

## La CHROMATOGRAPHIE sur COUCHE MINCE (généralités)

Marcel Lecomte

Après nombre d'échanges avec Alain Gérard, biochimiste de mes amis, et lecture approfondie d'articles publiés par Mme Madeleine Gabriel (bulletins de la SMF, 1959 et années suivantes), nous avons été fortement surpris de constater qu'il n'est guère fait mention (voire pas du tout, à notre connaissance) de cette technique différentielle dans la mycologie moderne.

Première question : **de quoi s'agit-il exactement ? Quel en est le principe ?**

Une rapide recherche sur internet nous fournit la réponse suivante :

*La chromatographie est **une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants** ; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, **l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile**. La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue **d'une analyse** d'un mélange.*

*La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée **éluant**, est un solvant ou un mélange de solvants. On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile.*

*La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est **le phénomène d'élution**, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser.*

*Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle **rapport frontal ou rétention frontale (Rf)**.*

*Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du Rf avec un témoin (une même substance migre toujours à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques).*

Si la théorie n'était pas trop difficile à comprendre (dans ses grandes lignes), il s'agissait ensuite de passer à la phase pratique.

Pour cela, nous avons choisi de nous intéresser d'abord à des produits que nous connaissons tous, car ils font partie de notre vie alimentaire : les colorants de la série E.

En consultant des sites de vente de matériel expérimental pour les classes du secondaire, nous nous sommes procuré sans problèmes les kits de matériel nécessaires.

Les colorants utilisés seront le E102 (tartrazine, de couleur jaune), le E122 (azorubine, de couleur rouge), le E131 (bleu patenté V, de couleur bleue).

La phase stationnaire sera une simple solution aqueuse à 1 % (eau distillée).

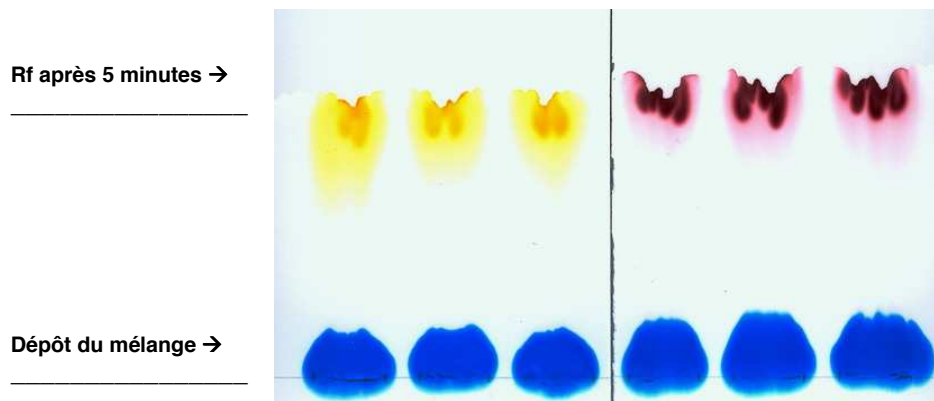
L'éluant destiné à la phase mobile sera une solution aqueuse de NaCl (chlorure de sodium) à 3 % (nous aurions pu utiliser une solution aqueuse de citrate de Na à 5 %, ou un mélange 50/50 d'éthanol pur et d'eau salée à 3 %).

Nous avons choisi de travailler sur des plaques de silicagel sur support PVC semi-rigide, plutôt que sur des feuilles de papier à dessiner, afin de privilégier la précision.

Dépôt sur la première plaque (gauche) d'un mélange de E131 et E102 (dépôt vert émeraude).

Dépôt sur la seconde plaque (droite) d'un mélange de E131 et E122 (dépôt bleu foncé).

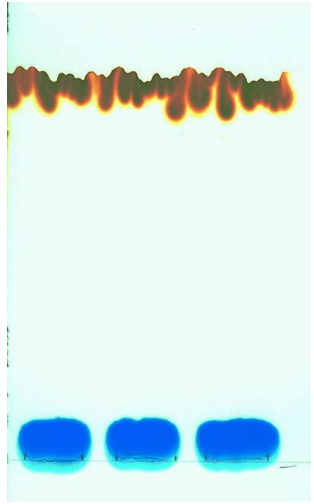
Voici le résultat obtenu :



On constate que les 2 composants du mélange ont migré différemment avec un Rf bien précis, très voisin pour E102 et E122 (mais un peu plus élevé pour ce dernier). E131 possède un Rf peu élevé.

Renouvelons l'expérience en mélangeant les trois colorants !

Voici le chromatogramme obtenu après 10 minutes de migration. Nous avons doublé le temps de migration, car après 5 minutes, le rouge et le jaune étaient quasi superposés ; cela n'y a rien changé.



Nous arrivons à la même conclusion que lors de l'expérimentation précédente :

- Rf de E131 peu élevé
- Rf de E102 et E122 très semblables (mais un peu plus élevé pour ce dernier : le jaune transparaît à l'arrière du rouge)

Cette notion de Rf peut être transformée en données numériques et représente une constante, mais cela dépasse le cadre de ce travail d'initiation.

En matière de colorants alimentaires de masse (voir liste ci-dessous), le champ d'investigation est énorme et peut faire l'objet d'expérimentations très intéressantes. Il suffit de réaliser une CCM pour chaque colorant utilisé (en principe, tous solubles dans l'eau), afin de réaliser son chromatogramme et déterminer son Rf. Ce référentiel de comparaison permettra alors de déterminer la nature du colorant qui se trouve dans l'aliment que vous voulez tester.

Couleur	N°	Nom	Couleur	N°	Nom
Jaune	E100	Curcumine	Bleu	E130	Bleu antraquinonique
Jaune	E101	Lactoflavine	Bleu	E130	Bleu patenté V
Jaune	E102	Tartrazine	Bleu	E132	Indigotine
Jaune	E103	Chrysoïne S	Vert	E140	Chlorophylle
Jaune	E104	Jaune de quinoléine	Vert	E141	Complexes cuivriques des Chlorophylles
Jaune	E105	Jaune solide	Vert	E142	Vert acide brillant BS
Orange	E110	Jaune orange S	Brun noir	E150	Caramel
Orange	E111	Orange GGN	Brun noir	E151	Noir brillant BN
Rouge	E120	Cochenille, acide carminique	Brun noir	E152	Noir 7984
Rouge	E121	Rouge Orseille orcéine	Brun noir	E153	Carbo medicinalis vegetalis
Rouge	E122	Azorubine	Rouges divers	E160	Caroténoïdes
Rouge	E123	Amarante		E161	Xanthophylles
Rouge	E124	Rouge cochenille A		E162	Rouge de betterave
Rouge	E125	Écarlate GN		E163	Anthocyanes
Rouge	E126	Rouge ponceau GR			
Rouge	E127	Erythrosine			

De là à tenter de réaliser le même travail en mycologie, il n'y a qu'un pas !

Cette méthode expérimentale est connue depuis longtemps et avait été appliquée avec succès à divers groupes de champignons par Madeleine Gabriel il y a environ 50 ans. Elle relate ses expériences (« Recherches sur les pigments des Agaricales ») dans une série d'articles dont vous trouverez la référence ci-dessous.

Il apparaît que les espèces qui contiennent des anthraquinones constituent un terrain de travail idéal et nous avons choisi de nous y intéresser à nouveau, dans l'article suivant.

Il existe des techniques beaucoup plus pointues, telles que la chromatographie en phase gazeuse ou la spectrophotométrie, mais qui sont totalement inaccessibles à des « amateurs » et nécessitent l'accès à un laboratoire spécialisé.