



Analyse quantitative en CCM-HPTLC

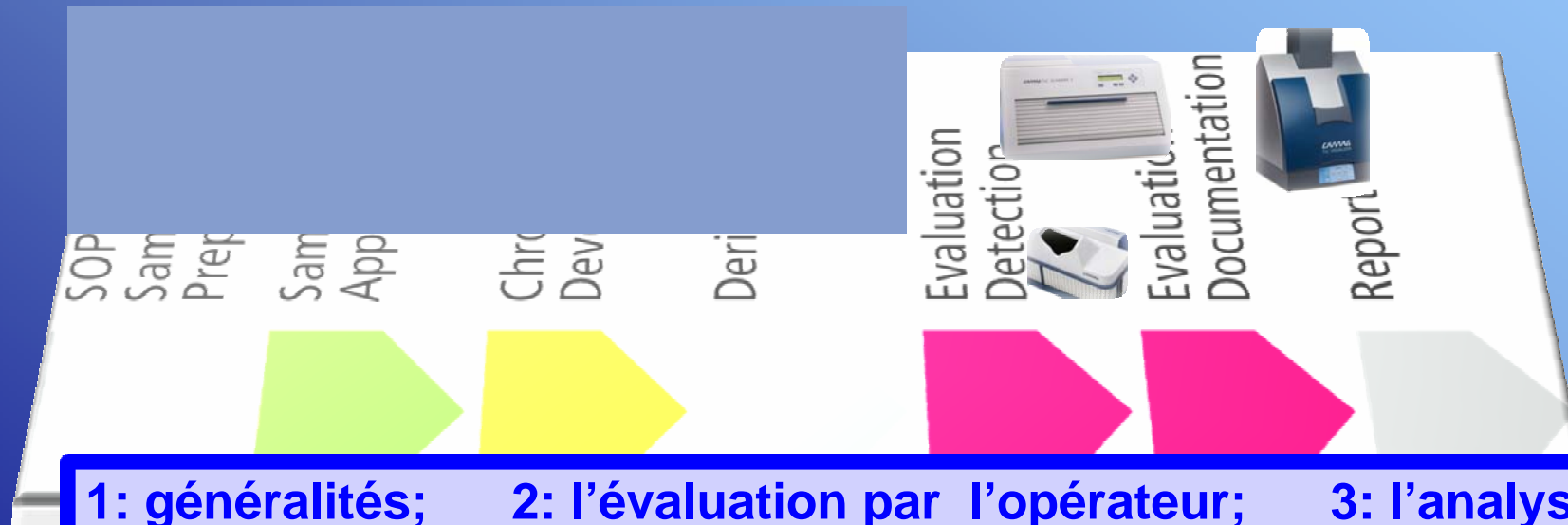
Pierre BERNARD-SAVARY pbs@chromacim.com

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

L'HPTLC est séquentielle



L'HPTLC est une méthode séquentielle, il est donc primordial de contrôler chaque étape. Cette session du 10^{ème} anniversaire va traiter de la dernière étape de la méthode qui justifie toutes les autres : l'évaluation.



1: généralités; 2: l'évaluation par l'opérateur; 3: l'analyse d'image;

4: la densitometrie en absorbance et en fluorescence; 5: la conclusion.

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

Paramètres généraux _ 1/5



L'HPTLC est une méthode de chromatographie liquide sur plaque dans laquelle l'évaluation peut se faire sur des taches (spots ou bandes) ou sur leur transformation en PICS "chromatographiques".

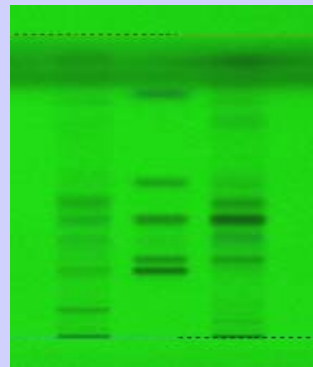
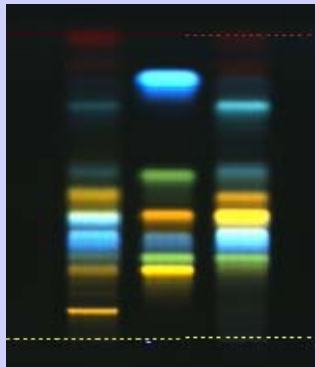


La vision des spots/bandes ou des pics répond aux mêmes critères de détection. Références : Pr Ebel Interlaken 1997, Dr Burger Lyon 2003.

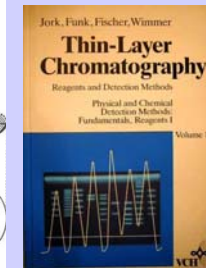
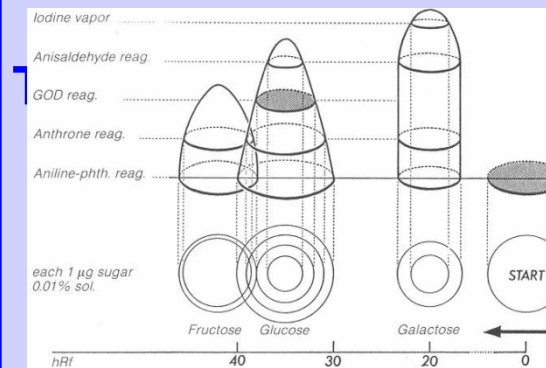
Paramètres généraux _ 2/5



L'évaluation est donc indissociable de la **détection** dont les possibilités en **HPTLC** sont particulièrement **étendues** et **complexes**. C'est en même temps la base de tout développement de méthode, optimisation et validation pour cette partie. **La molécule recherchée** mais aussi et parfois **les autres constituants**, et surtout **la matrice**, sont primordiaux.



Pics clairs sur fond sombre :
fluorescence
Pics sombres sur fond clair :
absorbance (= ext.fluo.)



La révélation doit être sélective

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

Paramètres généraux _ 3/5



Il existe différents systèmes pour évaluer les plaques.

Densitomètres



Sarstedt-Desaga CD60



Shimadzu CS930



Camag Scanner3

Scanners à plat Chromimage AR2I Bureautique



Appareils photo et caméras



Desaga



Vilbert Lourmat



Camag : Videostore, Digistore, & Visualizer

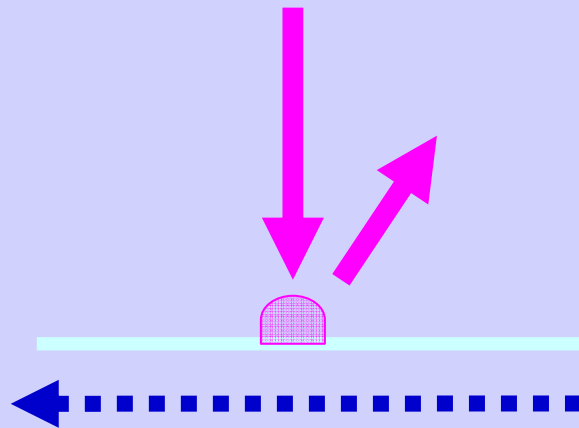


Paramètres généraux _ 4/4



Les deux modes principaux d'évaluation sont l'**absorbance** en lumière UV ou en lumière du jour, et la **fluorescence**

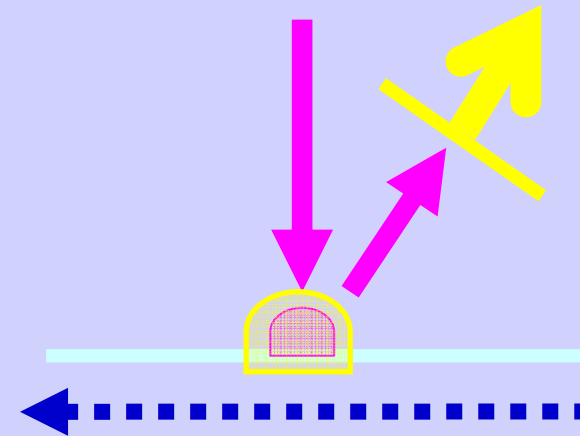
l'absorbance



En **absorbance** la mesure est 'négative', et donc ne peut **pas** être **linéaire** sauf dans les faibles concentrations de molécule sur la plaque. Il est conseillé d'utiliser des courbes de Michaelis-Menten

$$y = \frac{ax}{b+x}$$

la fluorescence

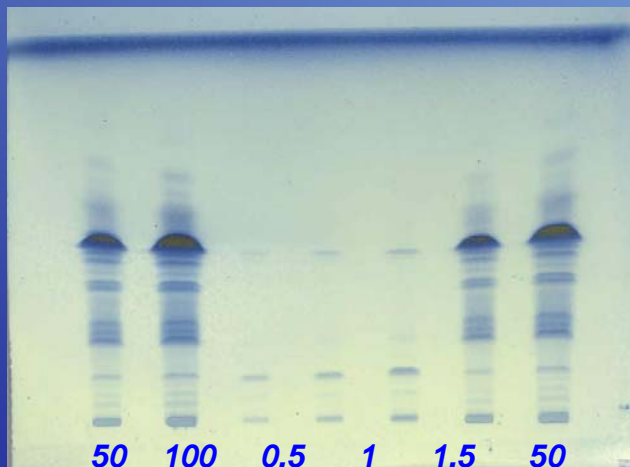


En **fluorescence**, on ne mesure que la lumière réémise au delà de la longueur d'onde du filtre. La mesure est 'positive', et donc est **linéaire** sauf dans les cas de 'quenching' (saturation). La sensibilité est très importante (pas de bruit de fd)

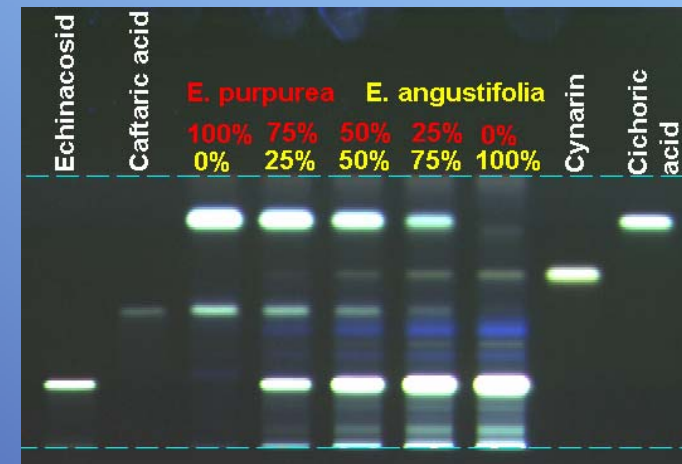
Evaluation par l'opérateur _ 1/4



Contrairement à ce que l'on pourrait croire: **l'évaluation par l'opérateur** (à l'œil et /ou sous lampe UV) répond à des critères sensiblement identiques que l'évaluation instrumentale (qualité de la séparation, bruit de fond, sélectivité, saturation,...). Il n'y a simplement pas l'objectivité de la machine, mais la subjectivité humaine, influençable.



100



L'analyse doit être basée sur une méthode robuste et un référentiel bien

encadré.

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

Evaluation par l'opérateur _ 2/4

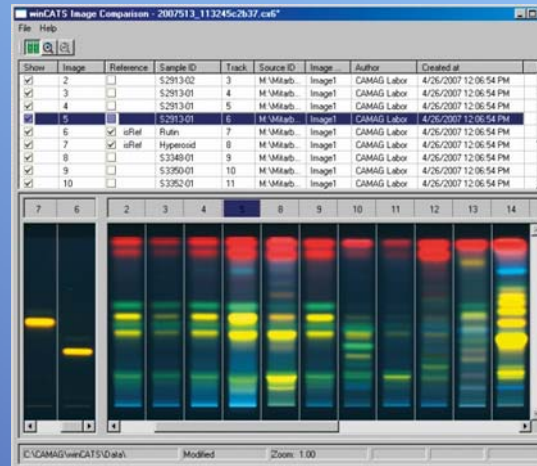
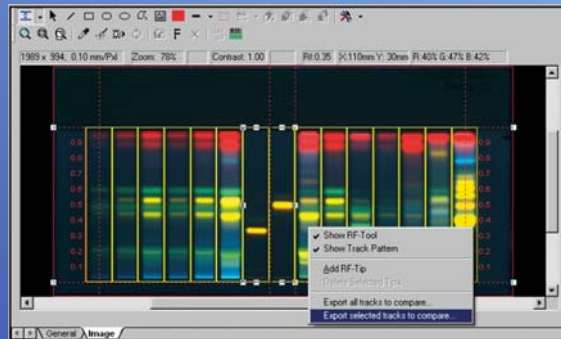


Deux choses sont particulièrement importantes :

1- Réaliser la plaque de manière à ce que **les références encadrent** ou soient à proximité immédiate de **l'échantillon** à évaluer (pour un équivalent de la calibration dynamique préconisée par Pr Ebel et possible avec le logiciel Camag dans les années 80). Une alternative est d'utiliser une acquisition d'image et un logiciel capable d'arranger les pistes les unes par rapport aux autres (comme par exemple l'option "image comparison viewer" du Visualizer Camag).

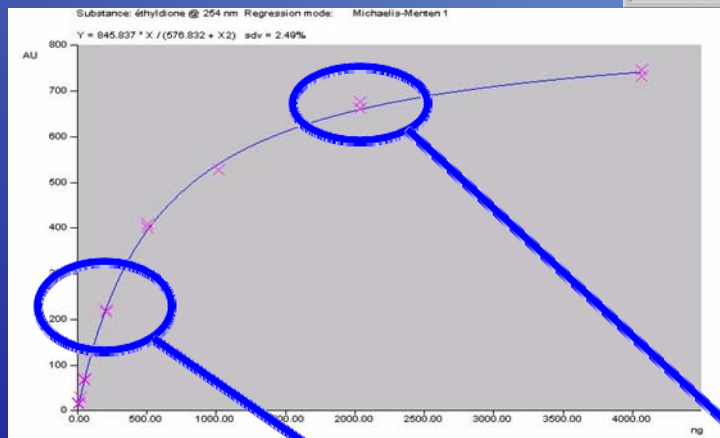
2- Se mettre à un niveau de **sensibilité** correct (**pente de la courbe** de calibration maximale, de niveau **supérieur au seuil de quantification**), ce qui dans le cas de l'œil humain est un compromis à trouver, de préférence **après validation** par une méthode objective (instrumentale).

Evaluation par l'opérateur _ 3/4



illustrations :

- 1- "image comparison viewer", option du Visualizer (et du Digistore 2) Camag
- 2- la sensibilité de l'œil et la gamme de calibration



Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

Evaluation par l'opérateur _ 4/4



En cas d'évaluation sous la lampe UV :

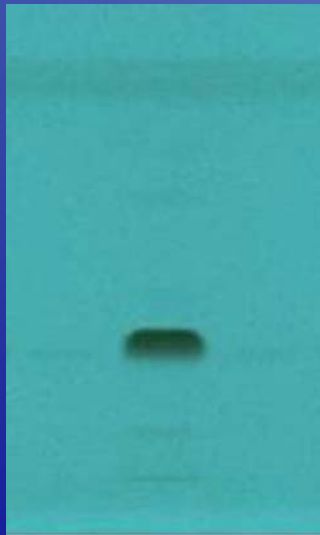
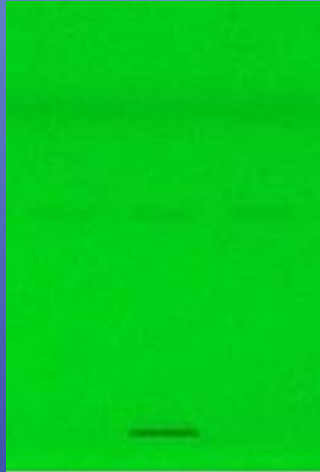
1- la qualité de l'éclairage est défini par l'intensité des tubes UV qui peut baisser, et des filtres protecteurs qui peuvent s'opacifier. Des tests existent ou peuvent être réalisés à l'aide d'une plaque sur laquelle on a déposé une gamme (de inférieur à la limite de détection, à la limite de quantification). Camag commercialise des plaques certifiées par une SOP (et valables 15 j.).

2- On doit faire attention à l'enceinte d'éclairage : étanchéité à la lumière et protection de l'opérateur .

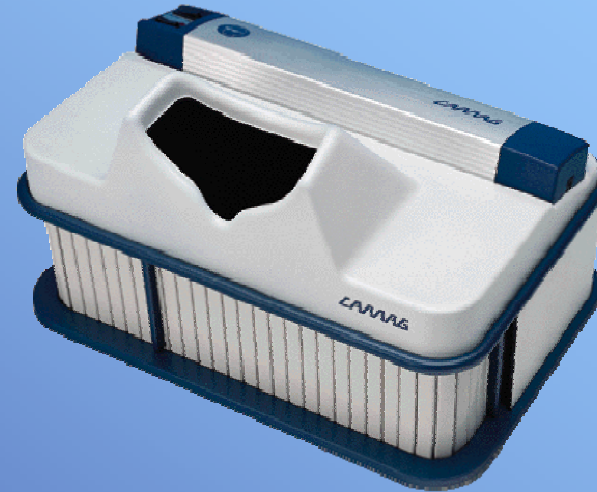
Nota : les **spectres** de longueurs d'ondes des lampes à **254 & 366 nm** sont larges et sont des **données physiques**; il est donc inutile de les tester .

Les indicateurs de fluorescence : 254 (vert) et 254 S (bleu) sont indispensables pour voir les substances qui absorbent à 254nm et vont donc éteindre la fluorescence de l'indicateur.

Evaluation par l'opérateur _ 3/4



*Indicateurs
UV 254 et
254 s
(sous
lampe UV
254 nm)*



*enceinte UV
Camag (il est
aussi possible
d'utiliser le
Visualizer)*

*Nota: il existe des plaques
spéciales enrichies en indicateur
de fluorescence à 254 nanomètres*

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

Quantification d'image_ 1/4



Il est possible de transformer une image provenant d'un appareil photo, d'un scanner à plat (bureautique) ou d'une caméra afin d'obtenir un chromatogramme correspondant aux spots (bandes) des pistes de la plaque.

1- on est tributaire avant tout de la gestion et de la qualité des images obtenues : BPL/BPF, reproductibilité, sensibilité (LOQ).

2- on est limité à la lumière du jour et éventuellement aux deux longueurs d'onde 254nm et 366nm. La fluorescence est toujours un problème à cause des faibles intensités lumineuses (temps d'acquisition, couleurs)

3- le mode de transformation en chromatogramme laisse en général un large choix à l'utilisateur, d'où l'intérêt d'un protocole identique pour chaque analyse (standardisé).

4- le lien entre le chromatogramme et la quantité de molécule sur la plaque est sans lien direct, ce qui n'empêche pas de valider la méthode mais pose un problème de fond.

Quantification d'image_ 2/4



Il existe une multitude de systèmes sur le marché que l'on peut classer en 3 différentes catégories avec leurs limites:

1- appareil digital + lampe UV : attention à l'étanchéité lumineuse, à la focalisation (auto/manuel), au temps d'acquisition, et à la sensibilité (en fluorescence).

2- scanners à plat type bureautique : limités à la lumière du jour sauf le "Chromimage" qui est équipé d'une lampe UV 254nm et d'une plaque de quartz. Attention aux révélateurs et à la sensibilité. Les logiciels ne sont en général pas adaptés sauf Galaxy (Varian).

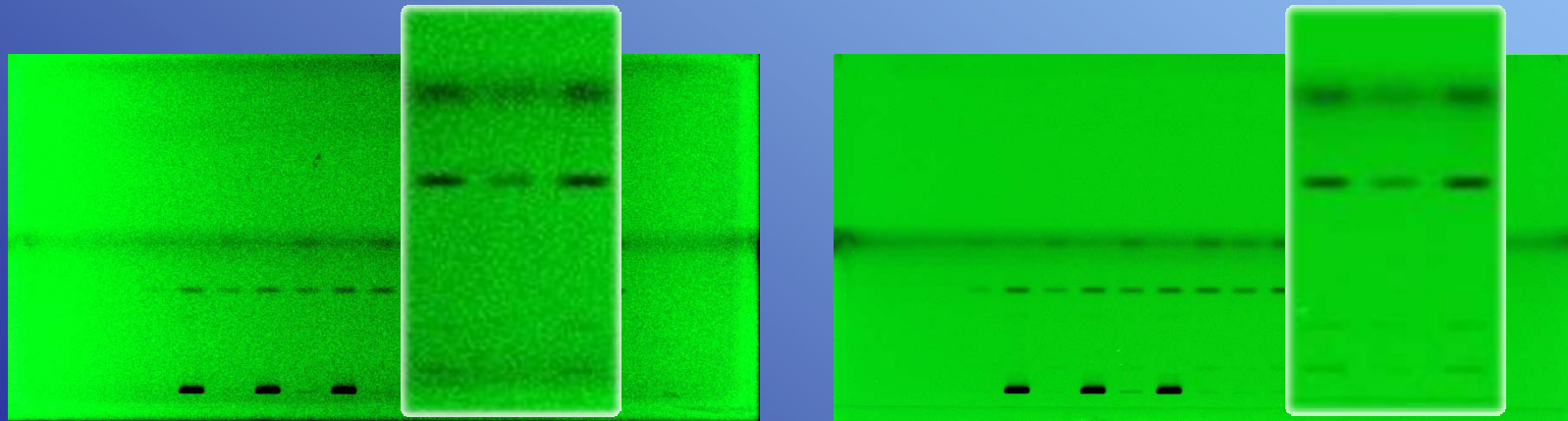
3- appareils avec caméra ont suivi l'évolution technologique (prix en baisse et performance en hausse). Ce sont les seuls systèmes reproductibles et sensibles. Le contrôle du format d'image peut permettre d'avoir un système vraiment BPL/BPF.

Quantification d'image_ 3/4



Le système d'acquisition est important :

- caractéristiques de la caméra (linéarité,...)
- focale fixe (netteté contrôlée)
- gestion du bruit de fond (homogénéité et pour le contraste)



Exemple d'une photo sous 254 nm, avant correction et après correction du bruit de fond : non seulement la reproductibilité, mais la sensibilité est accrue.

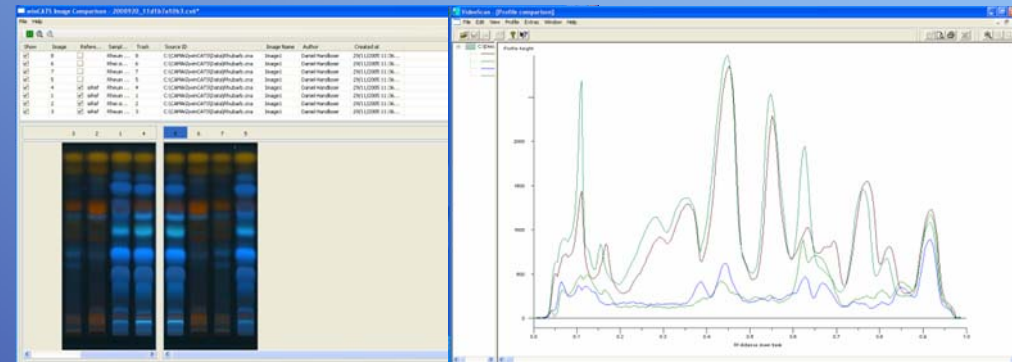
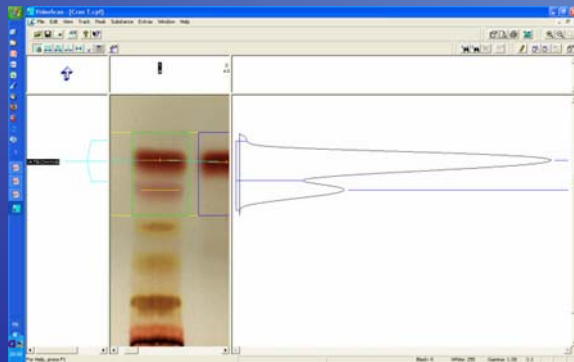
Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

Quantification d'image_ 4/4



Le logiciel de transformation est en général séparé et travaille sur des images importées qui doivent être sécurisées si on veut conserver un label BPL/BPF.

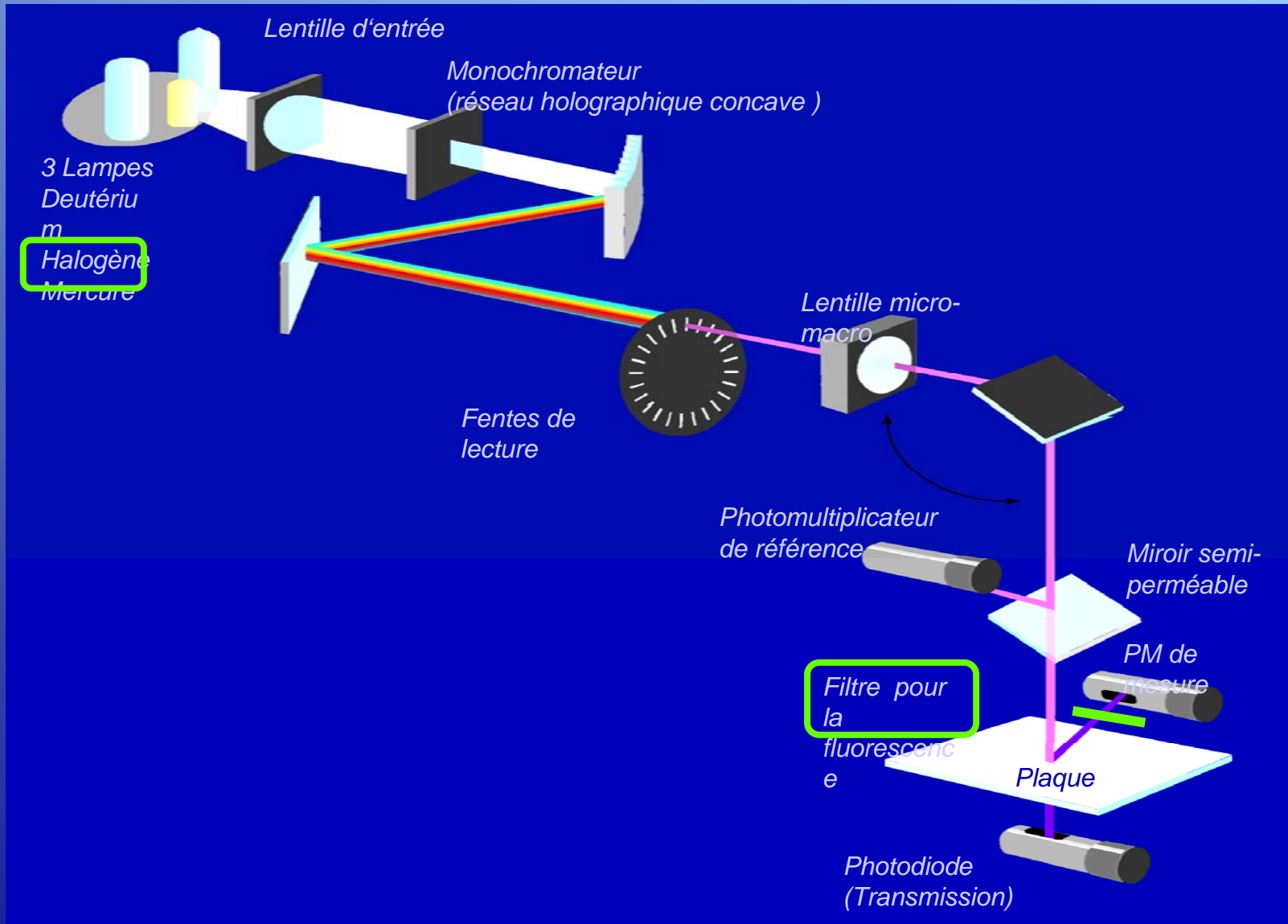
On ne peut améliorer la qualité d'une image, et on doit se contenter de quelques 5 % de RSD, en deçà des possibilités d'une plaque d'HPTLC lue au densitomètre. Ce peut être par contre l'occasion d'utiliser une comparaison de profils pour l'identification.



Exemple d'une représentation d'une piste après révélation et de son chromatogramme

Comparaison des pistes et des chromatogrammes correspondants (quatre espèces de rhubarbe)

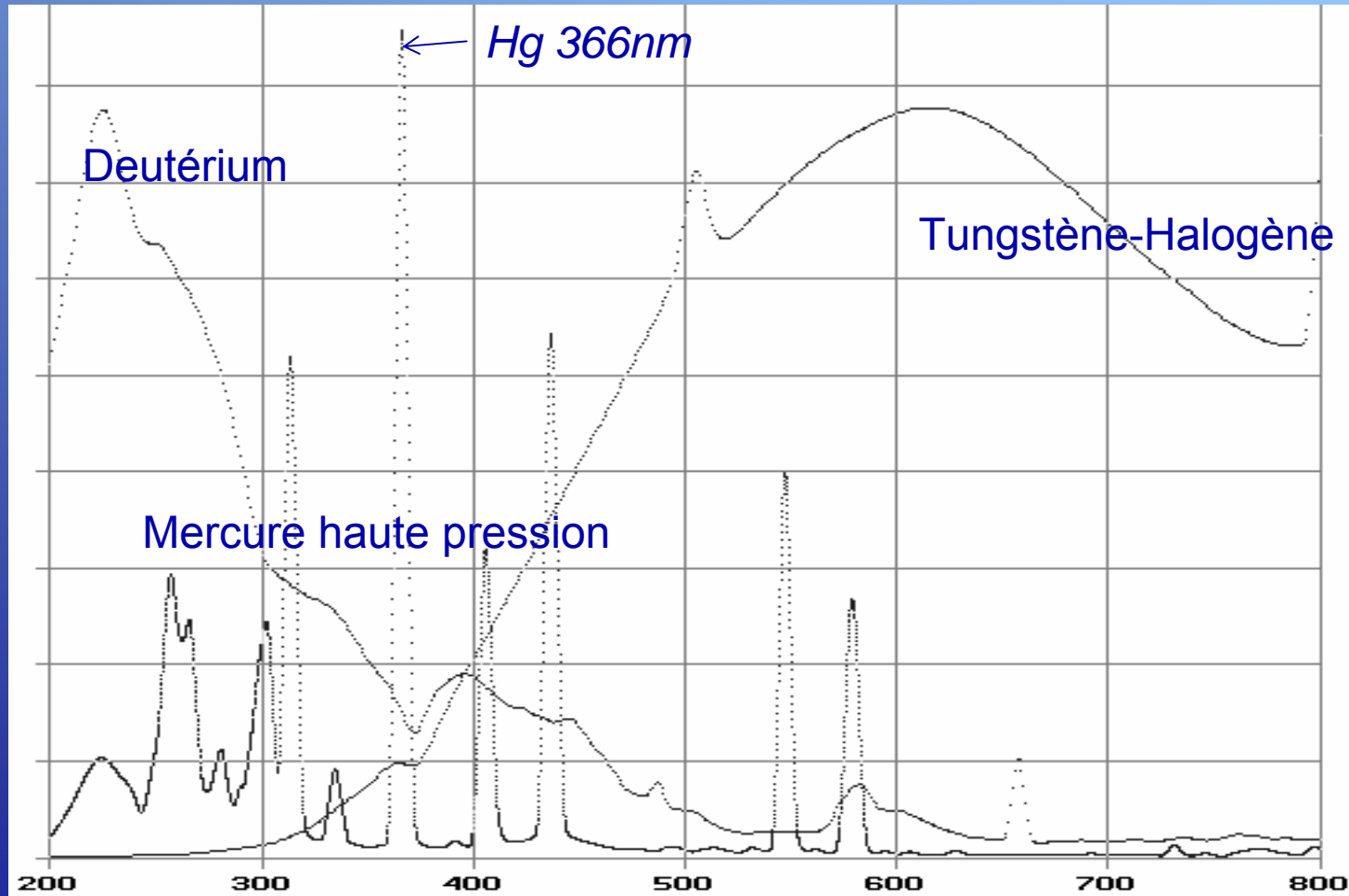
Densitométrie_ Schéma optique



Densitométrie_ Longueurs d'ondes des lampes



Intensité normalisée 100%



Longueurs d'ondes en
nanomètres

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

Densitométrie_ réglages optiques



20081021-001.cna*

Analysis
Stationary phase
Definitions - Quantitative
Detection - Scanner 3
254 nm
Evaluation - Quantitative

Scan settings
Slit dimension : 4.00 x 0.30 mm, Micro
Optimize optical system for maximum : Light
Scanning speed : 20 mm/s
Data resolution : 100 µm/step

Measurement	
Wavelength	254 nm
Lamp	D2 & W
Measurement type	Remission
Measurement mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
Y-position for θ adjust	5.0 mm
Track # for θ adjust	1
Track start for quick scan	Automatic
Track end for quick scan	Automatic
Track # for quick scan	Automatic
Analog offset	10 %
Sensitivity	Automatic

Sc3 General \ Sequence \ Scan - 1WL \ Integration /

Detection Analysis ready 00:00:00

Mesure en
absorbance

20081021-001.cna*

Analysis
Stationary phase
Definitions - Quantitative
Detection - Scanner 3
254 nm
Evaluation - Quantitative

Scan settings
Slit dimension : 4.00 x 0.30 mm, Micro
Optimize optical system for maximum : Light
Scanning speed : 20 mm/s
Data resolution : 100 µm/step

Measurement	
Wavelength	254 nm
Lamp	D2 & W
Measurement type	Remission
Measurement mode	Fluorescence
Optical filter	K400
Detector mode	none
Y-position for θ adjust	K320
Track # for θ adjust	K400
Track start for quick scan	K540
Track end for quick scan	U1:
Track # for quick scan	U2:
Track end for quick scan	U3:
Track # for quick scan	Automatic
Analog offset	10 %
Sensitivity	Automatic

Sc3 General \ Sequence \ Scan - 1WL \ Integration /

Detection Analysis ready 00:00:00

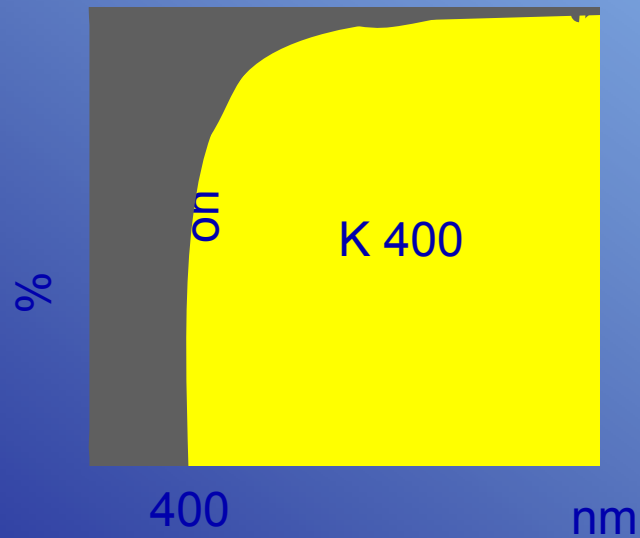
Mesure en
fluorescence

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

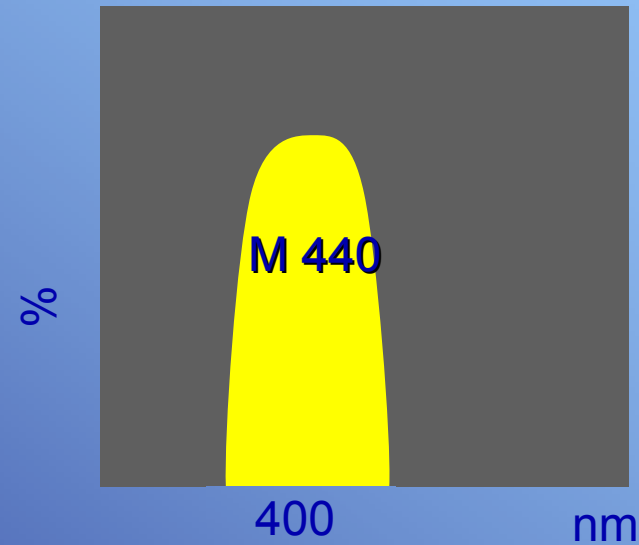
Densitométrie_ choix des filtres en fluorescence



Filtre coupe-bas



Filtre à bande étroite



Choix filtres

K 320 nm
K 340 nm
K 400 nm
K 460 nm
K 500 nm
K 540 nm
K 560 nm
M 590 nm
M 360 nm
M 440 nm

Types de
filtres

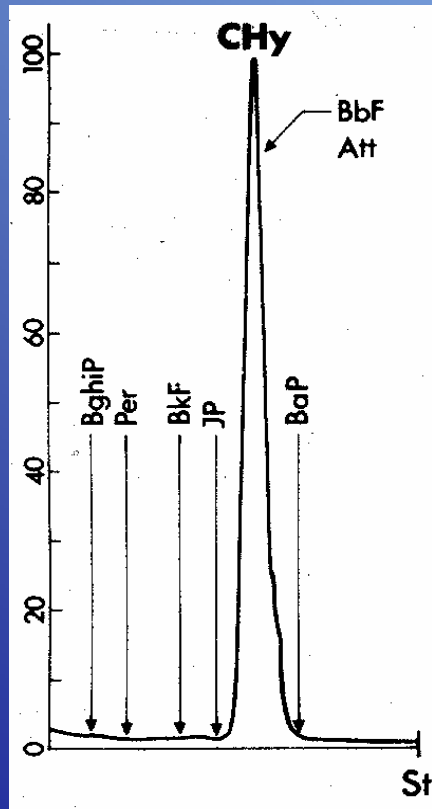
Par défaut et à priori : WL 366 nm Hg +
K 400

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

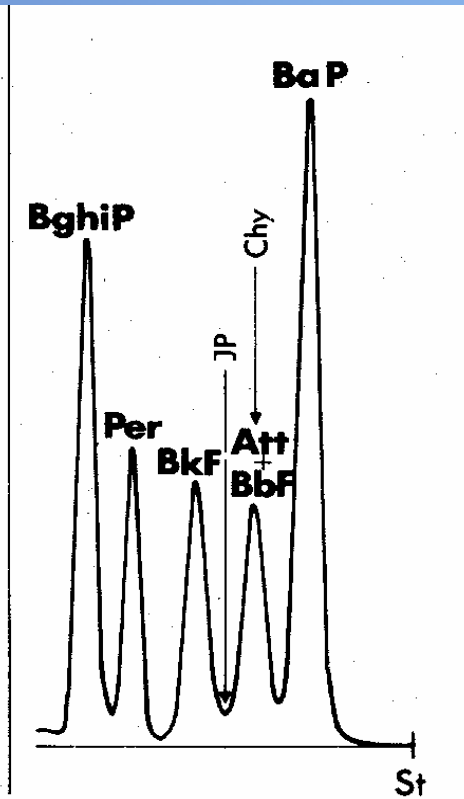
Densitométrie_ *filtres en fluorescence: exemple*



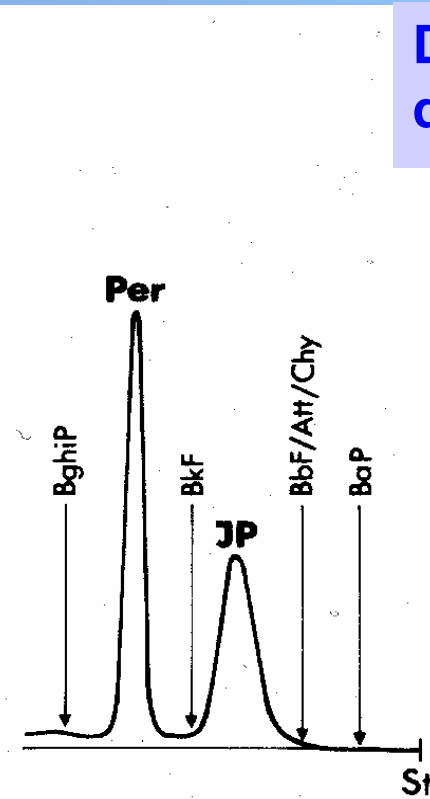
266/M365 nm



365/M436 nm



436/M578 nm



Dosage
des HPA

Jork, H., Funk, W., Fischer, W.,
Wimmer, H.: Dünnschicht-
Chromatographie, Band 1a/b, VCH,
Weinheim, 1989/93.

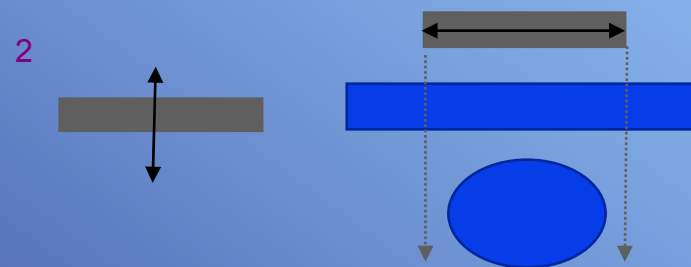
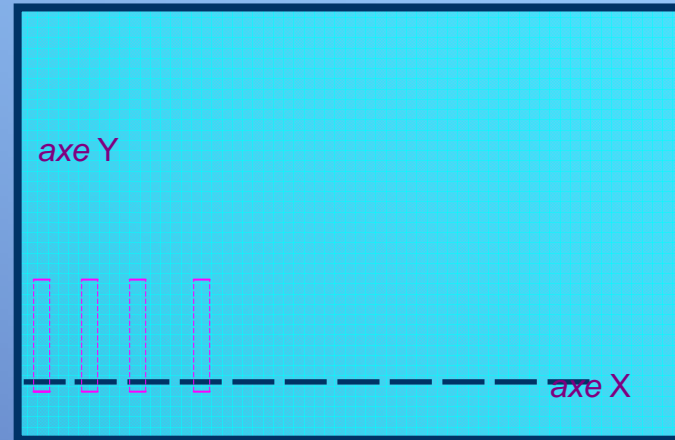
Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

Densitométrie_ *taille & position fente de lecture*



Éléments garantissant une lecture correcte :
Positionnement et déplacement exacts (par rapport aux pistes à mesurer sur la plaque) = origine x, nombre de pistes, et espacement.

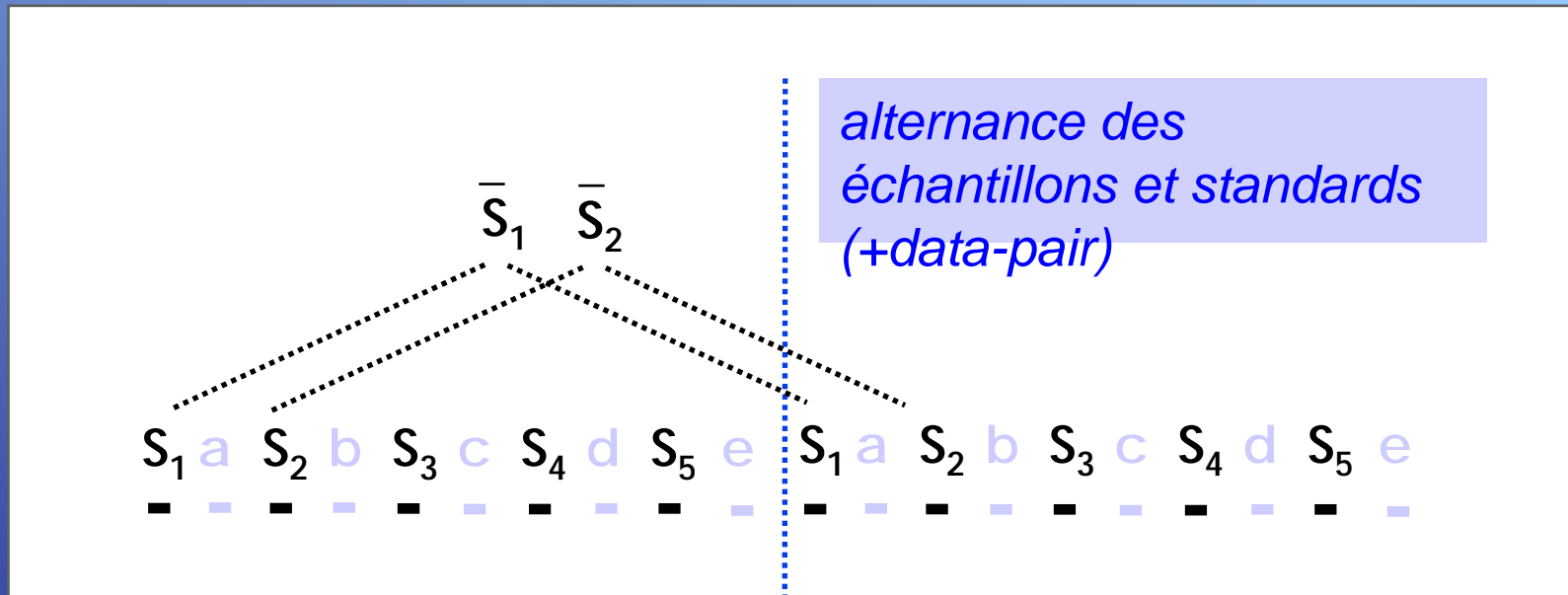
La 1^{ère} piste doit être visible



Taille de la fente de lecture
(plus fine=résolution,
plus épaisse = sensibilité)
120% en lecture de spot

80% en lecture de bande

Densitométrie_ *positionnement et calibration*



Compenser les **irrégularités de réponse** de la plaque

Précision et exactitude (nombre standards et éch.)

Stratégie : **gamme** de travail (surtout en absorbance non-linéaire) et **limite**

quantification (Eurachem = sdv% sur 6 dépôts)

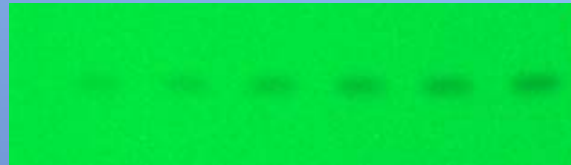
Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

HPTLC-SM Quantitative_DART

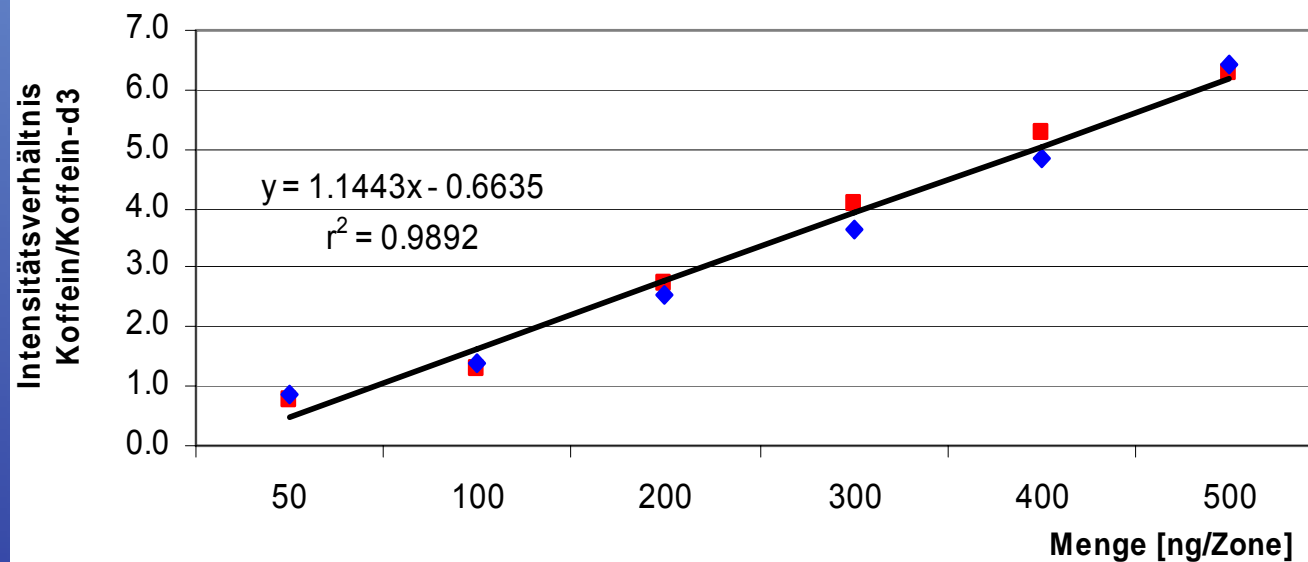


HPTLC-DART-SIVA-

TOF



Plaque
sous UV à
254nm



Koffein (m/z 195 [M+H]⁺)
Koffein-d3 (m/z 198 [M+H]⁺)

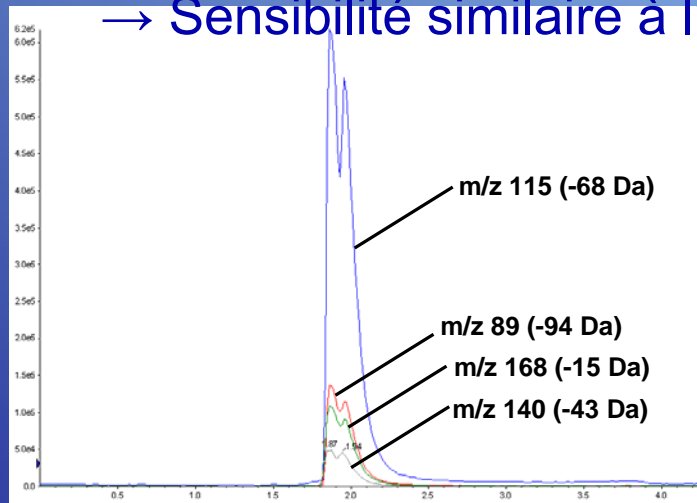
Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

HPTLC-SM Quantitative_ESI-MS

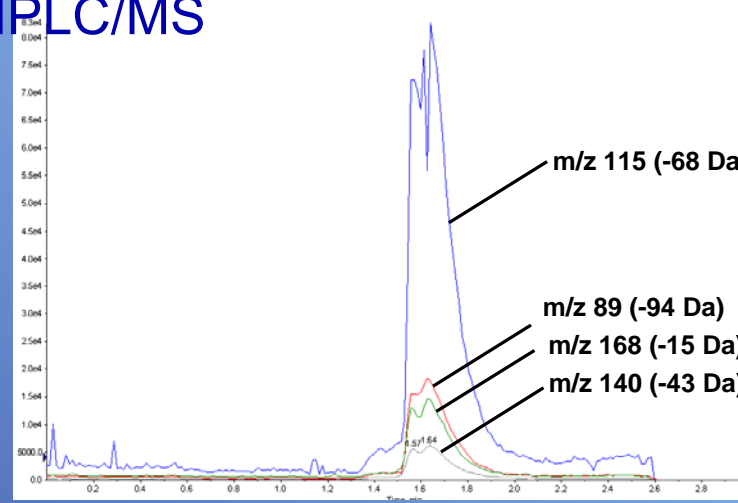


→ LOQ meilleure que 20 pg/Zone Harman (S/N 20)

→ Sensibilité similaire à l' HPLC/MS



200 pg/Zone Harman



20 pg/Zone Harman

Limite de détection et quantification au niveau du picogramme

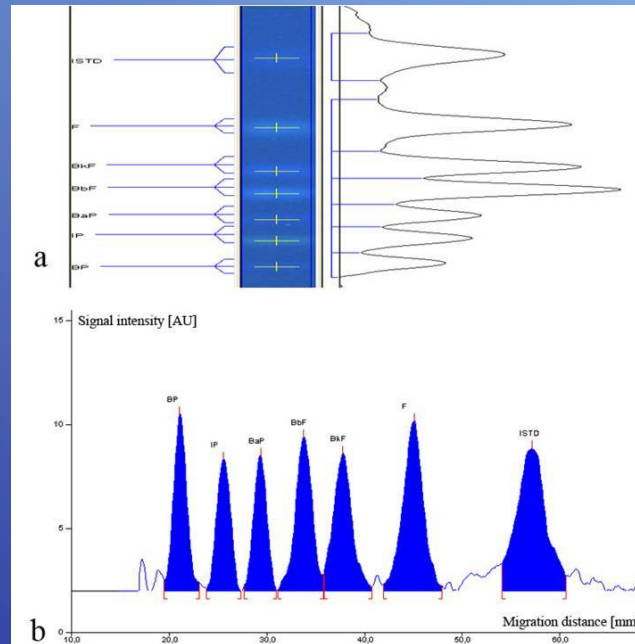
U. Jautz, G. Morlock, J Chromatogr A 58 (2006) 244-250

Club de CCM_ 10ème année _Octobre 2008

Comparaison sur des exemples



Comparaison densitométrie et quantification d'image en fluorescence sur des HPA (CDS 98).



standards les plus faibles (LOQ)

PAH	Calibration range (pg/band)	Linearity* obtained by			
		TLC Scanner 3		DigiStore 2/VideoScan	
		Equation	%RS	Equation	%RS
FLT	290 - 870	$y = 0.025 x +$	$D_{3.3}$	$y = 1.84 x +$	$D_{3.5}$
BkF	95 - 285	$y = 0.083 x -$	2.8	$y = 6.13 x +$	2.4
BbF	108 - 324	$y = 0.092 x -$	3.0	$y = 6.91 x +$	2.0
BaP	51 - 153	$y = 0.163 x -$	3.5	$y = 7.64 x + 27$	3.1
IcP	110 - 330	$y = 0.068 x - 1.18$	6.3	$y = 2.00 x +$	3.0
BgP	200 - 600	$y = 0.046 x -$	4.8	$y = 1.72 x + 46$	2.5

0.896

Tableau de résultats

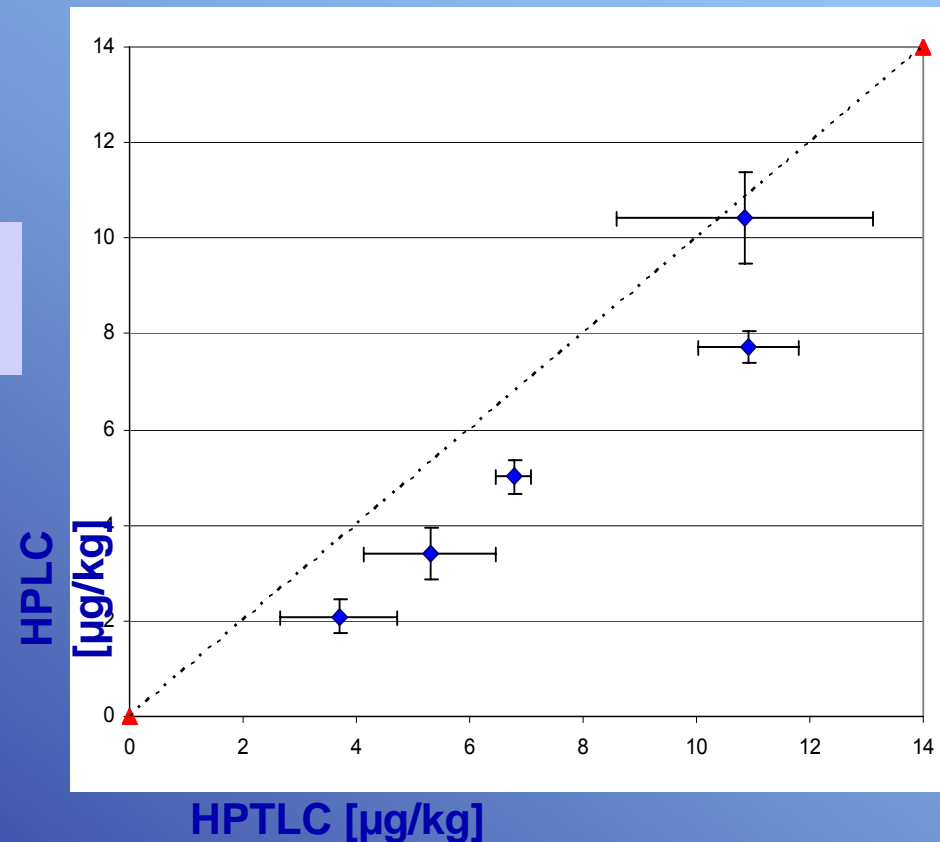
Club de CCM_ 10ème année _Octobre 2008

Comparaison sur des exemples



Comparaison
HPLC et
HPTLC

*Amines
cancérigènes dans
la viande grillée*



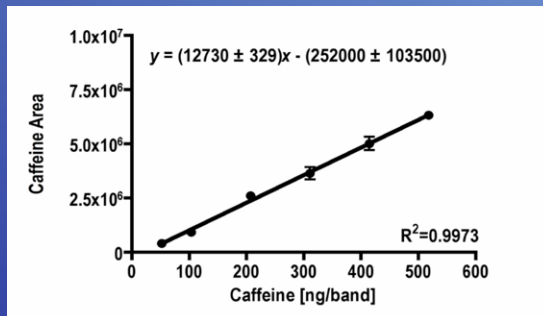
*U. Jautz, M. Gibis, G.
Morlock, J. Agric. Food
Chem. 56 (2008) 4311-
4319*

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

Comparaison sur des exemples



Comparaison densitométrie UV et ESI-SM



Gamme sans standard interne en ESI-SM

Dosage de caféine dans un comprimé et dans une boisson énergétique.

Sample	Pharmaceutical Mean ± SD (mg/tablet)	Energy drink Mean ± SD (mg/100 mL)
HPTLC/ESI-MS RSD (% , n = 6)	102.09 ± 5.76 (5.6)	32.91 ± 1.60 (4.9)
HPTLC/UV RSD (% , n = 5)	101.98 ± 2.30 (2.3)	33.71 ± 0.96 (2.8)
Label	100	32

H. Luftmann, M. Aranda, G. Morlock, Rapid Commun Mass Spectrom 21 (2007) 3772

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008

Conclusion : méthode !



Dans le mode d'évaluation à l'œil, comme pour les modes d'évaluation à l'aide d'appareillage, il faut suivre une **stratégie** de mise au point qui doit aboutir à une méthode valide (c'est-à-dire répondant exactement à l'évaluation que l'on doit réaliser) :

- recherche de la **détection sélective** (très nombreuses **possibilités**, en particulier **en fluorescence**)
 - étude du **seuil de quantification** (Eurachem_sdv%) et de la gamme de sensibilité,
 - **densitométrie sur HPTLC** d'un aliquote de dépôt en bande si l'on parle de **dosage**,
 - pour le dosage d'impuretés la densitométrie est également préférable,
 - **évaluation à l'œil** ou sur photo pour un **essai limite** d'impuretés.
- Il sera toujours préférable de "perdre" du temps à réaliser quelques

tests de validité, même si l'on est pas astreint à une validation formelle.

Bibliographie

www.hptlc.com
www.clubdeccm.com
www.camag.com
www.chromacim.com

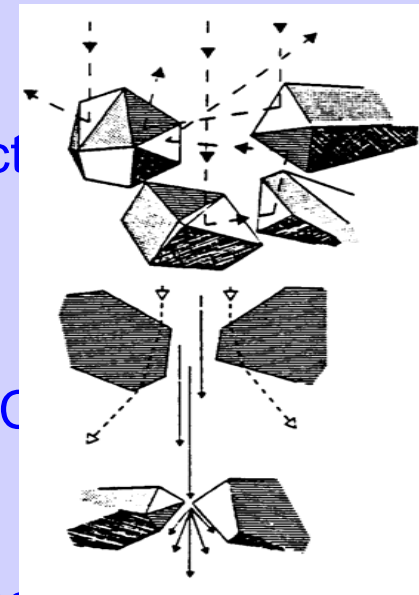


- **Pr S.Ebel** pour l'aspect **quantitatif** et relatif aux **spectres** sur la plaque. En particulier ce qui concerne les modes de calibration et la théorie sur la quantification sur plaque.

- **Dr V.Cebolla** pour tout ce qui concerne la détection en fluorescence; et les possibilités de rendre les composés fluorescents grâce à des révélations.

- **Pr G.Morlock** pour tout ce qui concerne l'HPTLC en particulier la quantification en **HPTLC-SM**

- **Dr E.Reich** pour tout ce qui concerne les méthodes d'identification des plantes par **fingerprint HPTLC**, entre autres, et son fameux "**HPTLC for the analysis of medicinal plants**".



Merci de votre attention !

Club de CCM_ 10ème
année _Octobre 2008