



La chromatographie sur couche mince (C.C.M.)

Qu'est ce que c'est ?



C'est une méthode physique de séparation des éléments constitutants d'un mélange, par simple capillarité.



Elle est basée sur les différences d'affinité des composants à l'égard de 2 phases, l'une fixe, et l'autre mobile.

Les phases

STATIONNAIRE ou FIXE

MOBILE

C'est un élément solide (gel de silice), déposé en couche mince et fixé sur une plaque de verre, de métal ou de plastique, sur lequel on va déposer une goutte du mélange liquide à séparer

C'est un élément liquide, appelé ELUANT, constitué par un solvant ou un mélange de solvants bien déterminés

Mise en contact dans un flacon en verre

La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange.



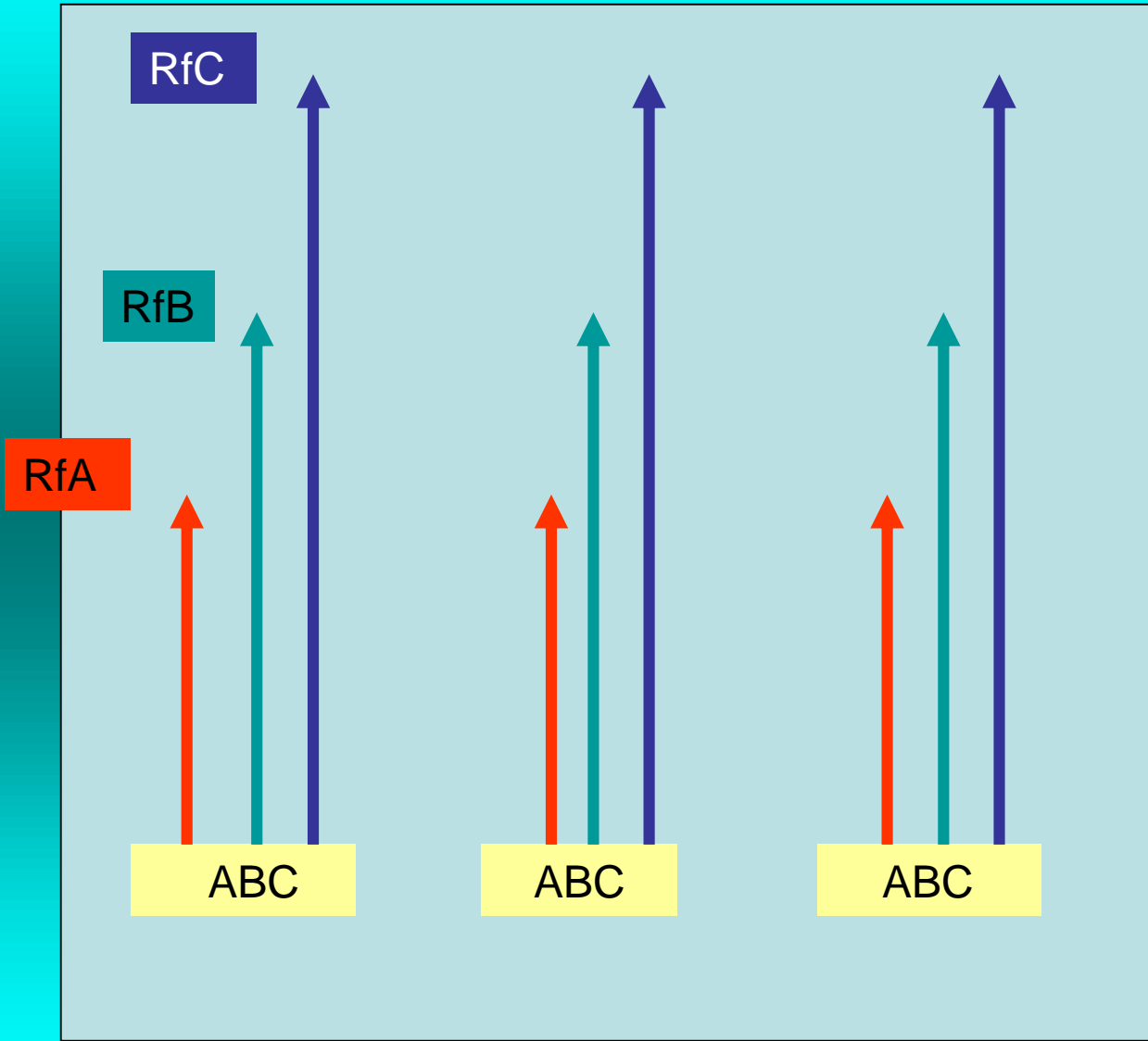
C'est le phénomène d'élu­tion, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser.



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

(une même substance migre toujours à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques)

En théorie



Modalités pratiques



Plaque de silicagel de 10x10 cm

A (= E102 – tartrazine - jaune) +
B (= E131 – bleu patenté), en
solution aqueuse à 1 %

A (= E102 – tartrazine - jaune) +
B (= E122 – azorubine - rouge),
en solution aqueuse à 1 %



2x AB

4x AB

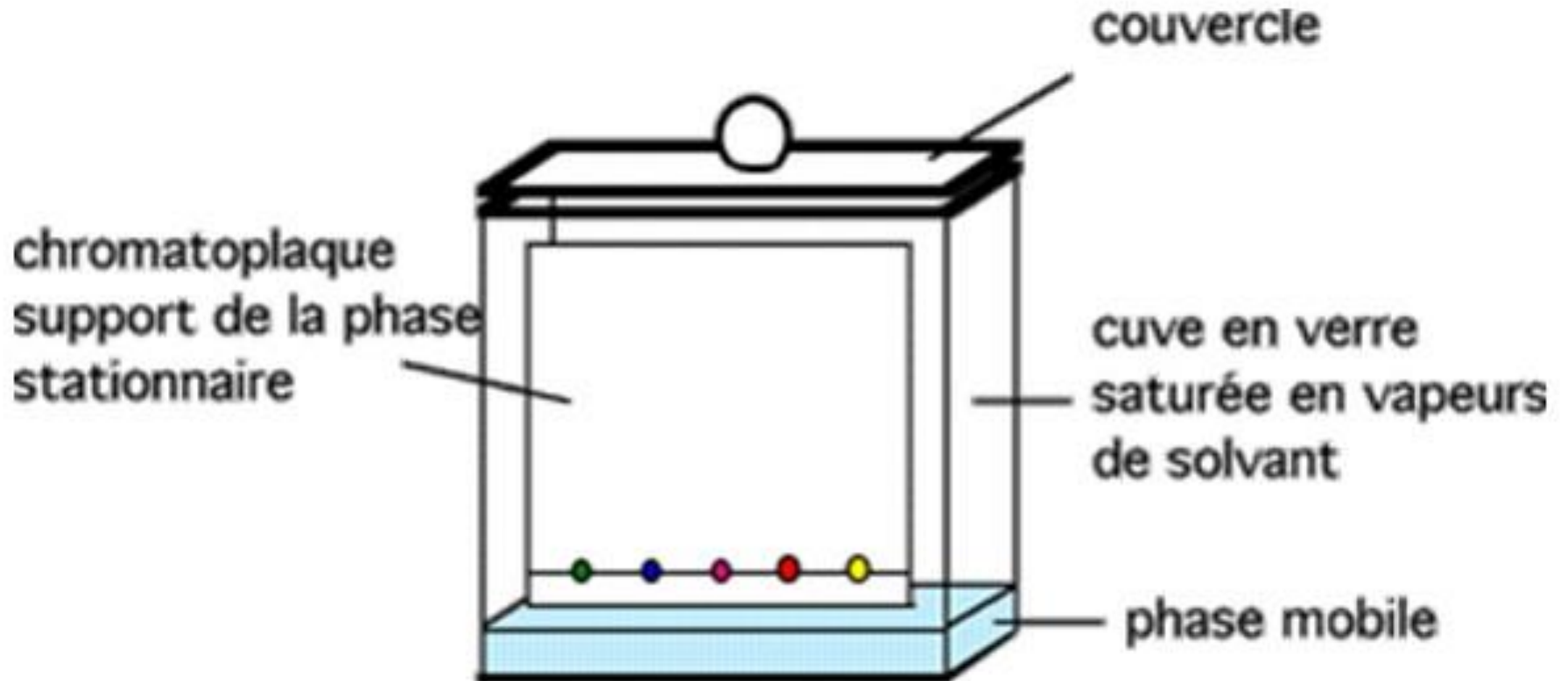
6x AB

Eluant : NaCl à 3 % (ou citrate de Na à 5
%, ou 50/50 éthanol pur et NaCl à 3 %)

1,5 cm



Rien ne vaut un bon croquis !



Les points colorés sont les dépôts d'échantillons

Résultats pratiques : temps d'application de 5 minutes !



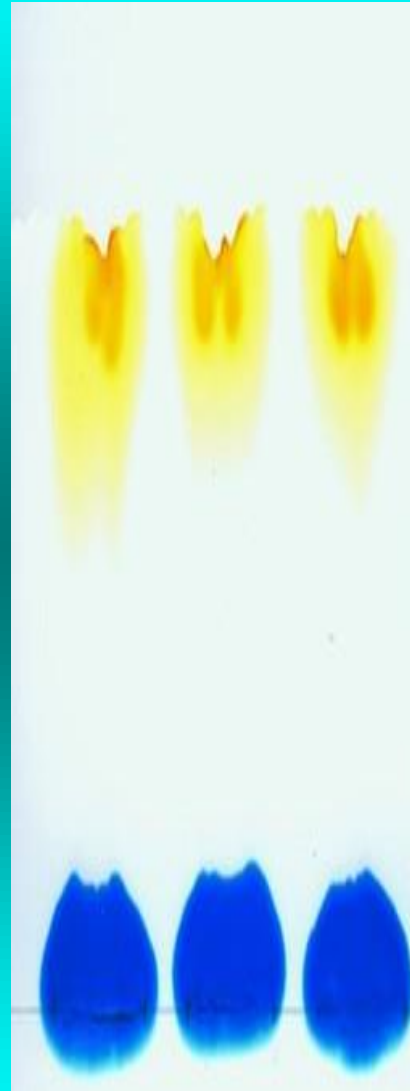
Rf E122



Rf E131



dépôt



Rf E102



Rf E131



dépôt vert

Si nous mélangeons les 3 colorants :



Rf E122

Rf E102

Rf E131

dépôt vert

Qu'en est-il chez les champignons ?



Madeleine GABRIEL (1950) : « Recherche sur les pigments des Agaricales »



Les espèces contenant des anthraquinones constituent un terrain de travail idéal



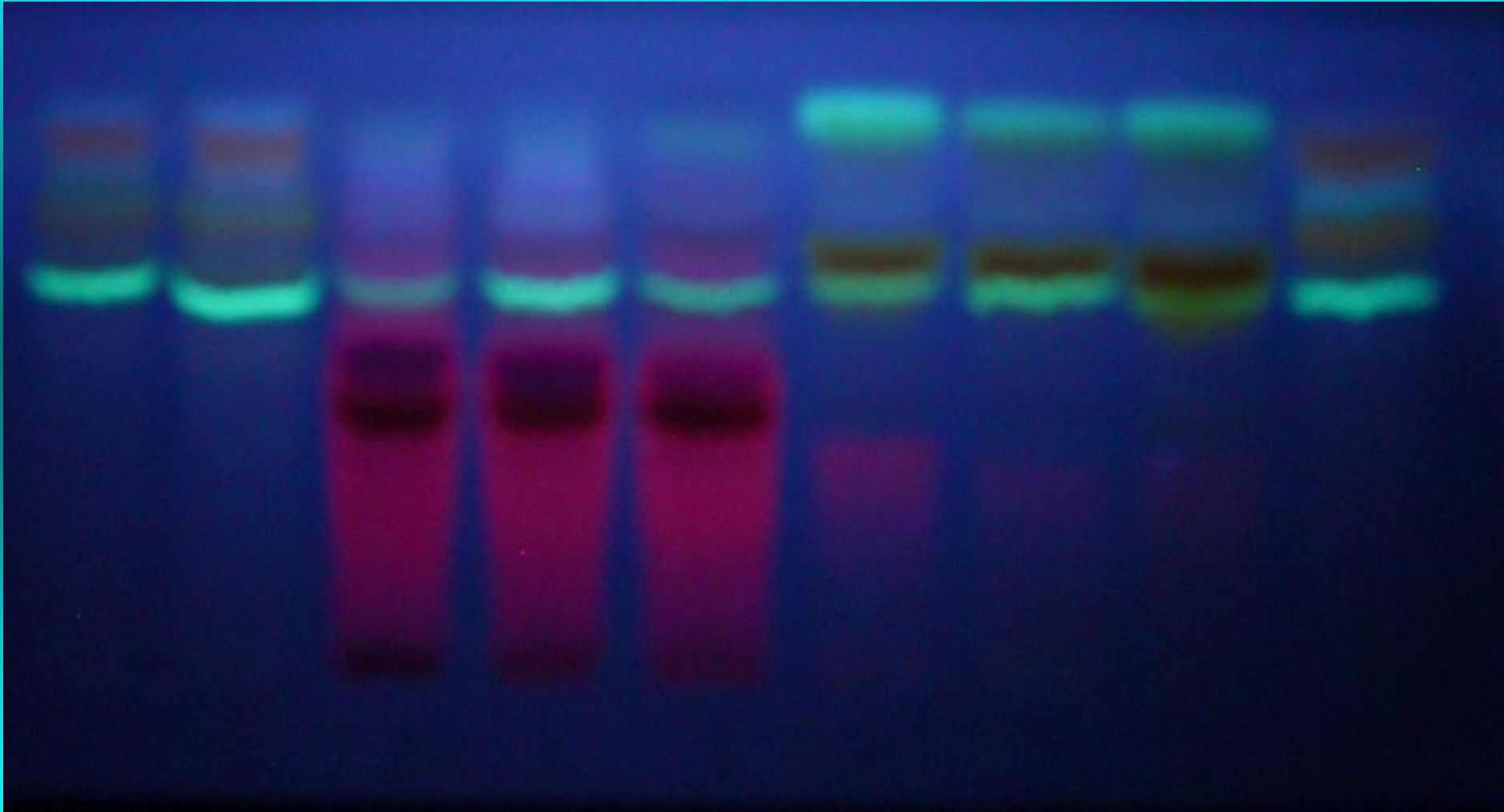
Cortinariales → Cortinaires → Dermocybes



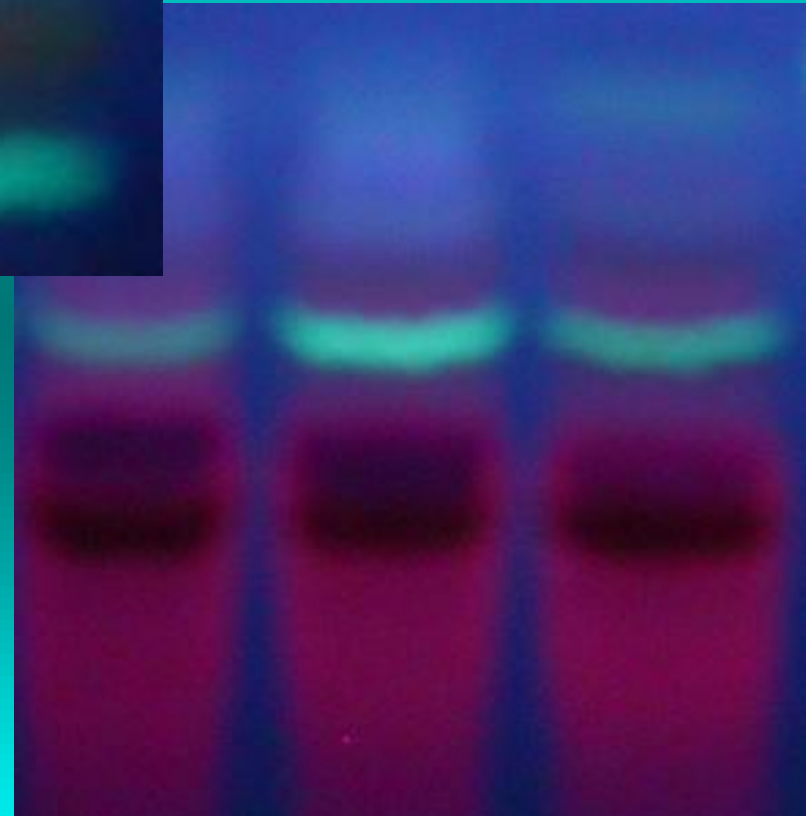
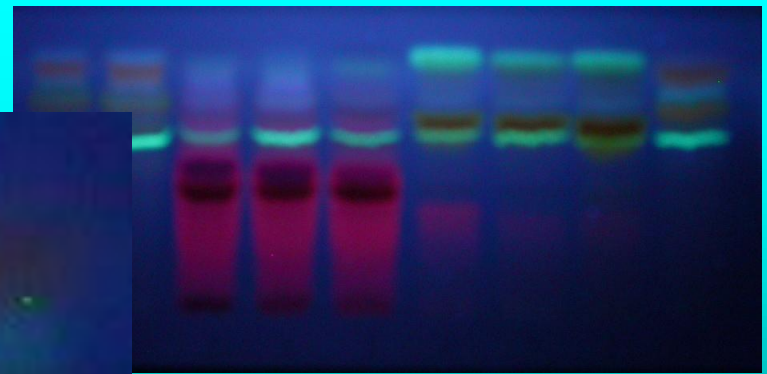
Chromatographie en phase gazeuse et spectrophotométrie → techniques inaccessibles à des amateurs

Un spectrogramme à tire d'exemple

Voici une plaque réalisée à partir de 9 Dermocybes de Nouvelle-Zélande qui étaient vraiment très semblables du point de vue micro et macro.



Interprétation



Par comparaison, on constate que (en partant de la gauche) : 1 et 2 appartiennent à la même espèce ; idem pour 3, 4, 5, idem pour 6, 7, 8 ; 9 est une espèce différente mais affine à 1 et 2, à mettre en balance avec d'autres caractères.

Un peu de matériel est nécessaire !



TECHNIQUE : étape 1

EXTRACTION DES PIGMENTS

- prendre 5 à 10 gr de champignon sec
- déposer dans un mortier avec du sable fin et sec
- verser 5 cc de méthanol pur
- broyer finement → disparition des fragments
- transvaser dans un tube avec bouchon à visser
- ajouter du méthanol pur (2x la hauteur de poudre)
- laisser décanter
- nous allons utiliser le surnageant

TECHNIQUE : étape 2
PREPARATION de l'ELUANT

Avec des plaques de silicagel, nous utilisons un éluant polaire « universel » constitué de la manière suivante :

Chloroforme/n. butanol/éthanol/acide acétique/eau (5:55:10:15:15)

Un autre éluant peut être utilisé :

n. butanol/acide acétique/eau (80:10:10)

PRECAUTIONS :

- travailler sous hotte pour la préparation de l'éluant
- ne pas fumer en présence de ces produits
- préparer de petites quantités car l'éluant ne reste efficace que durant 24 à 48 heures au maximum

TECHNIQUE : étape 2

PREPARATION DU SOLVANT DE MIGRATION

Cas particulier de la chromatographie des caroténoïdes : ils ne sont pas solubles dans l'eau ; il faudra donc pour les extraire et les chromatographier, utiliser des solvants apolaires.

On peut extraire à l'acétone, à l'acétate d'éthyle, au mélange acétone/éther de pétrole (5:45).

Les solvants de chromatographie peuvent être, pour les caroténoïdes :

Cyclohexane/acétate d'éthyle (75:25)

Cyclohexane/éther de pétrole/acétone (5:85:10)

TECHNIQUE : étape 3

DEPOT DES ECHANTILLONS

- découper des plaques de silicagel de 10x10 cm
- tracer au crayon, une ligne à 1,5 cm du bas de la plaque
- marquer 5 points de dépôt, régulièrement espacés, sur cette ligne
- déposer, en plusieurs passages, de très petites gouttes avec une pipette de Pasteur
- sécher au sèche-cheveux entre chaque dépôt

L'expérience jouant, nous réalisons maintenant des dépôts de 5 mm de long, car le spectrogramme est plus parlant.



TECHNIQUE : étape 3

**DEPOT DES ECHANTILLONS → 2 objectifs
bien différents**

**PREPARER DES
ECHANTILLONS DE
REFERENCE**

dépôt du surnageant :

n° 1 : 2 gouttes

n° 2 : 4 gouttes

n° 3 : 6 gouttes

n° 4 : 8 gouttes

n° 5 : 10 gouttes

L'expérience m'a permis de constater que 6 gouttes constituent la quantité idéale

**COMPARER DIVERSES
ESPÈCES**

dépôt du surnageant des 5 espèces à comparer :

n° 1 : 6 gouttes de A

n° 2 : 6 gouttes de B

n° 3 : 6 gouttes de C

n° 4 : 6 gouttes de D

n° 5 : 6 gouttes de E

Cela permet de comparer 5 échantillons différents à la fois



TECHNIQUE : étape 4

DEVELOPPEMENT DU CHROMATOGRAMME

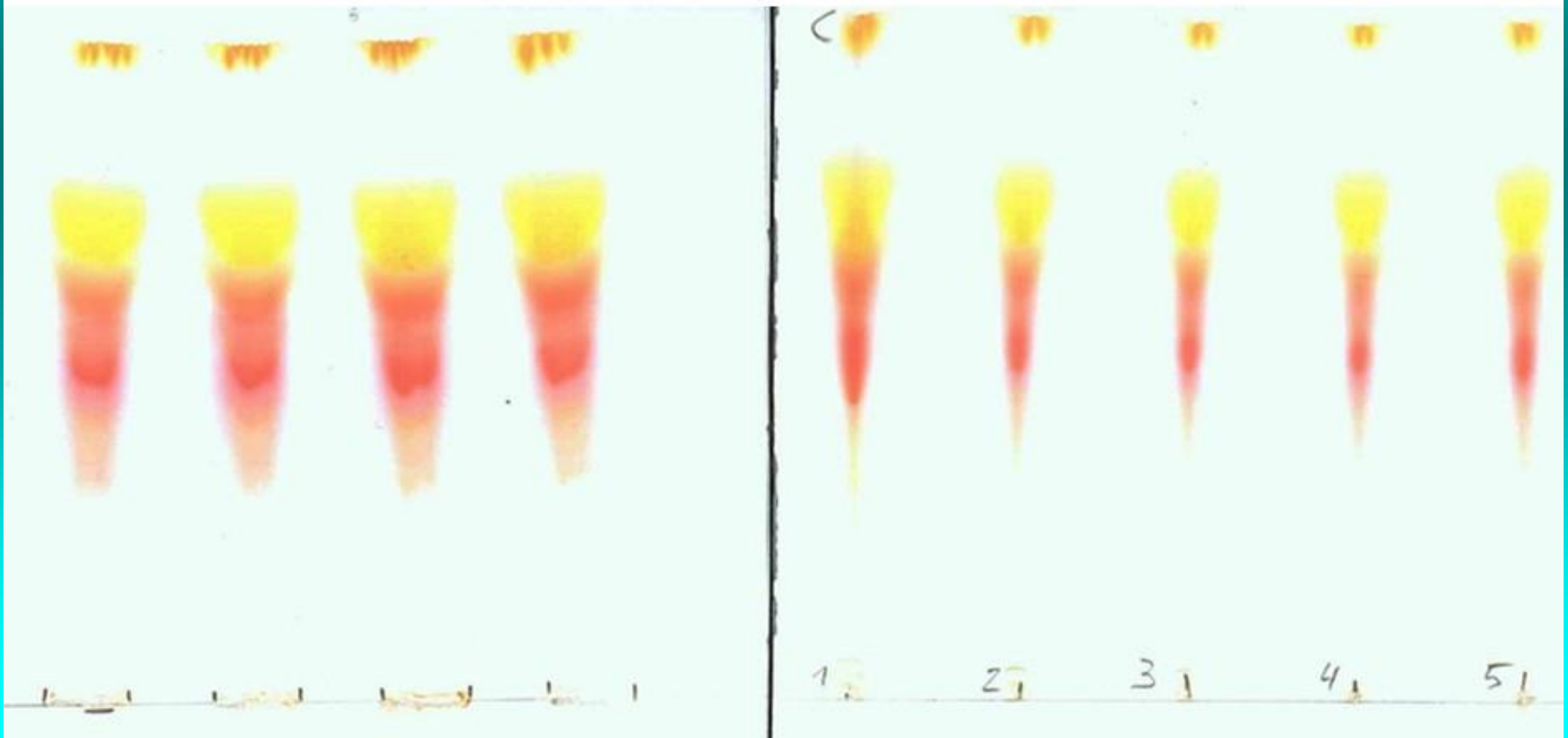
- verser 1 cm d'éluant au fond du flacon de développement (la forme rectangulaire est très pratique)
- y placer délicatement, en position verticale, la plaque avec les dépôts (ceux-ci ne doivent pas toucher l'éluant)
- poser le couvercle
- laisser migrer jusqu'à $\frac{1}{2}$ cm du haut de la plaque (durant la phase de migration, ne pas déplacer le flacon)
- sécher l'air libre ou avec le séchoir

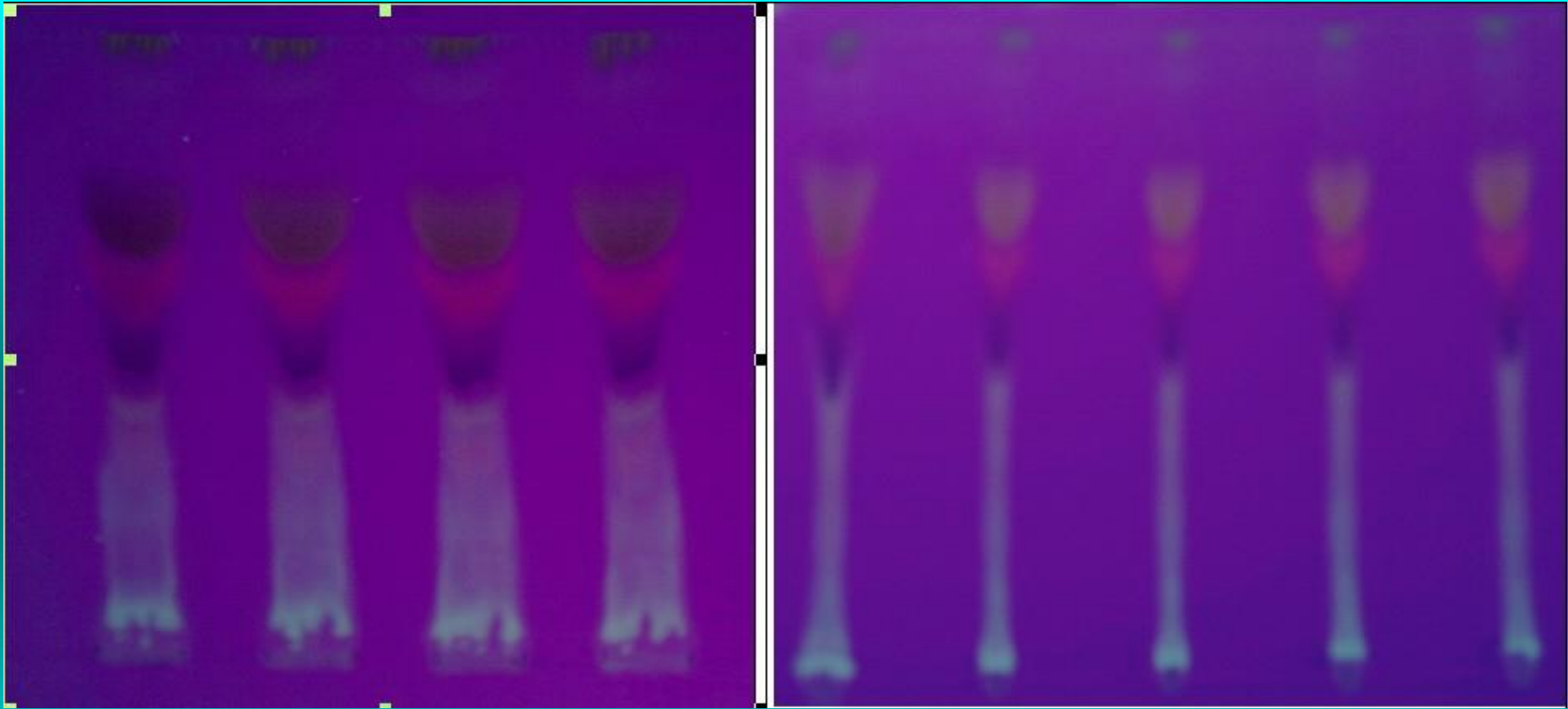
TECHNIQUE : étape 5

GARDER DES TRACES

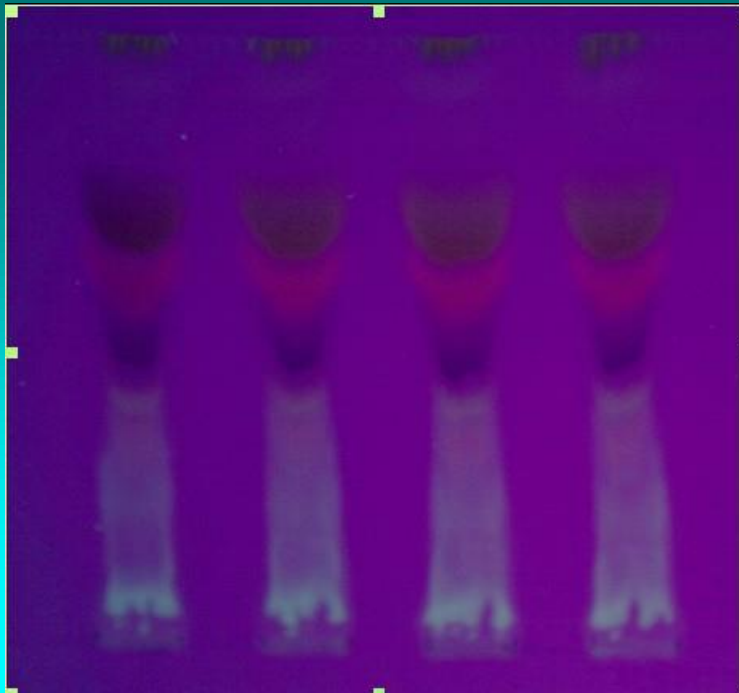
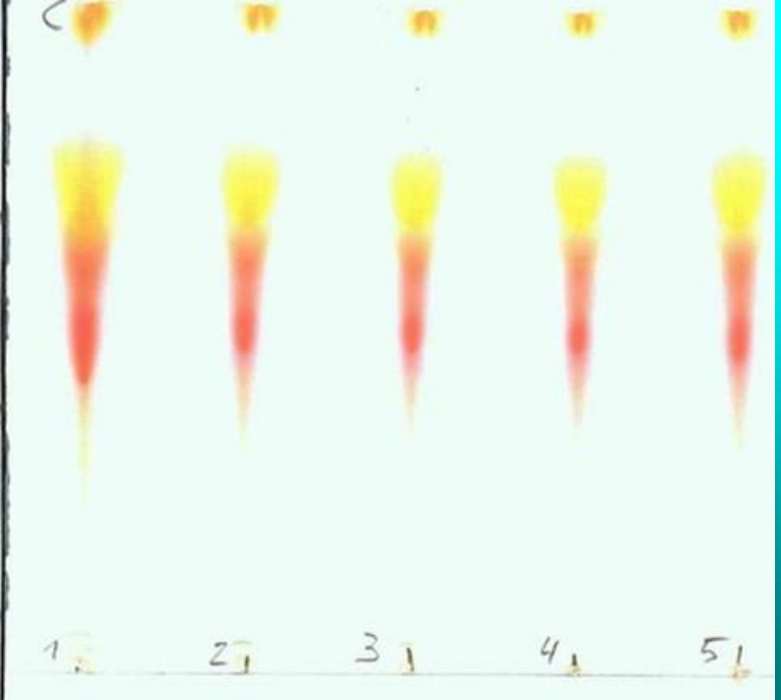
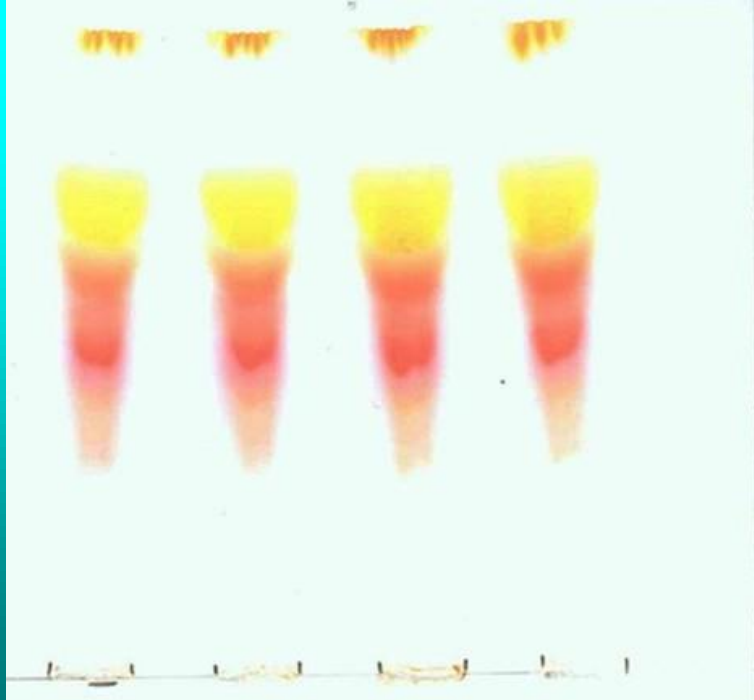
- photographier le chromatogramme en lumière naturelle
- **Mieux, à mon avis** : le scanner
- réaliser une photographie sous rayonnement ultraviolet
- conserver les chromatogrammes à l'abri de la lumière

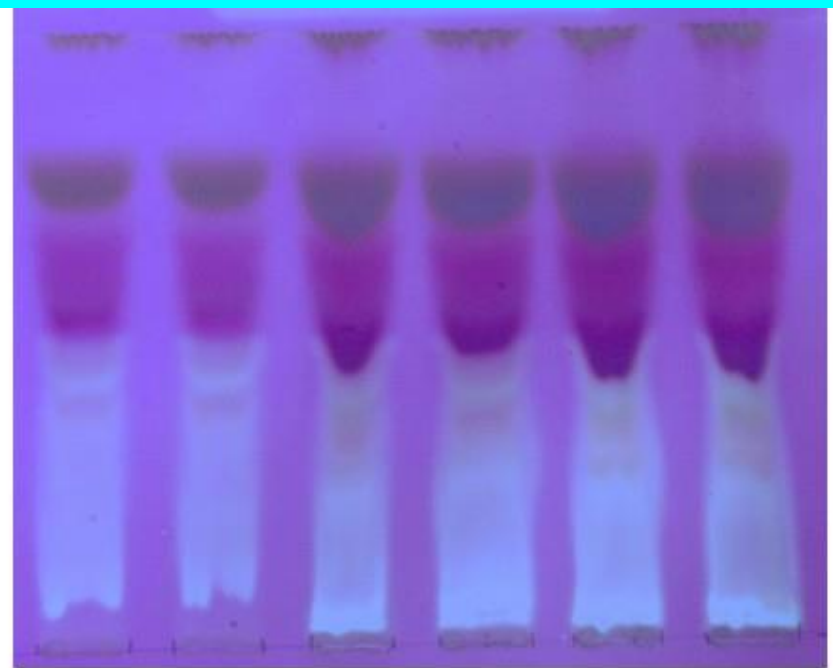
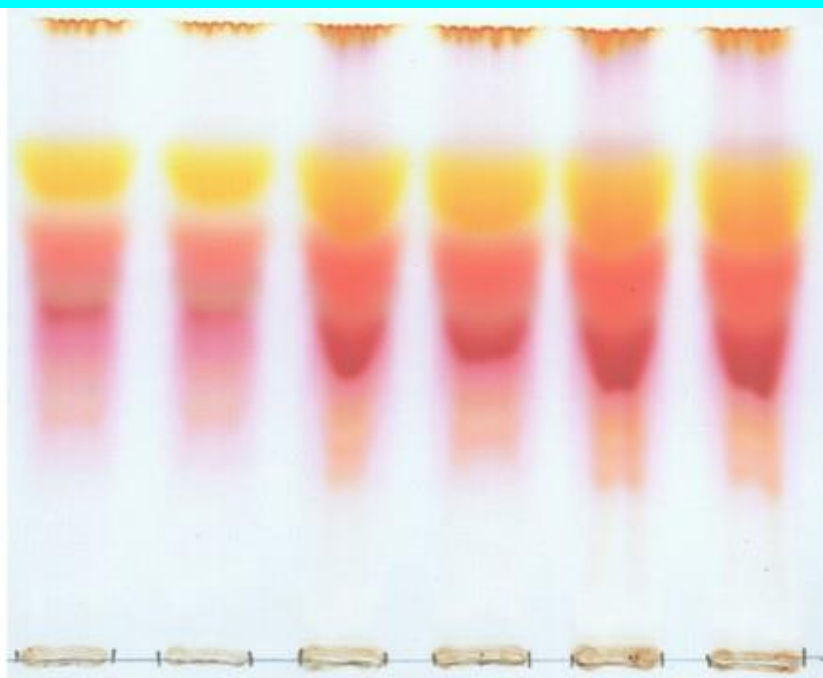
Etude comparative de chromatogrammes de *Dermocybe sanguinea*



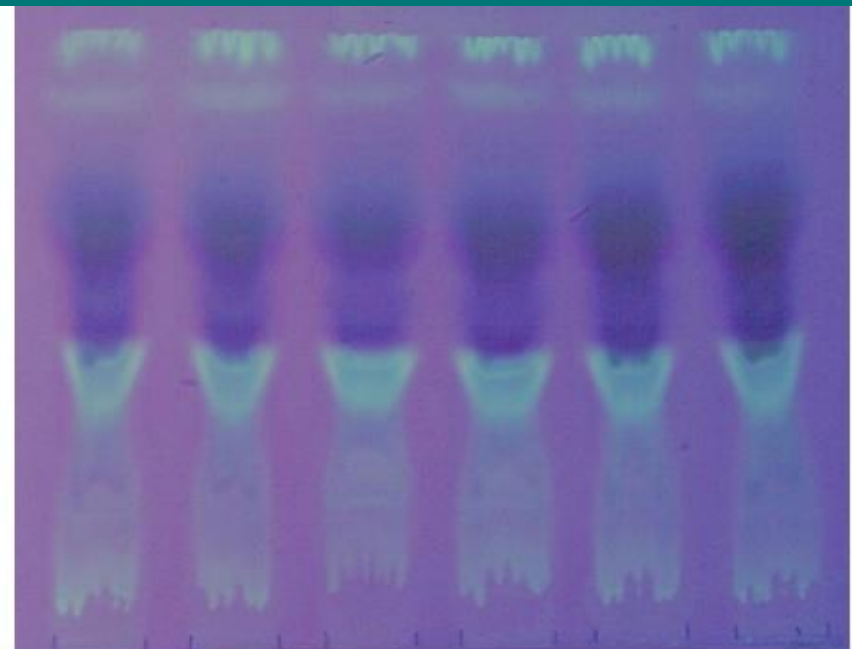
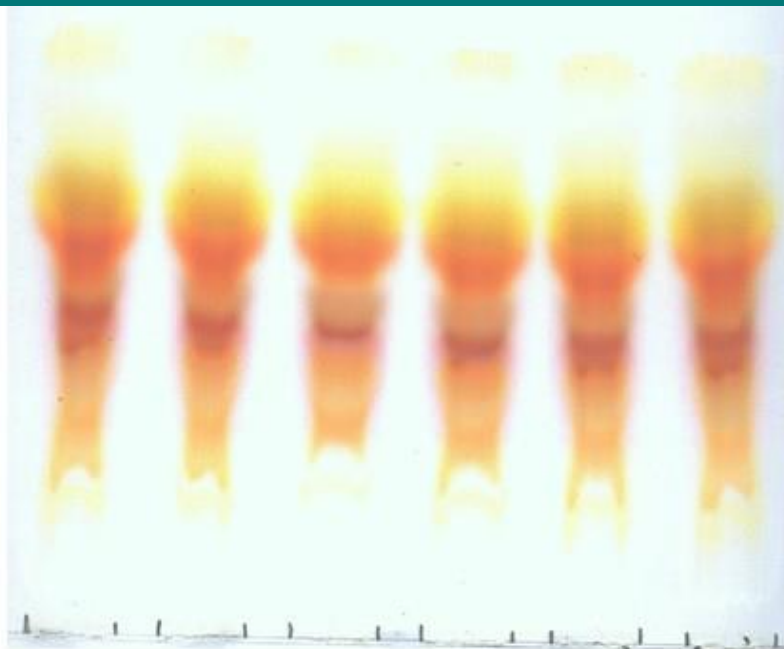


Les mêmes chromatogrammes, photographiés sous
éclairage UV

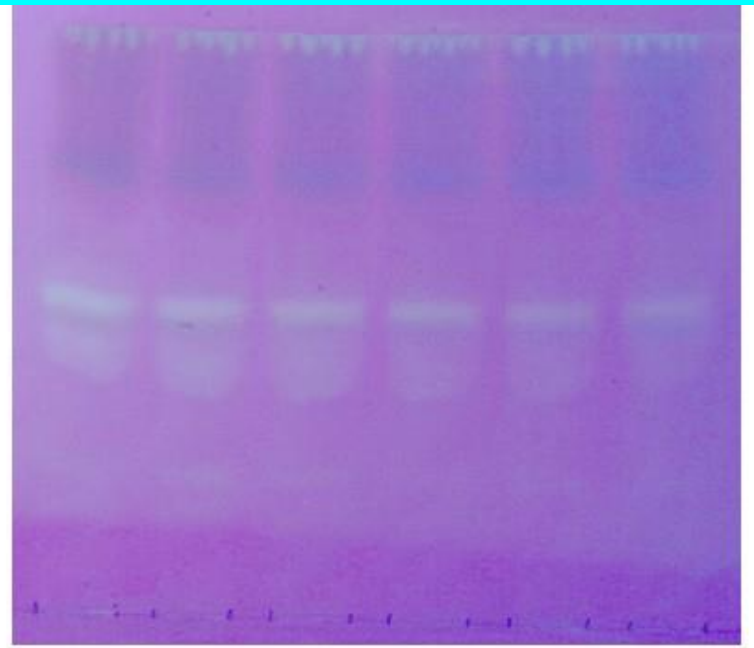
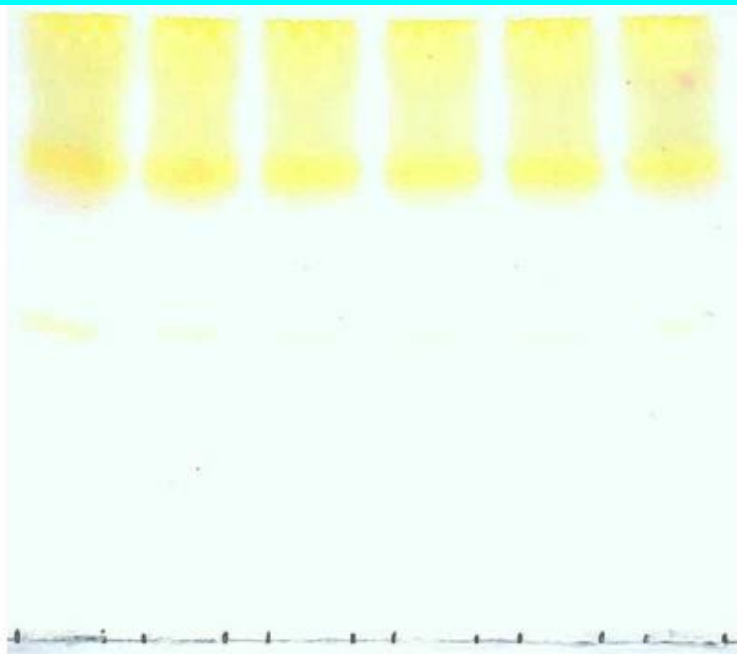




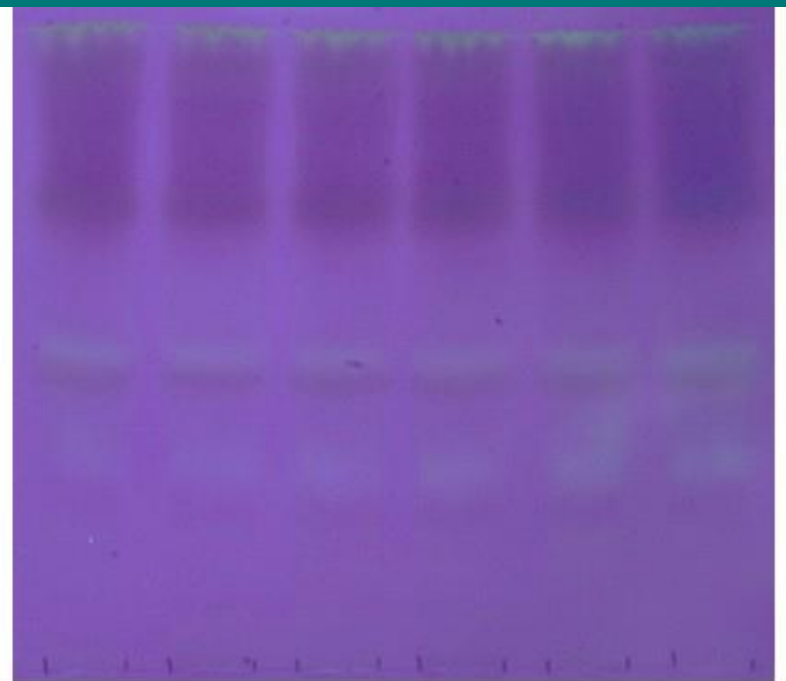
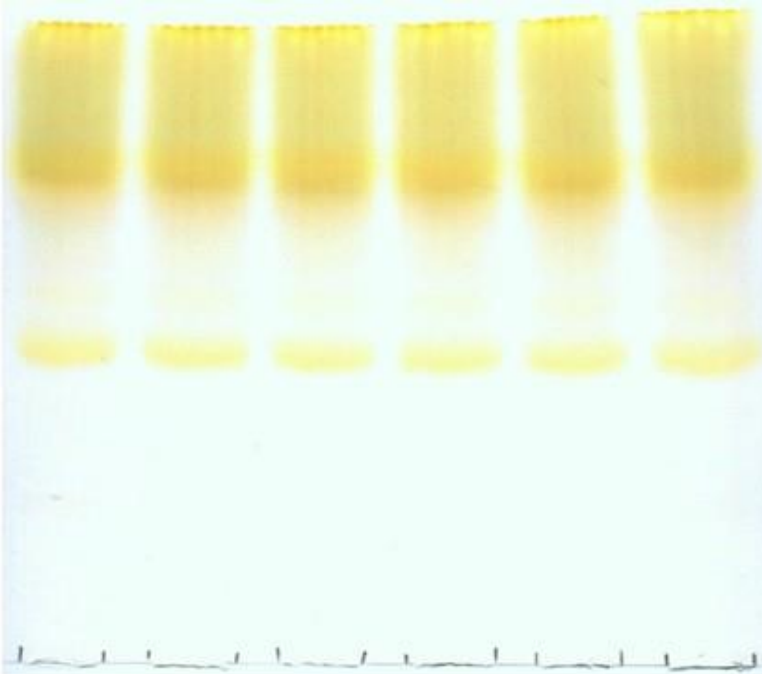
Dermocybe sanguinea (Wulfen) Gray



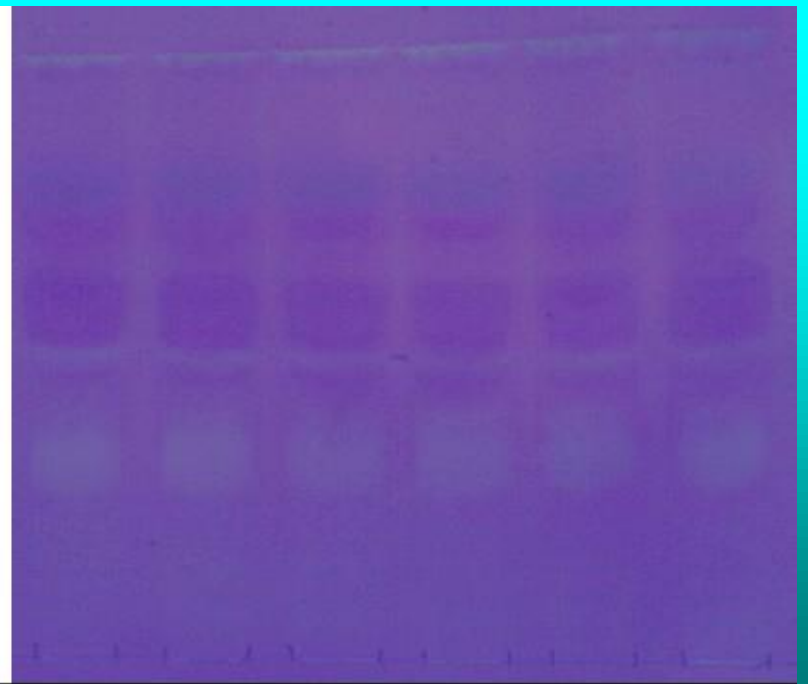
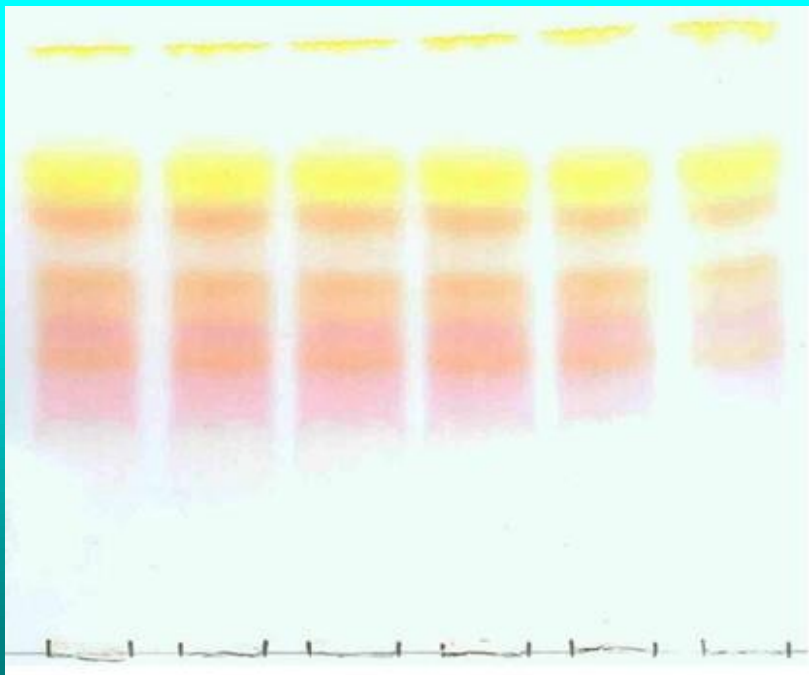
Dermocybe cinnamomea (L.: Fr.) Moser



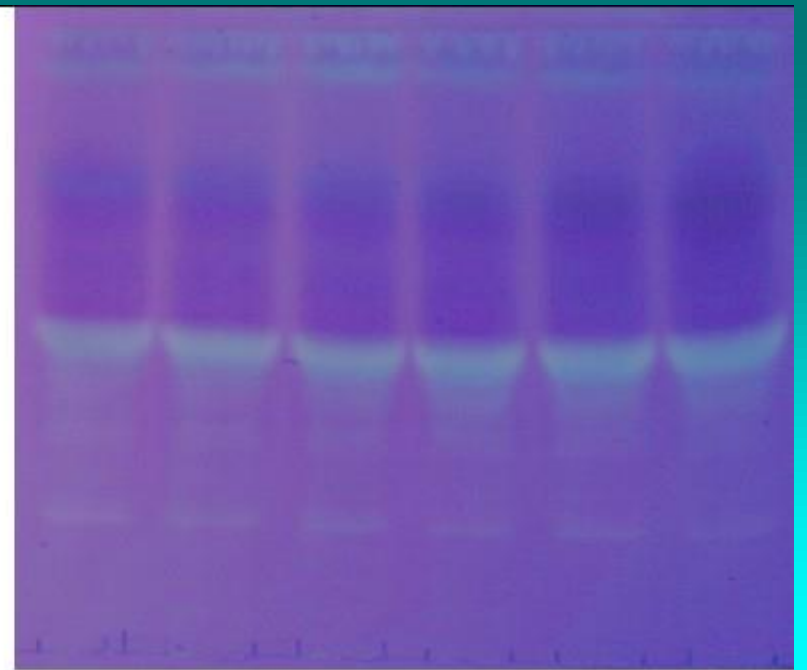
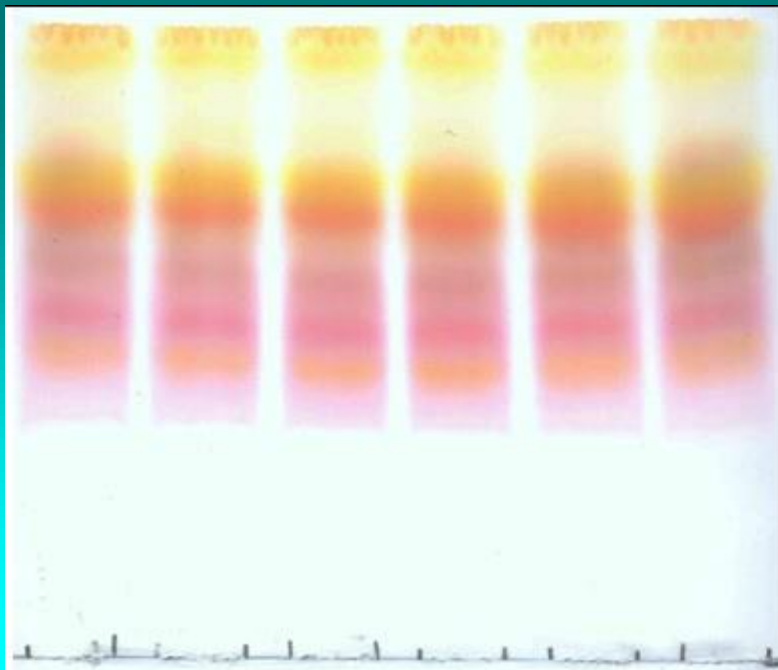
Dermocybe cinnamomeolutea Orton



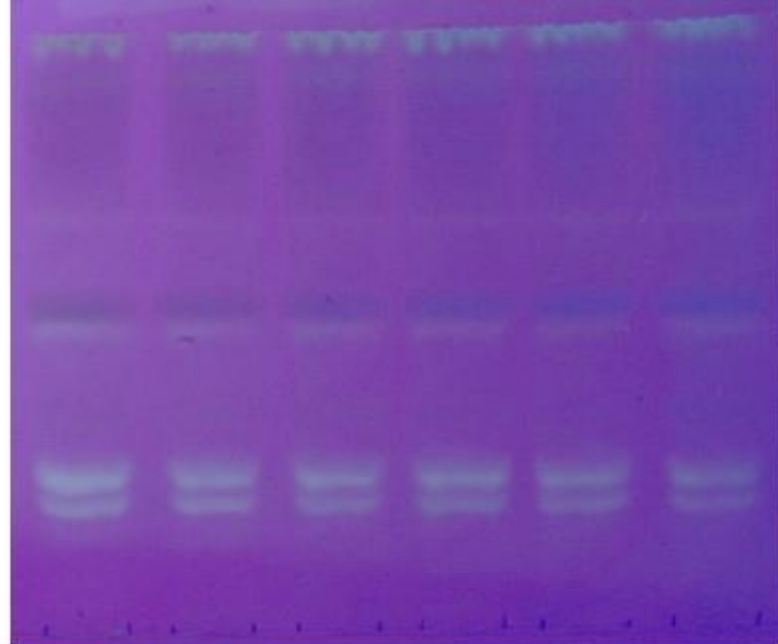
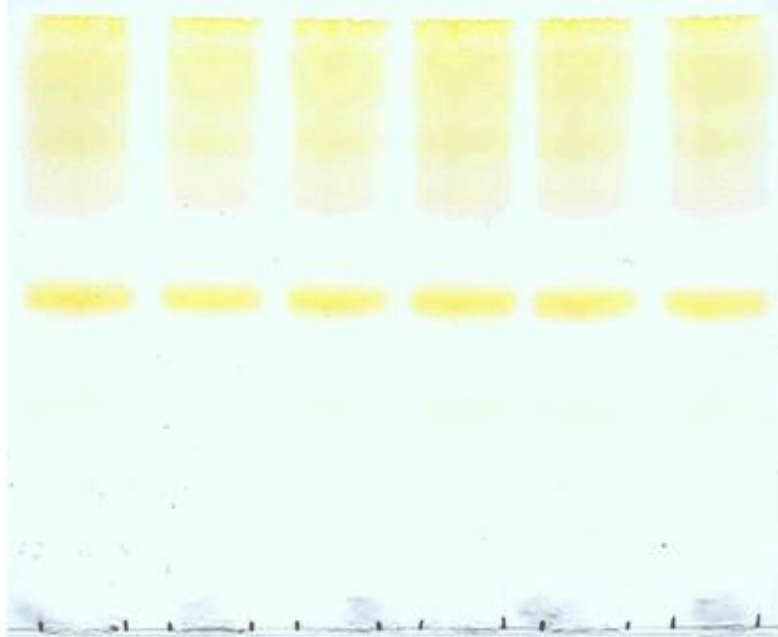
Dermocybe cinnamomeolutea Orton



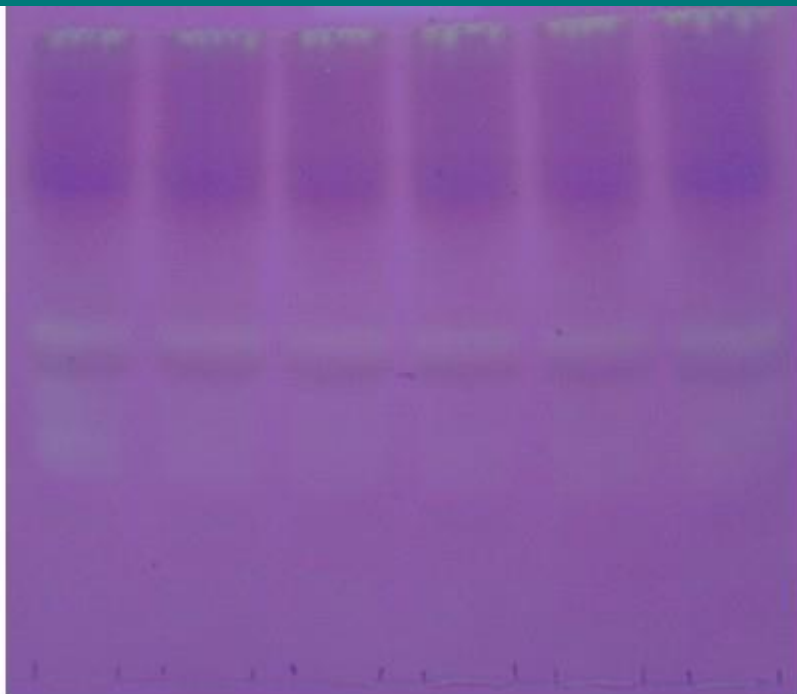
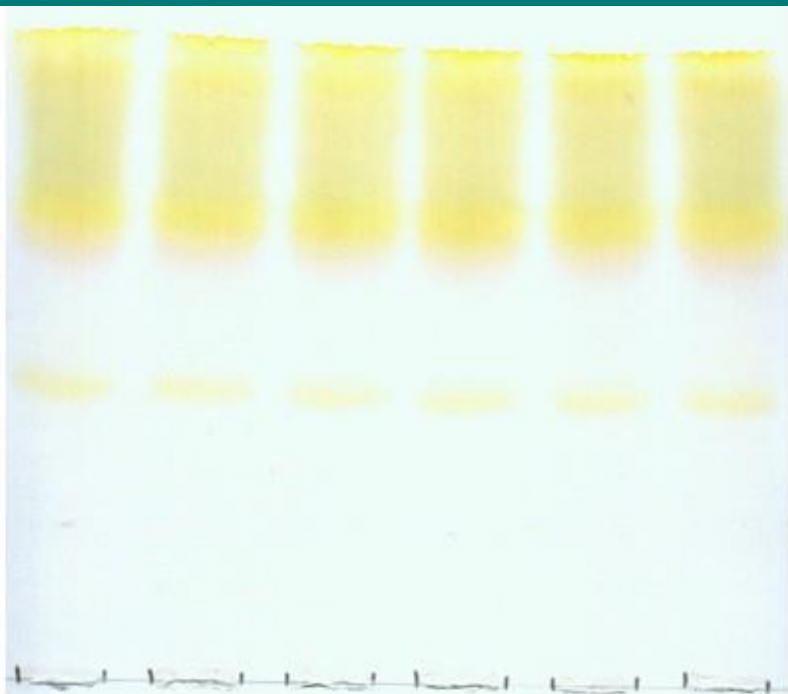
Cortinarius fervidus Orton



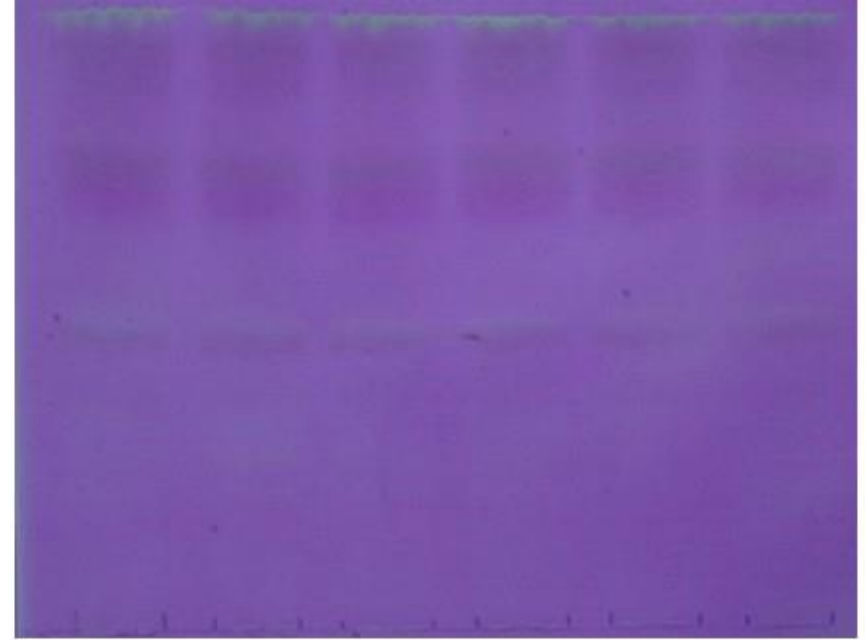
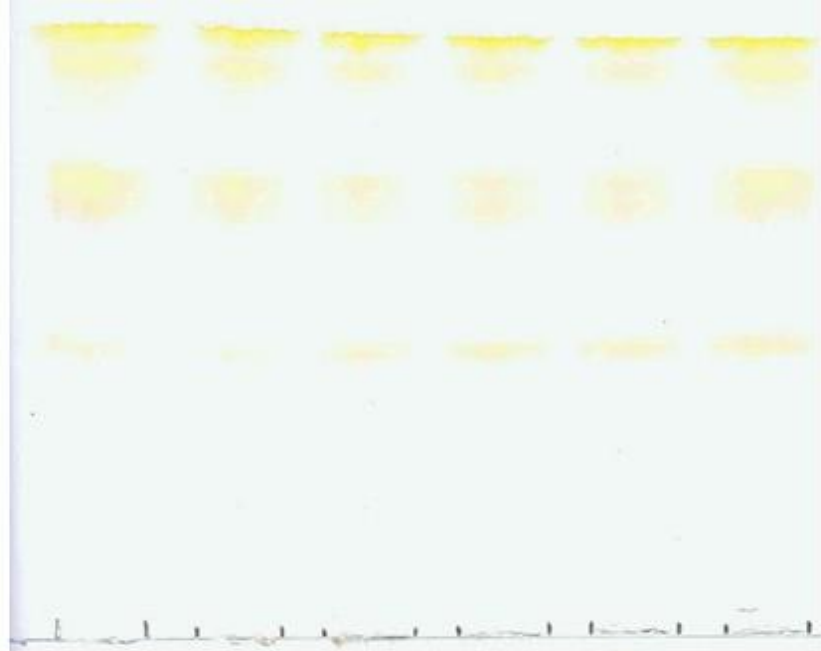
Dermocybe semisanguinea (Fr.) Moser



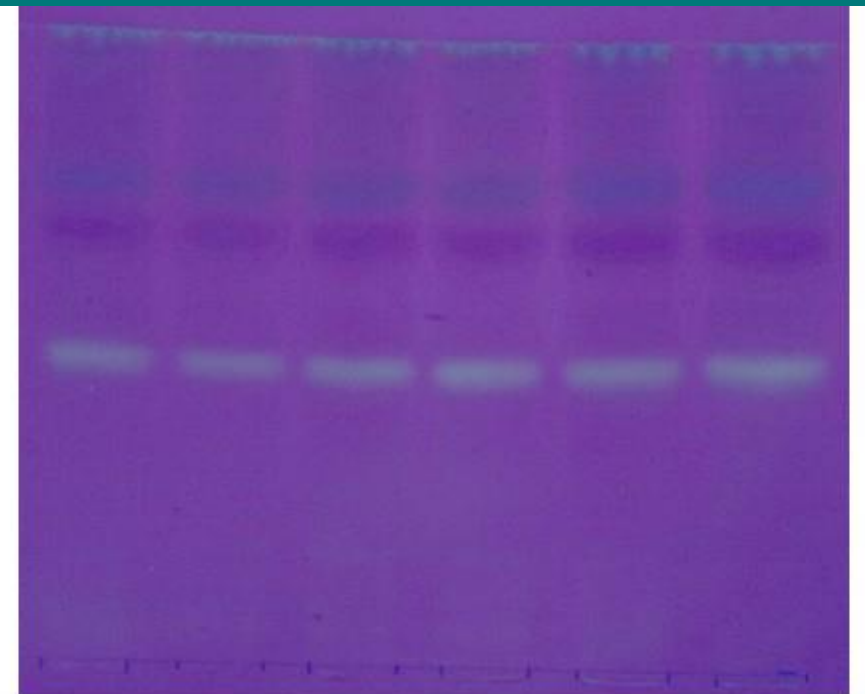
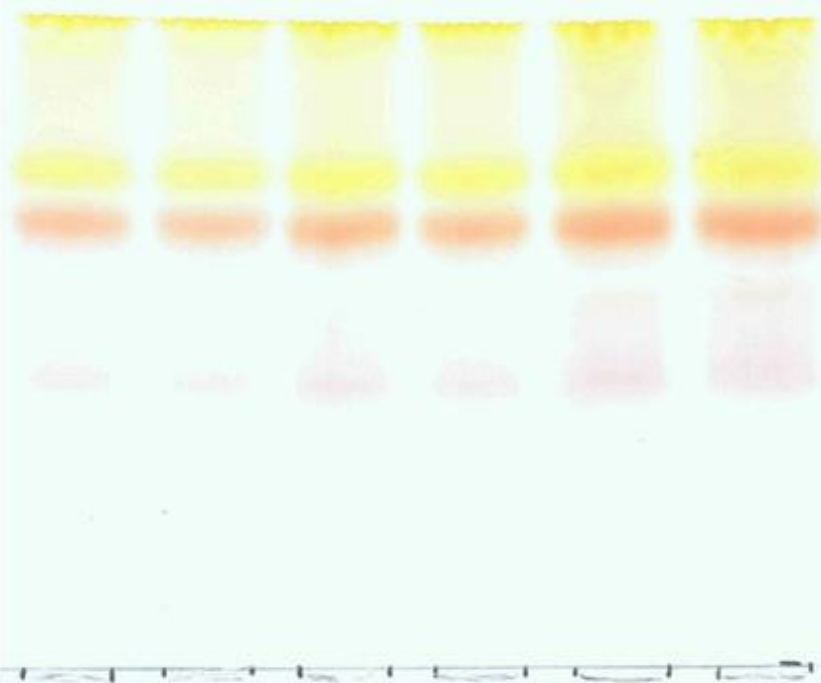
Dermocybe olivaceofusca Kühner (= *carpineti* Moser ?)



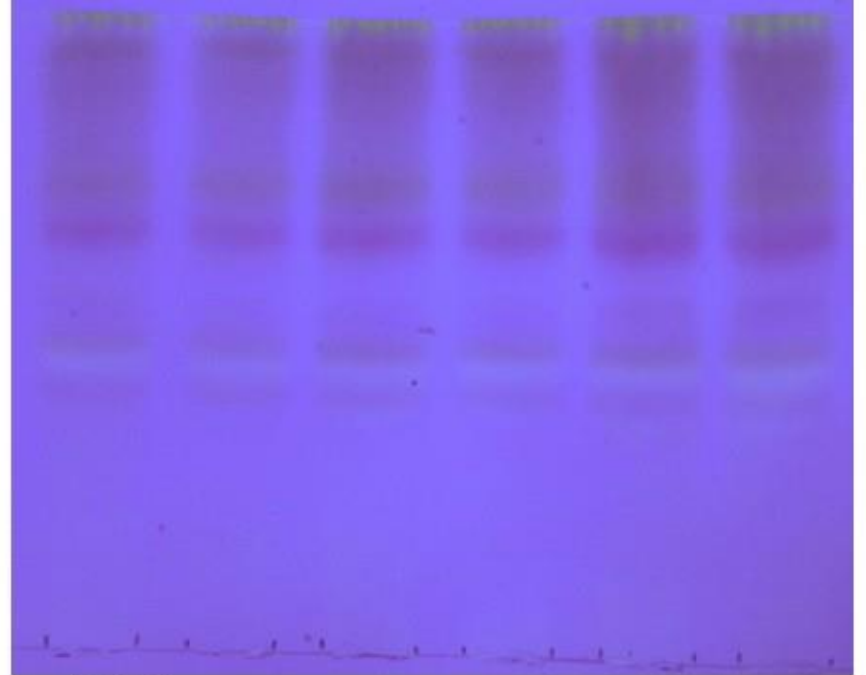
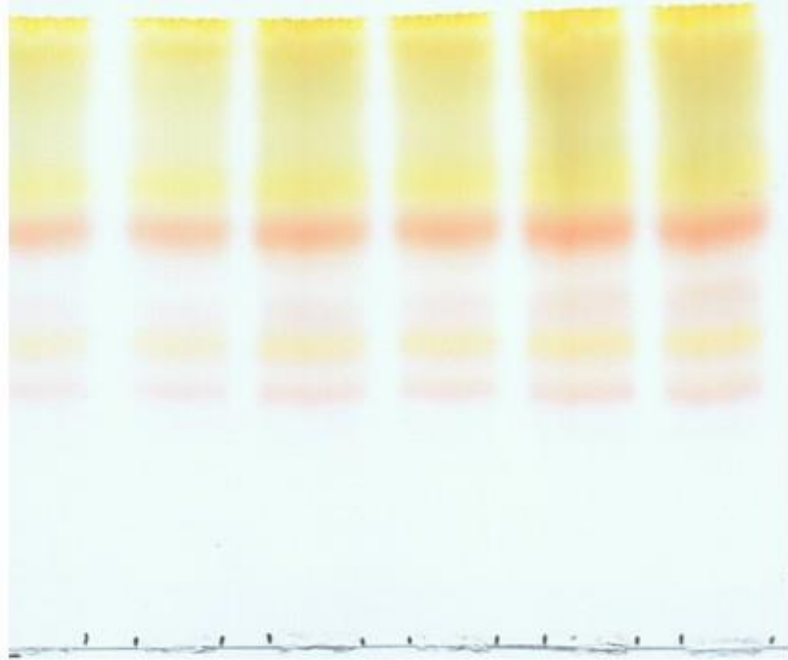
Dermocybe crocea (Schaeff.) Moser



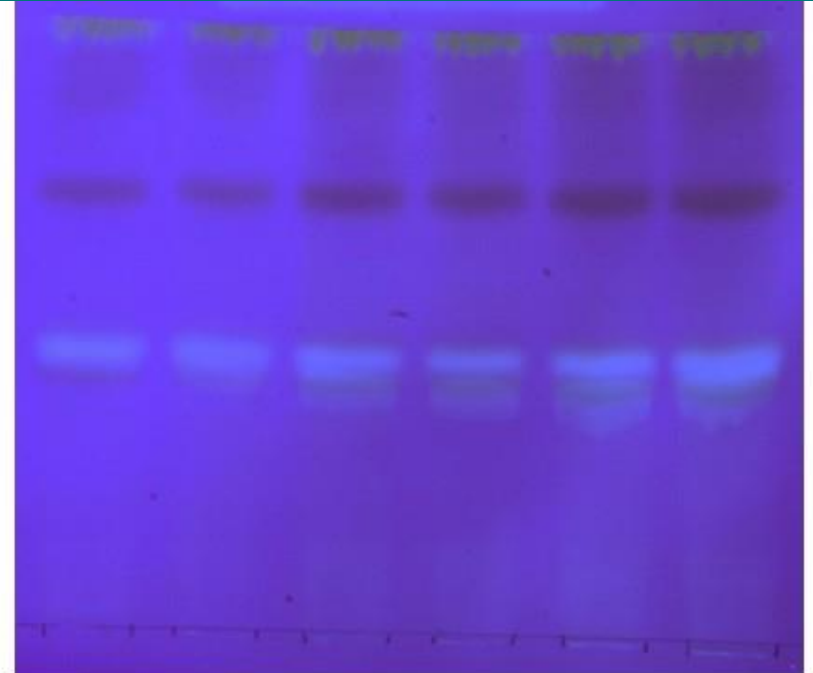
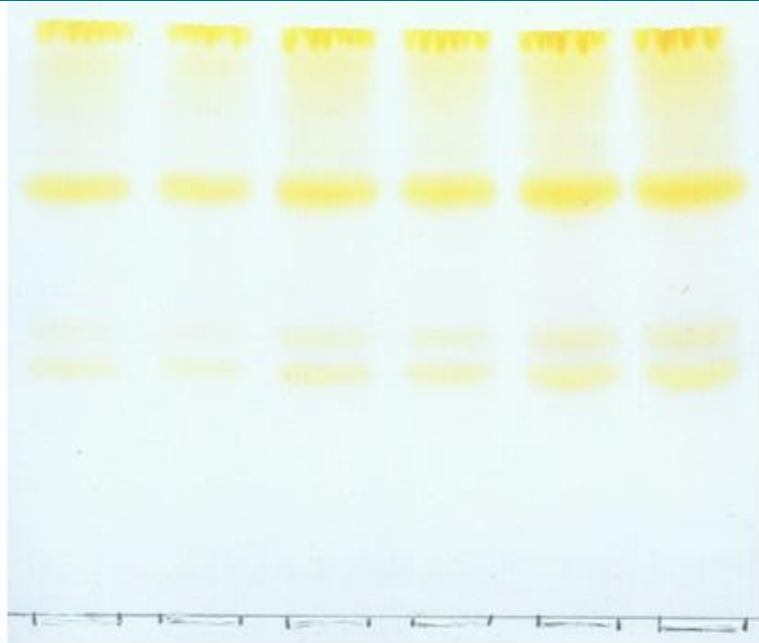
Dermocybe uliginosa (Berk.) Moser



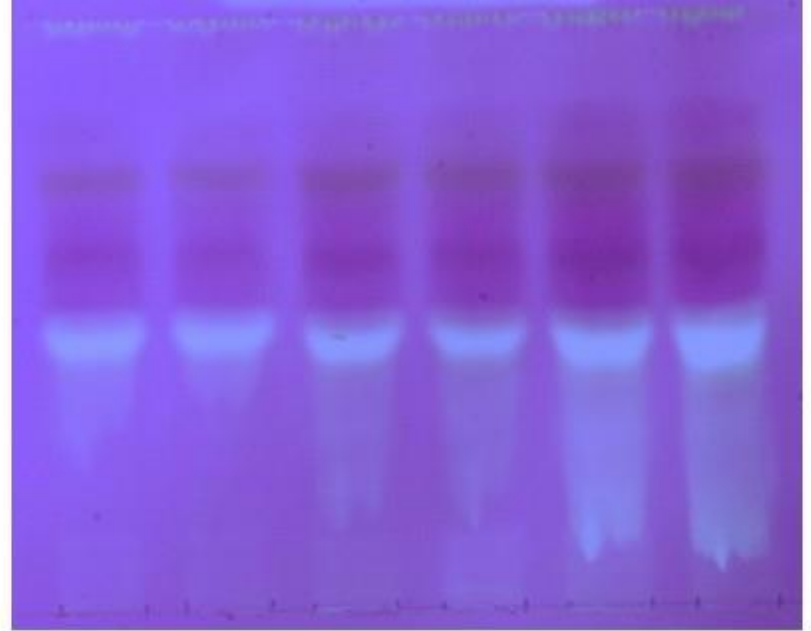
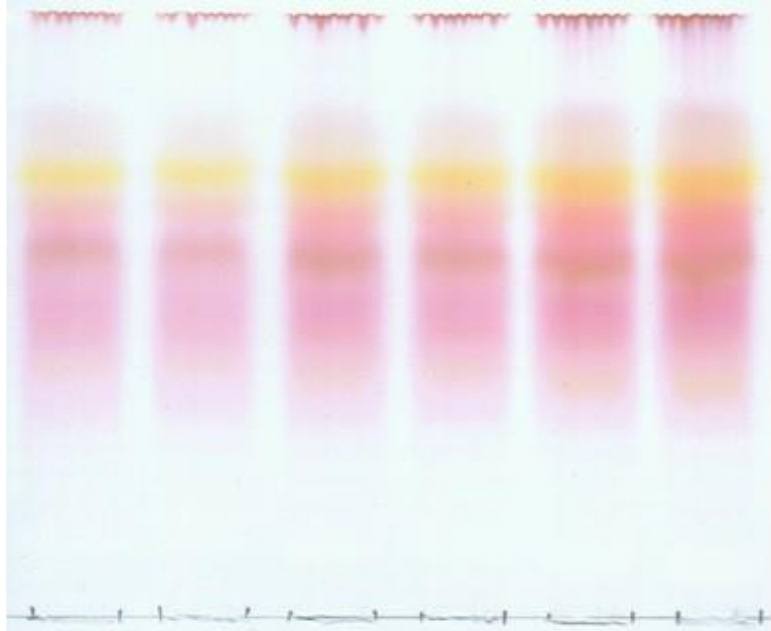
Dermocybe sommerfeldtii Hoiland



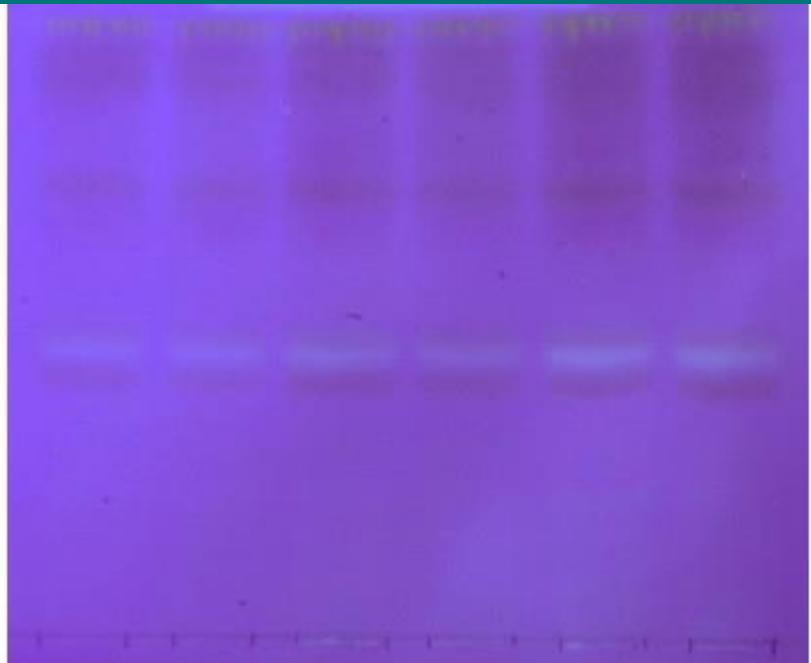
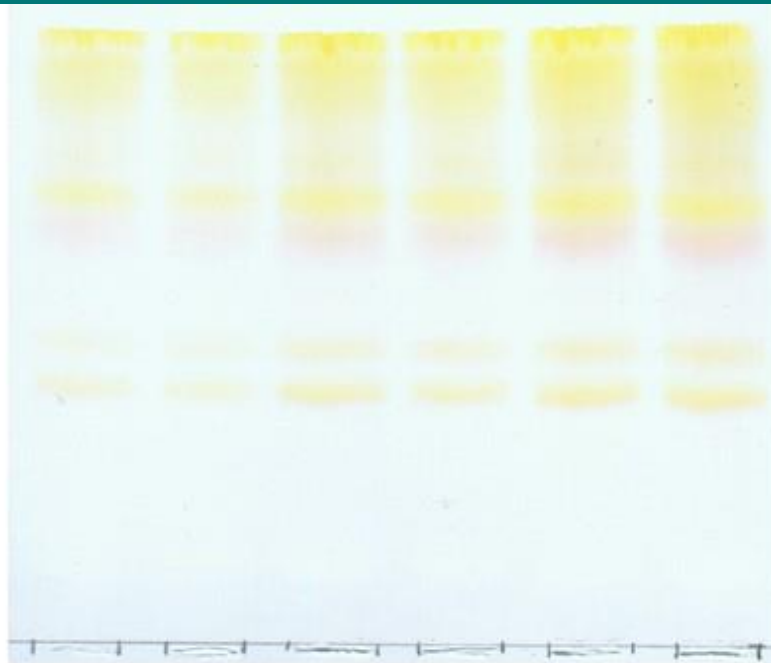
Dermocybe croceoconia (Fr.) Moser



Dermocybe huronensis (Ammirati & A.H.Smith) Ammirati



Dermocybe phoenicea (Vent.) M.Moser



Dermocybe tubaria (Ammirati & A.H.Smith) Ammirati

Champ d'application et réserves ?

- Cette technique ne s'applique qu'aux espèces contenant des anthraquinones et des caroténoïdes
- Cette technique est basée sur des critères beaucoup moins subjectifs que des appréciations de taille, de couleur ou de fragrance
- Malgré l'avis de certains cortinariologues, nous considérons que cette méthode est susceptible d'améliorer fortement la détermination complexe des Dermocybes
- Cette technique s'avère chronophage, mais sans doute pas plus qu'une étude microscopique minutieuse
- Le travail est grandement simplifié lorsqu'on dispose d'un référentiel établi au départ de déterminations fiables (difficultés au niveau des types)

FIN

<http://www.champignons-passion.be>