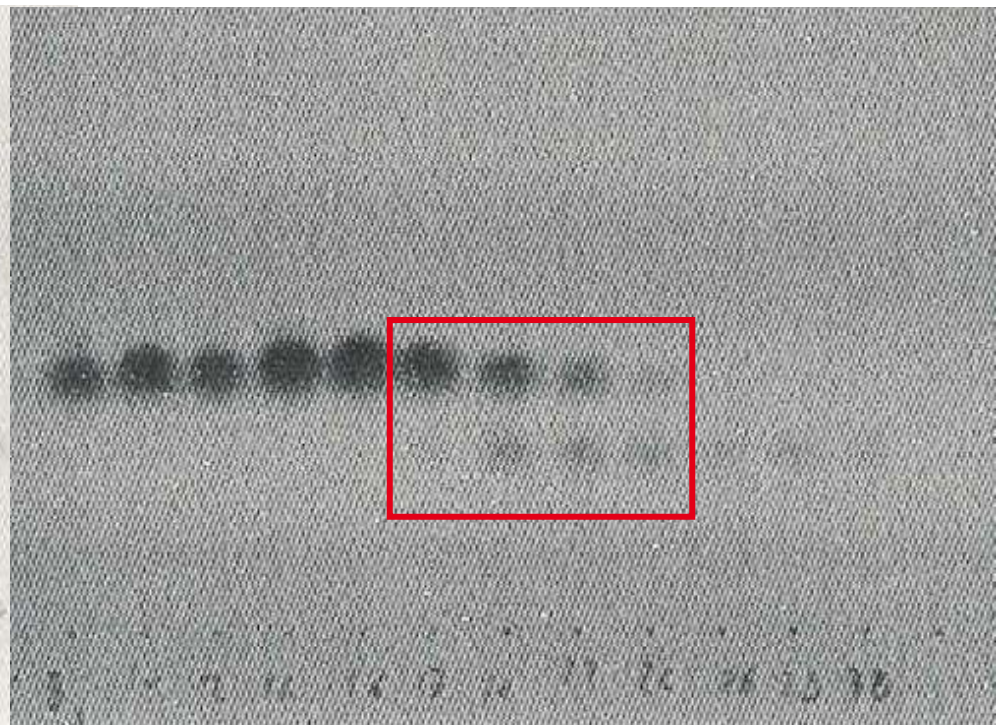
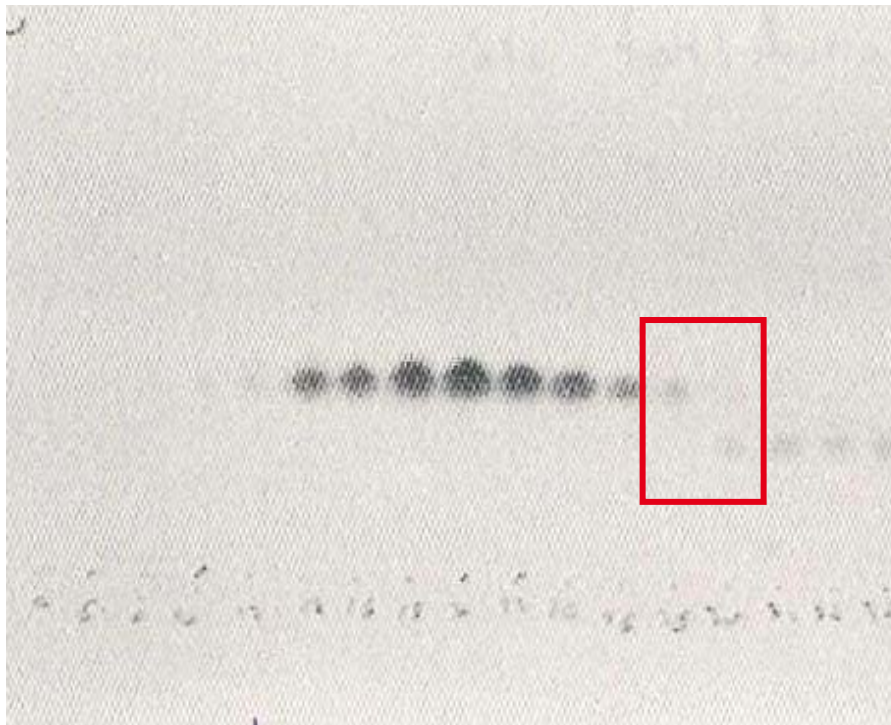


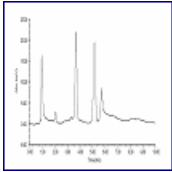
Transposition, effets de charge



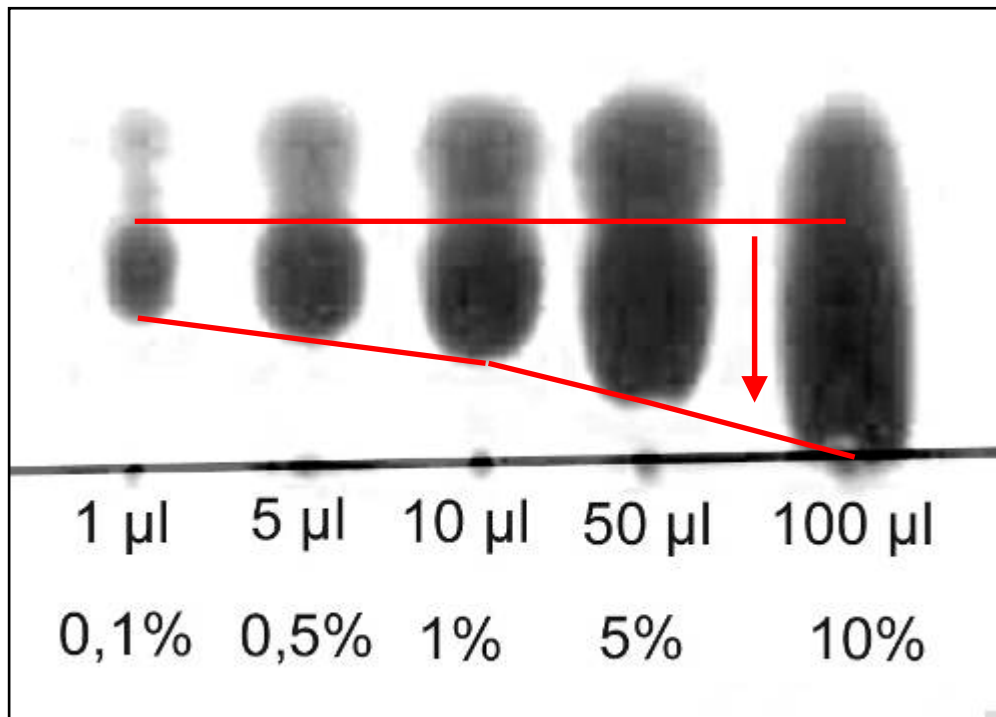
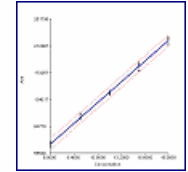
Charge 385 mg/ml
2 ml déposés

Charge 385 mg/ml
3 ml déposés

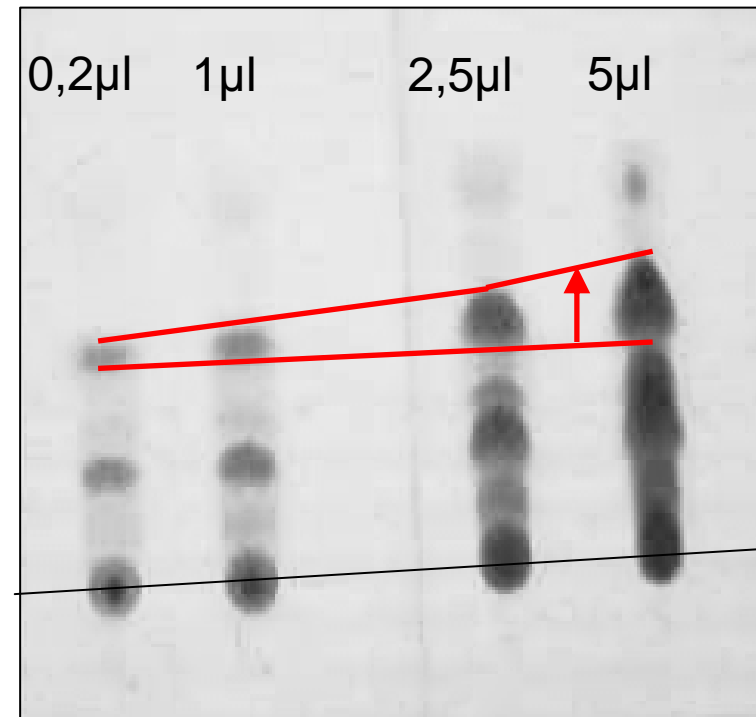




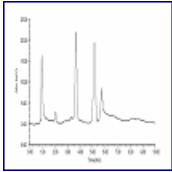
Transposition, effets de charge



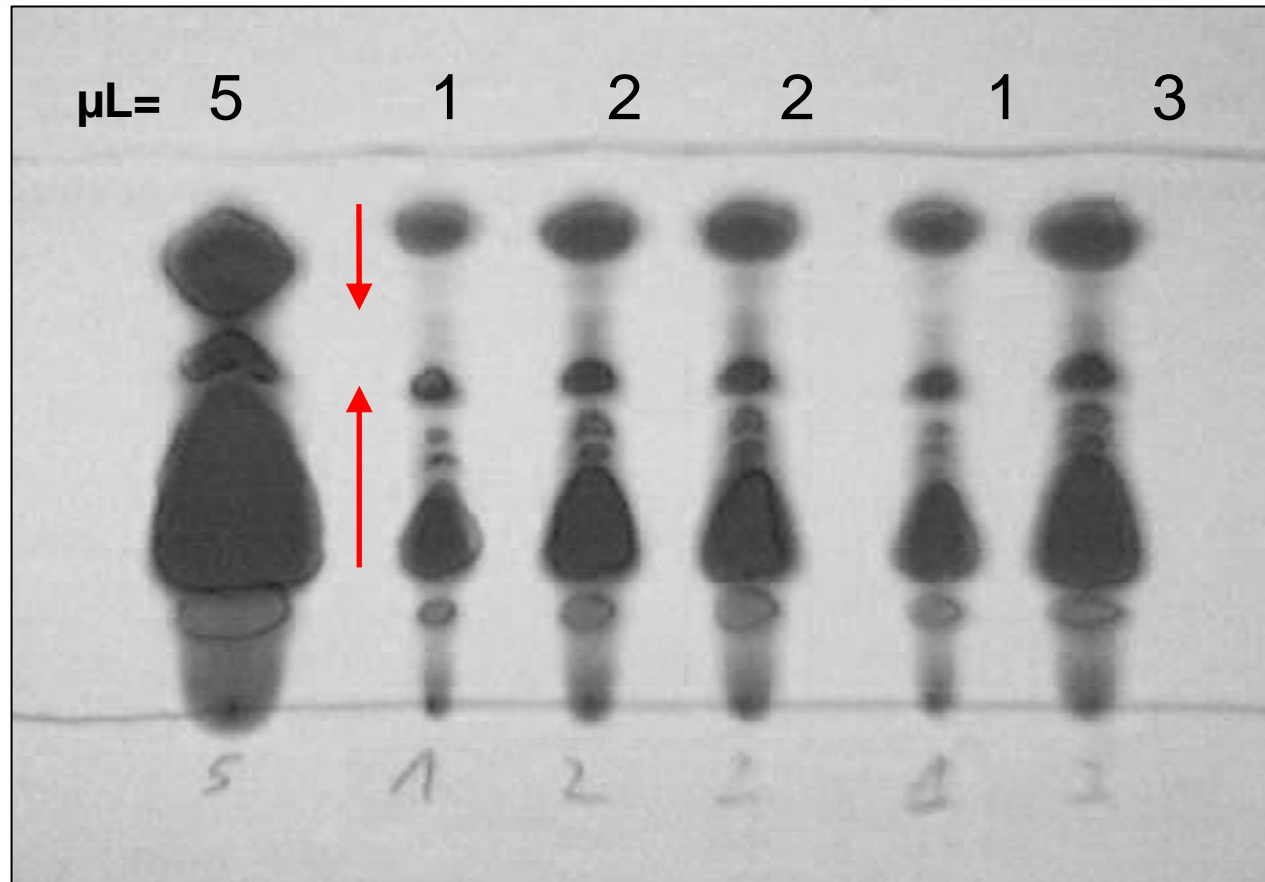
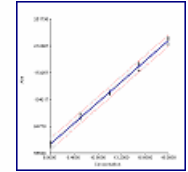
Saturation du solvant avant la silice



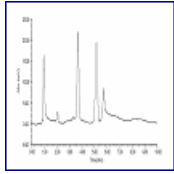
Saturation de la silice avant le solvant



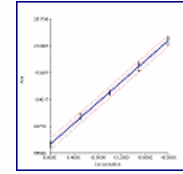
Transposition, effets de charge



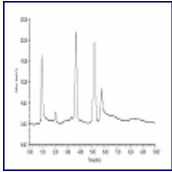
Cas mixte : le solvant et la silice saturent



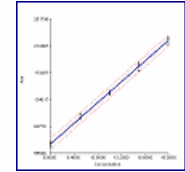
Transposition, effets de charge



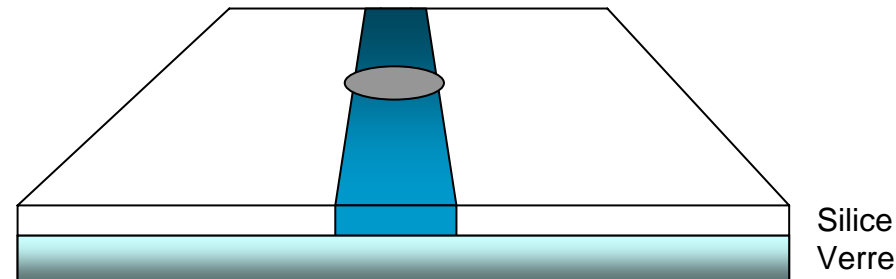
- L'étape de CCM ne doit pas seulement servir à déterminer les R_f idéaux, elle permet aussi de travailler sur la charge possible, pour cela :
 - Faire des essais de charge en CCM :
 - Noter la dilution de la solution déposée pour la charge idéale,
 - Noter le volume déposé pour la charge idéale
 - Déterminer le rapport entre le volume déposé et le volume de phase stationnaire utilisé sur la plaque pour la séparation
 - En déduire le rapport entre le volume déposé sur la colonne et le poids de silice qu'elle contient.



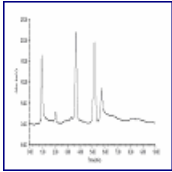
Transposition, effets de charge



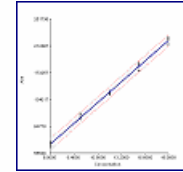
- **Principe du calcul pour la transposition:**
 - Le volume de silice parcouru par l'échantillon est calculé.



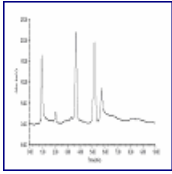
- Connaissant le volume d'échantillon déposé sur la plaque CCM (capillaire calibré), il est aisé de déterminer le taux de charge (μl par g de silice).



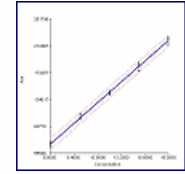
Transposition, effets de charge



- Exemple :
 - Dépôt de 2 μ l sur plaque de CCM (épaisseur du lit de silice 0.25 mm)
 - Largeur maximale des spots après migration : 5 mm
 - Distance de migration du front du solvant : 70 mm
 - On a utilisé un volume de $0.025 \times 0.5 \times 7 = 0.0875 \text{ cm}^3$ de lit de silice, le volume déposé représente $100 \times 0.002 / 0.0875 = 2.3 \%$ du volume de phase stationnaire utilisée (2.3 % v/v)
 - Compte tenu du fait que le poids de phase stationnaire contenue dans une colonne est environ 2 fois plus faible que le volume qu'elle occupe, la charge possible, en ml, représente alors 4.6 % en valeur (environ 5 %) du poids de silice présente dans la colonne :
 - Dans notre exemple, le volume déposé sur la colonne = 1.5 ml pour une colonne de 30 g de phase stationnaire (pour un dépôt idéal de 2 μ l en CCM)



Transposition, effets de charge

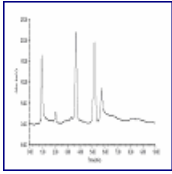


- Le volume d'échantillon à injecter sur la colonne CPL, afin d'obtenir la même charge qu'en CCM, peut être estimé à :

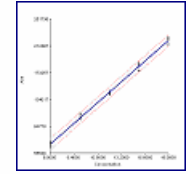
1 μ L en CCM \rightarrow 1 ml par 100g de silice en CPL

- Pour des colonnes de hauteur de lit de silice similaire aux plaques CCM (10-15 cm), le profil de séparation sera équivalent.

NB : Dans la pratique, on peut généralement doubler la charge ainsi calculée, en raison de la performance des colonnes en CPL.



Transposition, effets de charge

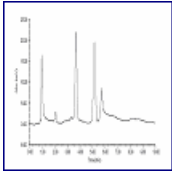


- **Application pratique :**

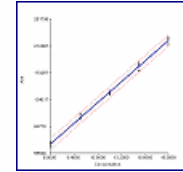
- Déterminer le mélange de solvant permettant d'obtenir en CCM :
 - Une bonne séparation (sélectivité).
 - Un R_f pour le produit cible de 0,20 environ.

NB : Il est possible d'exploiter une plaque CCM où le produit aurait migré à 0,40 par exemple, mais il faut garder en tête que le changement de composition du solvant, nécessaire pour réussir la CPL, peut éventuellement modifier la sélectivité de la séparation...

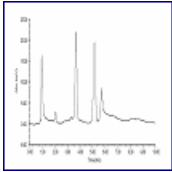
L'obtention en CCM d'un R_f de 0,20 permet ainsi de visualiser la séparation dans les conditions directement adaptées à la CPL.



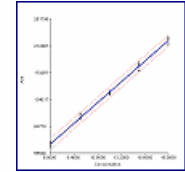
Transposition, effets de charge



- Solubiliser l'échantillon dans le mélange choisi en CCM, en essayant :
 1. De n'utiliser que le solvant le moins éluant pur :
Environ 3 ml / g de produit pur
 2. D'utiliser la même composition de solvants qu'en CCM (ou au maximum 10-15% de solvant le plus éluant en plus) :
Environ 3 ml de mélange / g de produit pur
 3. Si le produit n'est pas soluble dans les conditions 1 et 2 :
 - Utiliser le solvant le plus éluant pur
 - Ou utiliser un autre solvant permettant de solubiliser le produit
Environ 3 ml / g de produit pur



Transposition, effets de charge



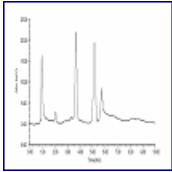
- Déposer alors sur la plaque CCM 5 spots :

1 μL - 3 μL - 5 μL - 10 μL - 50 μL

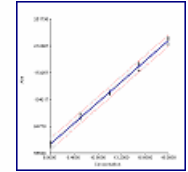
Ces volumes permettent de couvrir les charges habituellement supportées par la silice :

1 à 10 % , soit 1 à 10g de produit pour 100g de silice

- Faire migrer la plaque avec le solvant choisi.



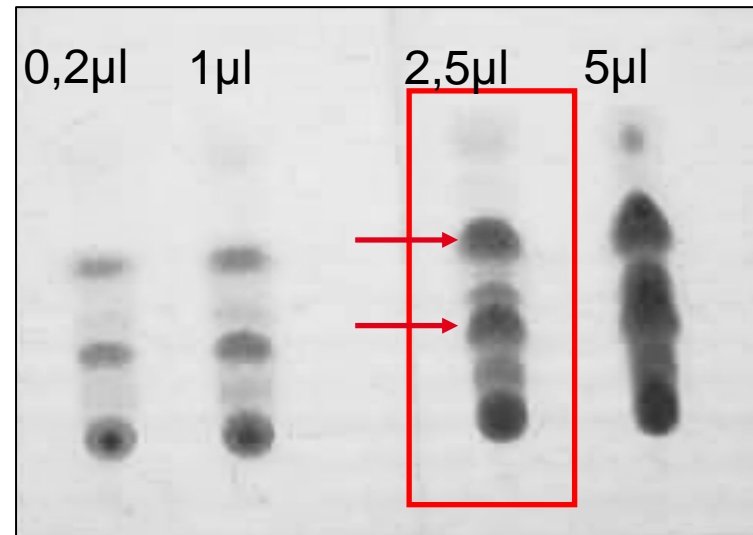
Transposition, effets de charge



- Choisir sur la plaque la charge maximale permettant d'obtenir visuellement la séparation souhaitée :
- Appliquer la formule de transposition :

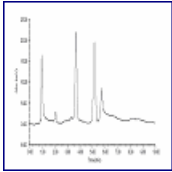
1 μ L en CCM

→ 1 ml par 100g de silice en CPL

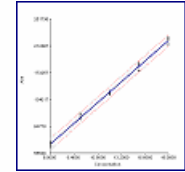


- Si l'étude de charge ne peut être réalisée (petites quantités ne justifiant pas cette démarche), prendre comme valeur :

2,5% soit 2,5 g de produit brut par 100g de silice.



Transposition CCM / CPL

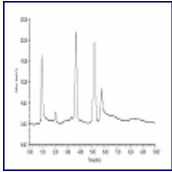


- **Pour assurer un bon potentiel de séparation, le volume à injecter sur une colonne CPL doit être :**

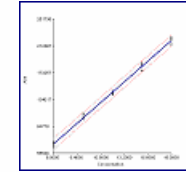
Volume injecté < 10% du poids de silice

Exemple : Cartouche de 30g → < 3 ml
 Cartouche de 90g → < 9 ml

- Cas particulier : si le produit est solubilisé dans un solvant ne le faisant pas migrer du tout, le volume n'est pas limité, car l'échantillon se concentrera en entrée de colonne.



Transposition CCM / CPL

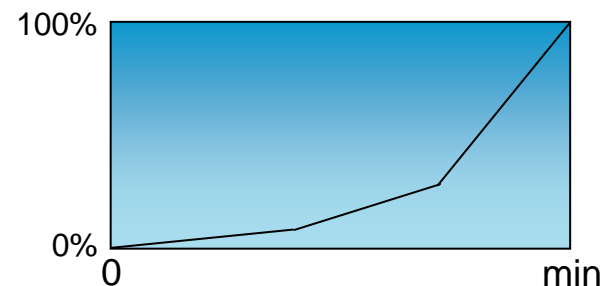


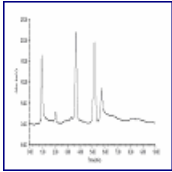
- **Produit ayant été solubilisé dans le diluant (1g de produit + 3 ml de solvant) :**
 - L'étude de charge en CCM est réalisée avec cet échantillon.
 - Injecter en tête de la colonne conditionnée le volume d'échantillon calculé grâce à la formule de transposition.

Ex : 2,5 μ l en CCM \rightarrow 2,5 ml d'échantillon par cartouche de 100g

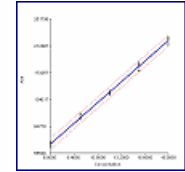
Connaissant le volume d'échantillon à purifier, on peut calculer la taille de la colonne nécessaire pour faire une seule injection.

- La purification peut être réalisée en isocratique, ou en gradient.

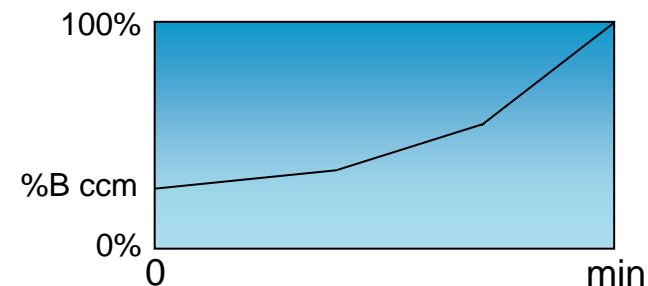


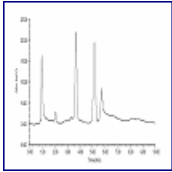


Transposition CCM / CPL

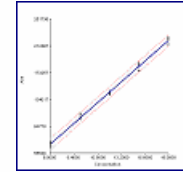


- **Produit ayant été solubilisé dans le mélange de solvants (1g de produit + 3 ml de mélange de solvants) :**
 - L'étude de charge en CCM est réalisée avec cet échantillon.
 - Injecter en tête de la cartouche conditionnée le volume d'échantillon calculé grâce à la formule de transposition.
 - Attention : Du fait que l'échantillon contient une quantité non-négligeable de modifiant, on ne pourra pas débiter le gradient à 0% de solvant éluant.
Il faudra commencer le gradient à la valeur utilisée en CCM.



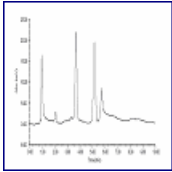


Transposition CCM / CPL

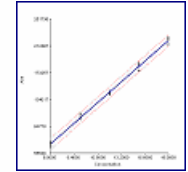


- **Produit ayant été solubilisé dans un solvant "fort" (1g de produit + 3 ml de solvant) :**
 - L'étude de charge en CCM est réalisée avec cet échantillon.
 - Déterminer le volume d'échantillon injectable par 100g de silice, et donc la taille de colonne à utiliser.
 - Comme on ne peut pas injecter directement cet échantillon, (force éluante trop élevée), préparer un dépôt solide avec :
 - Le volume de solution échantillon à purifier
 - 0,5 g de silice / ml de solution échantillon (ou 1,5 g de silice / g de produit pur)
 - 7 ml de solvant "fort" / ml de solution échantillon (ou 3 ml de solvant "fort" / g de produit pur)
 - Utiliser une pré-colonne pour le dépôt solide (si possible de diamètre inférieur au diamètre de la colonne principale)
 - L'élution peut être réalisée en isocratique ou gradient (0-100%).

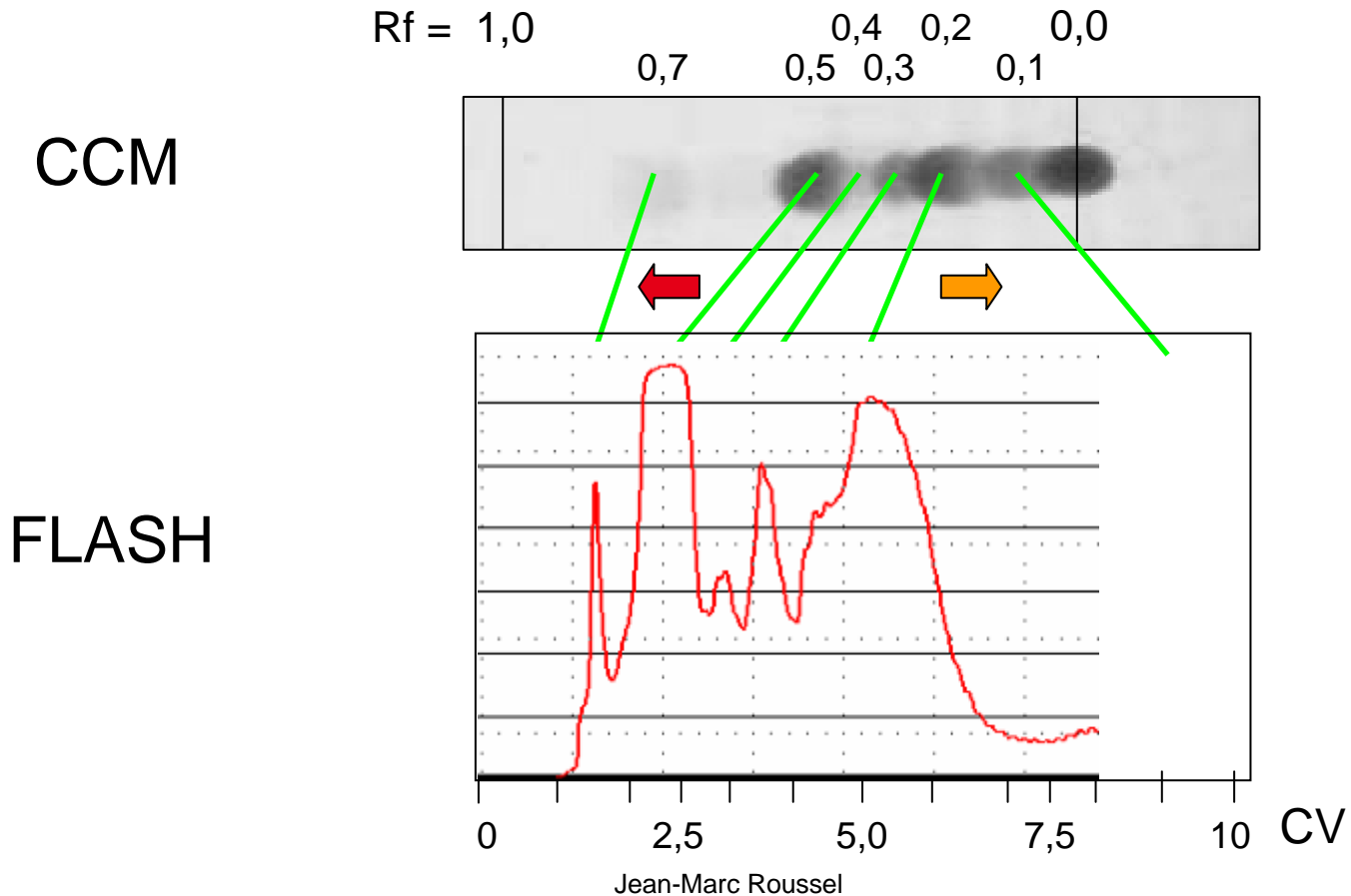


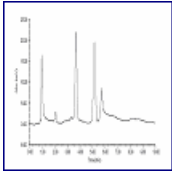


Elution isocratique ou gradient

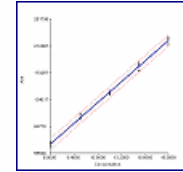


Comparaison du profil d'élution CCM / Flash en isocratique :





Elution gradient

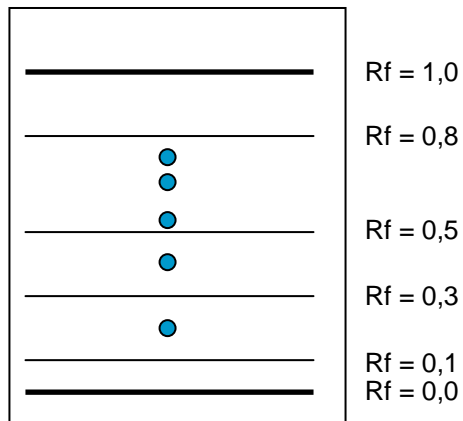


- Le gradient suivant permet de couvrir les cas "habituels", en assurant la séparation en moins de 40 minutes à débit nominal :

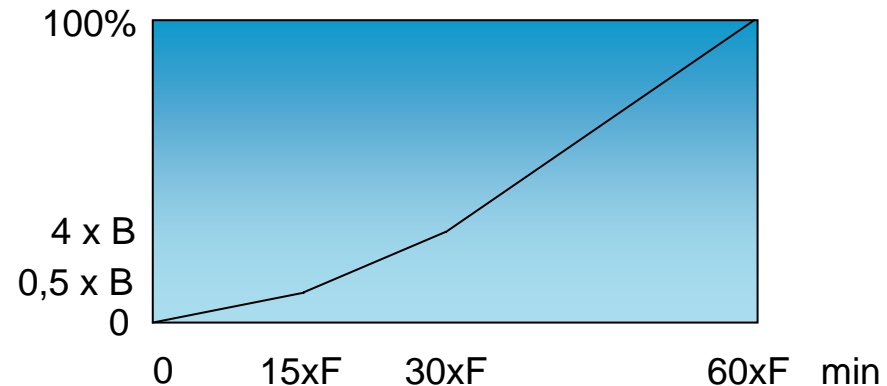
**Gradient à appliquer en Flash
% solvant polaire**

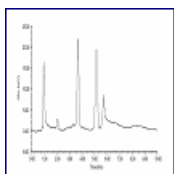
F = Poids silice / Débit travail
(g) (ml/min)

**Plaque CCM réalisée avec
B % de solvant polaire**

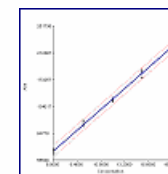


| Temps (min) | 0 | 15xF | 30xF | 60xF |
|-------------|----------|--------------|--------------|-------------|
| %B | 0 | 0,5xB | 4,0xB | 100% |



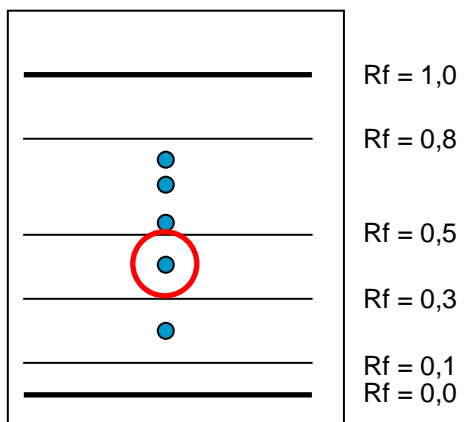


Elution isocratique



- Les conditions isocratiques suivantes permettent d'optimiser la purification d'un composé identifié :

**Plaque CCM réalisée avec
B % de solvant polaire**



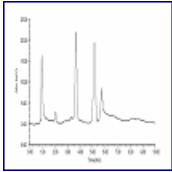
Rf du composé visé = Rf ccm

**Conditions isocratiques à appliquer en Flash
% solvant polaire**

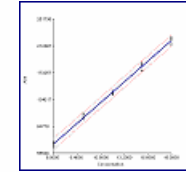
%B flash = %B ccm / (8 x Rf ccm)
**→ Le produit est élué en environ
8 volumes de colonne**

Pour des cartouches de longueur > 200 mm, utiliser :

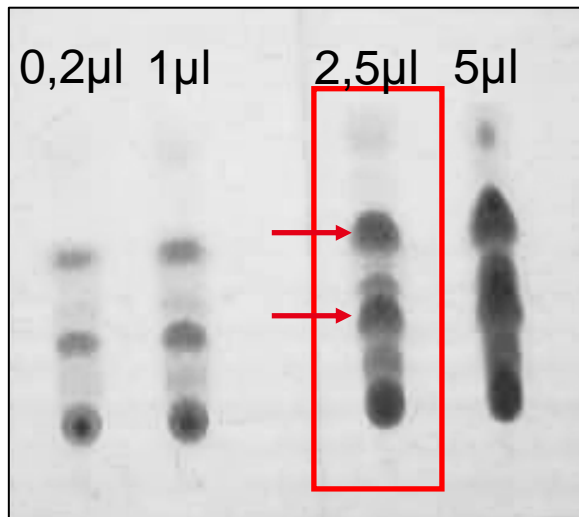
%B flash = %B ccm / (6 x Rf ccm)
**→ Le produit est élué en environ
6 volumes de colonne**



Exemple de purification



- Exemple de purification réalisé avec une cartouche SuperVarioPrep® 90g Si60 15-40 μm :

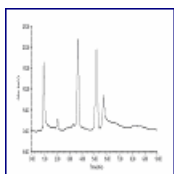


Au vu de la plaque CCM de surcharge, il a été décidé d'injecter en Chromatographie Flash une quantité correspondant aux 2,5 μl .

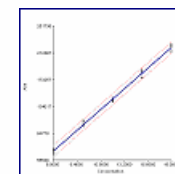
Calcul de transposition :

$$1 \mu\text{l CCM} \Leftrightarrow 1\text{ml par } 100\text{g de silice Flash}$$

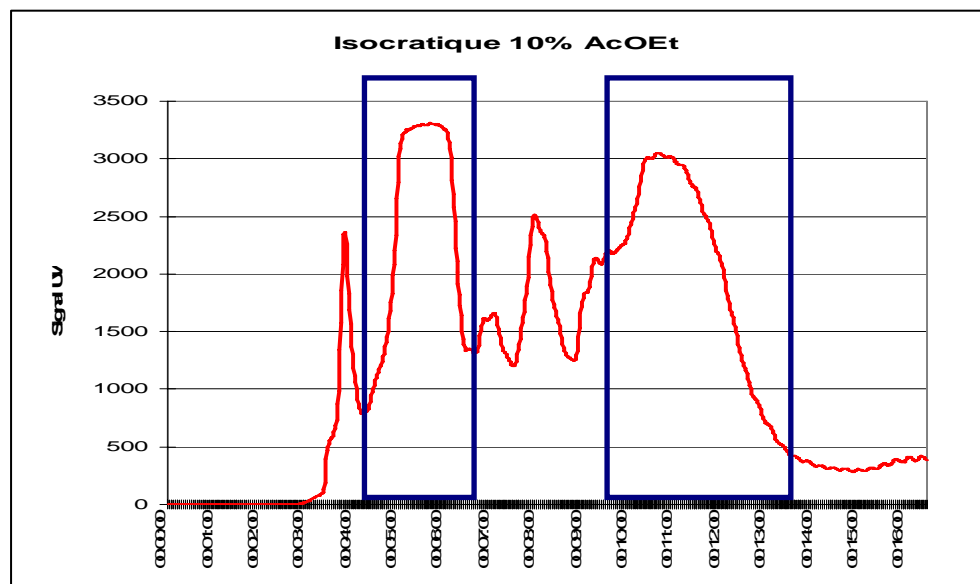
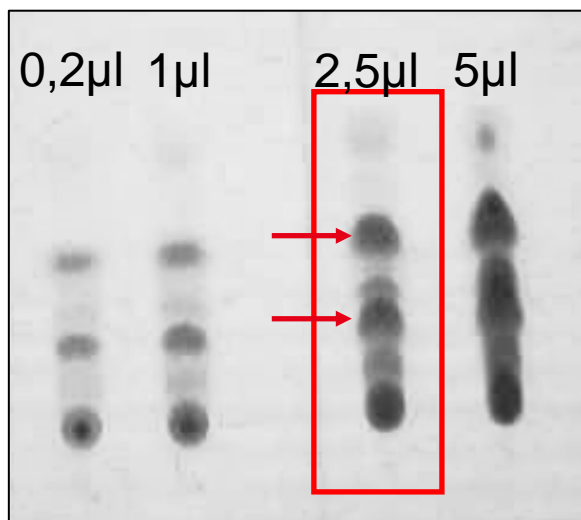
→ On peut injecter 2,25 ml de la solution sur une cartouche de 90g.



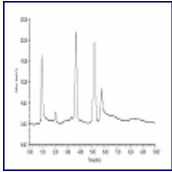
Exemple de purification



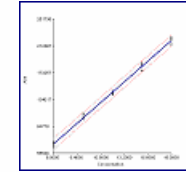
- Exemple de purification réalisée avec une cartouche SuperVarioPrep® 90g Si60 15-40 μm :



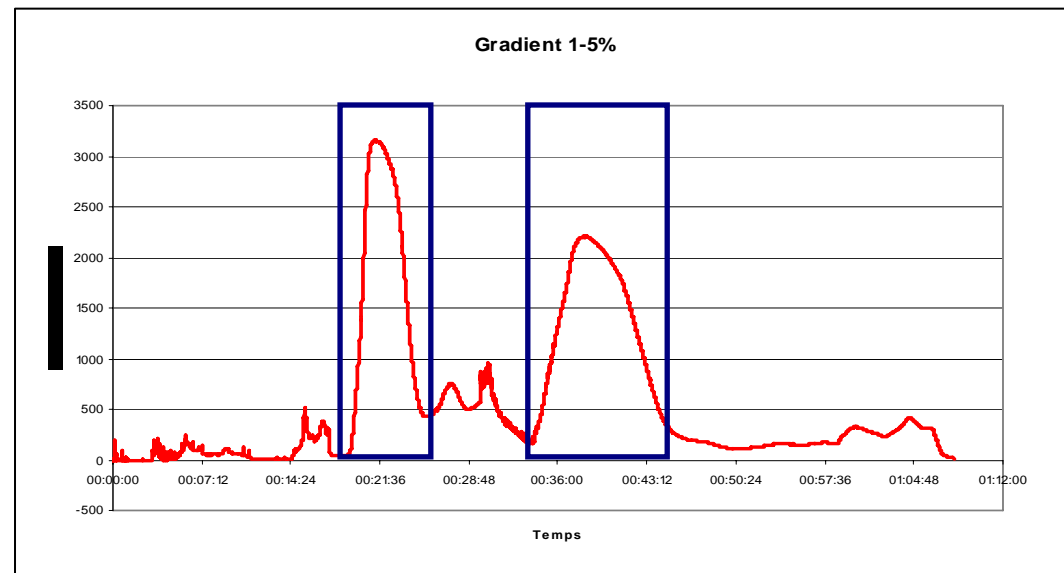
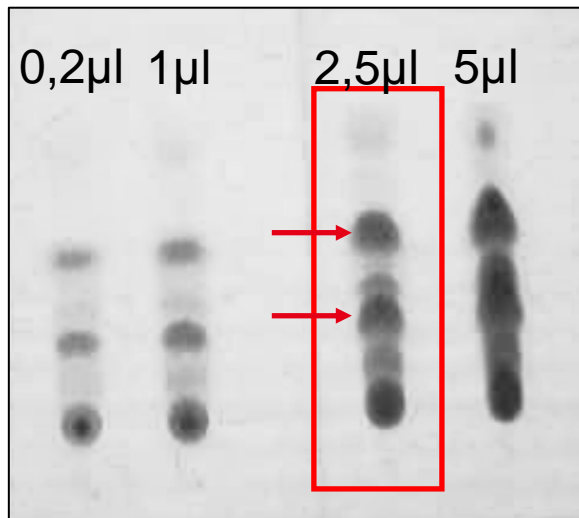
Dans les mêmes conditions qu'en CCM, on retrouve le même profil de purification. Durée du purification = 15 minutes (0,85 g d'échantillon injecté)



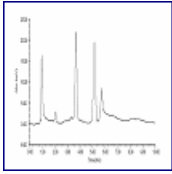
Exemple de purification



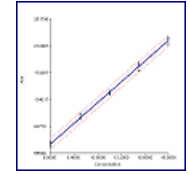
- Exemple de purification réalisée avec une cartouche SuperVarioPrep® 90g Si60 15-40 μm :



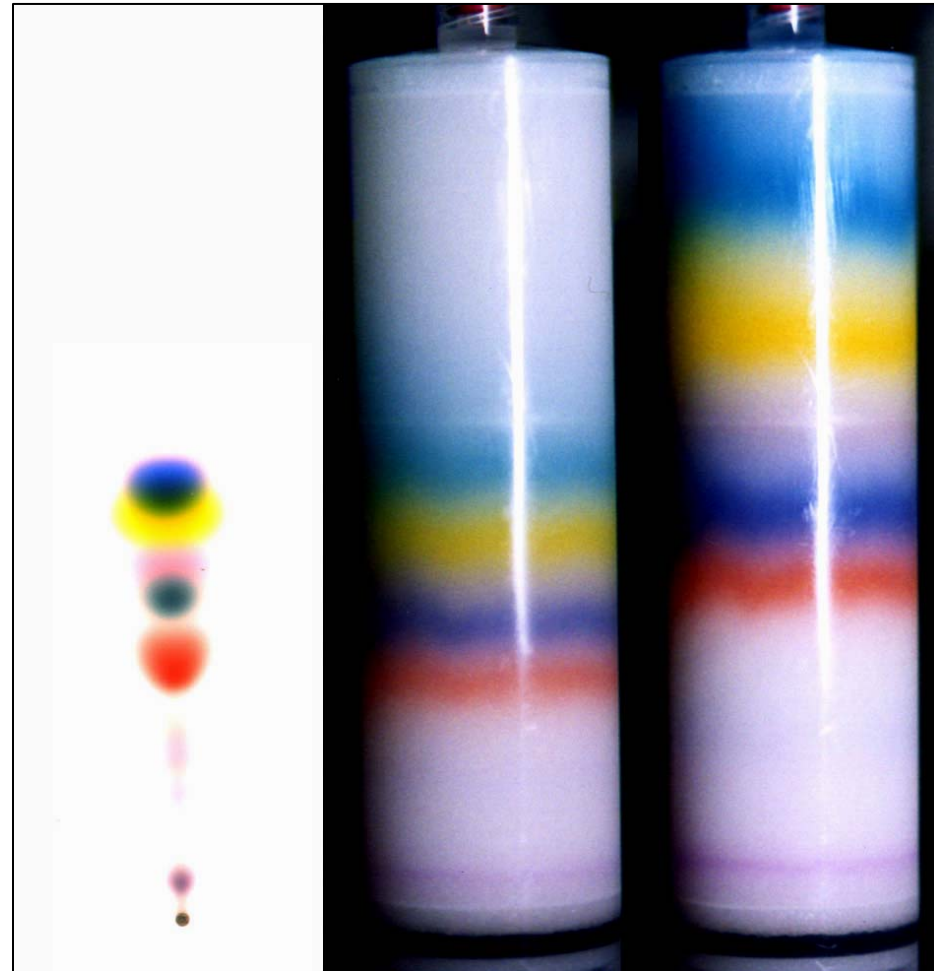
En réalisant un gradient d'AcOEt, la purification est nettement améliorée.
Durée du purification = 50 minutes (0,85 g d'échantillon injecté)

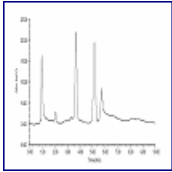


Transposition, exemple 1

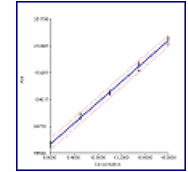


- Dans l'idéal, la transposition de la CCM vers la chromatographie flash doit produire ce type de résultats





Transposition, exemple 2



- Malheureusement, les différences de perméabilité de la phase stationnaire, d'humidité relative ou un mauvais choix de modifiant organique (solvant le plus éluant) peuvent entraîner ce type de résultats

