



Rappels et vue d'ensemble de la détection sur plaque

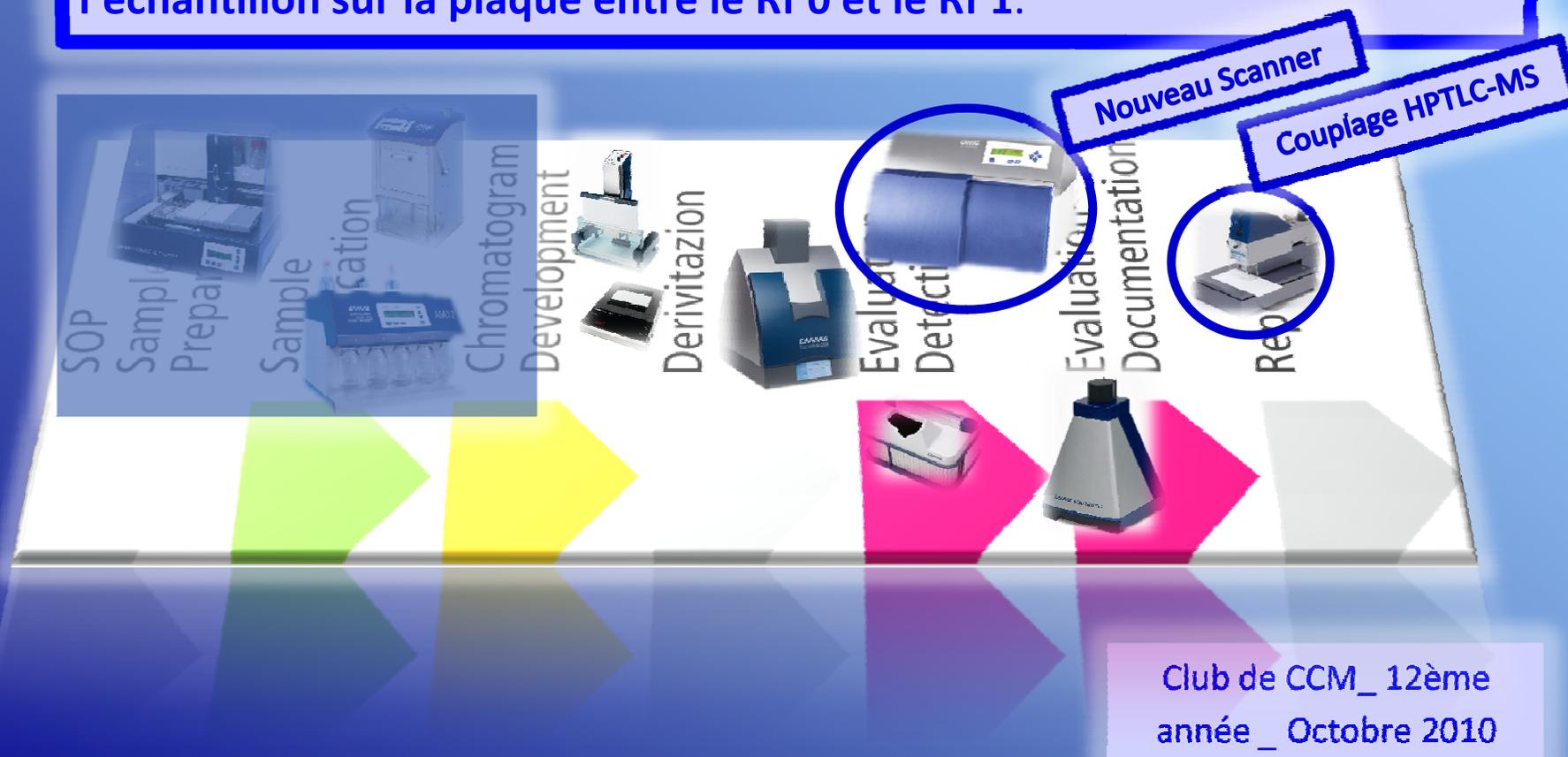
Pierre BERNARD-SAVARY pbs@chromacim.com

Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

L'HPTLC est séquentielle

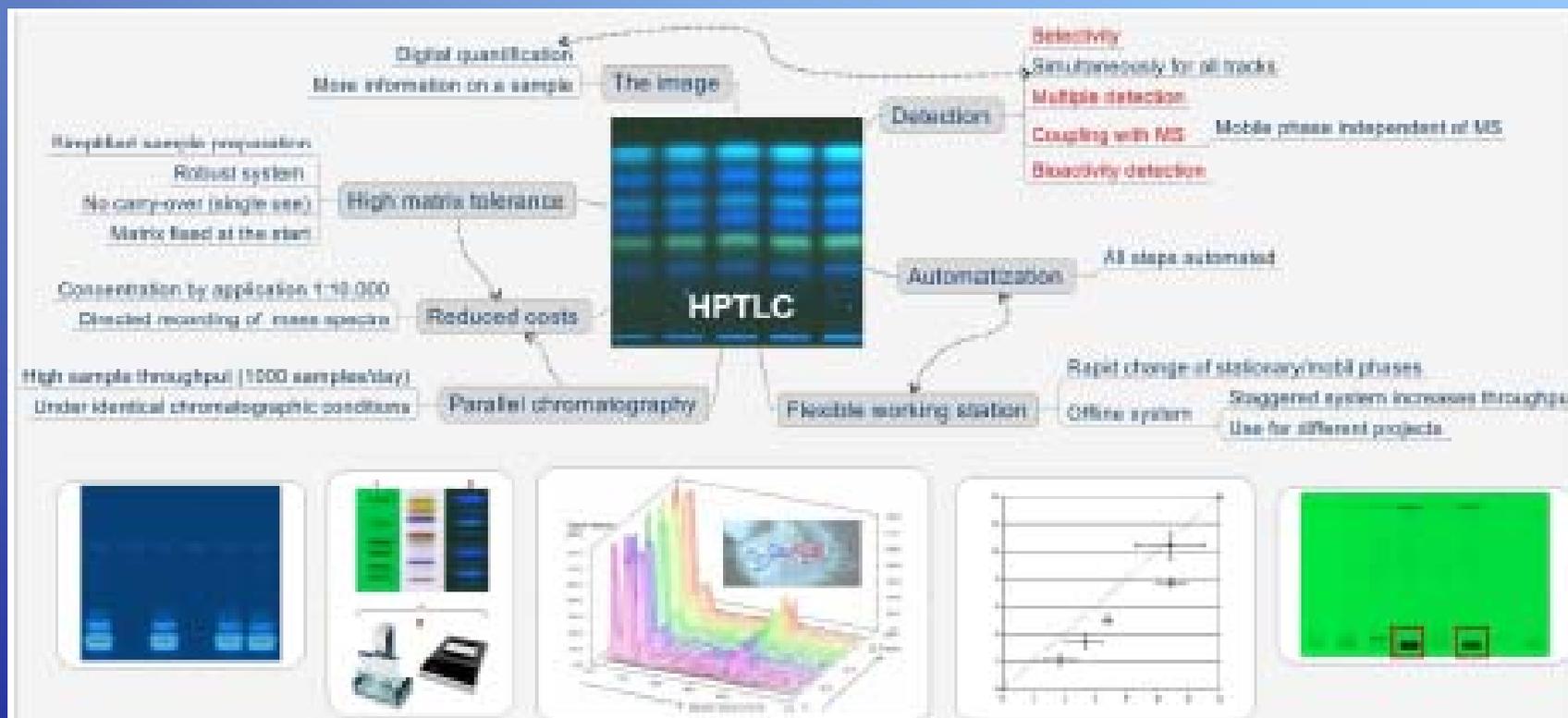


L'HPTLC est une méthode séquentielle, chaque étape est donc indépendante. Ceci permet **une extrême souplesse de détection** des constituants, connus ou inconnus séparés ou non, mais présents dans l'échantillon sur la plaque entre le Rf 0 et le Rf 1.



Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

La souplesse de détection est une force en CCM-HPTLC



La détection d'une substance

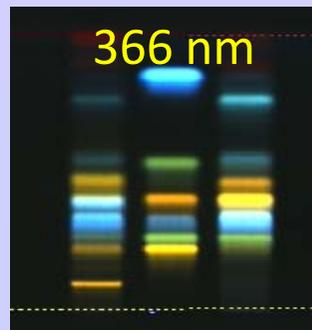


Plusieurs cas de figure sont possibles :

L'absorbance visible ou pas (UV), la fluorescence (cas favorables).

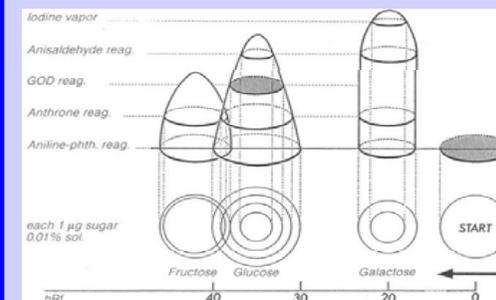
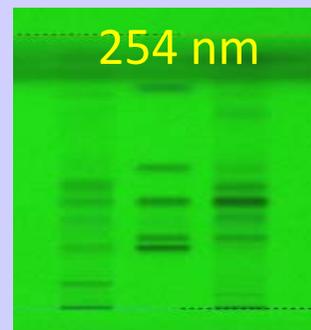
Sinon il sera nécessaire de révéler la substance ...

Les choix sont multiples, donc une étude est nécessaire (ex cholestérol)

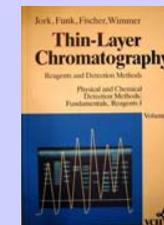


Pics clairs sur fond sombre :
fluorescence

Pics sombres sur fond clair :
absorbance (extinction de la
fluorescence de l'indicateur à
254nm)



The book



La révélation doit être **sélective et surtout adaptée à l'objectif** (sensibilité, matrice, vol. dépôt).

Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

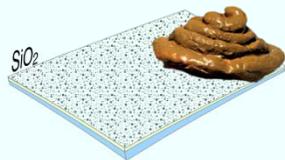
Le rapport signal/bruit



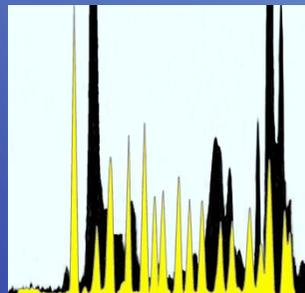
Ce n'est pas en chargeant la plaque que l'on est plus sensible, mais **l'ensemble des paramètres** doivent être évalués, et en particulier la propreté (plaque & solvants) et **le mode de détection**.



A dog's muck ...



and how to prevent it!



Plus le niveau d'exigence est élevé, plus ces critères sont primordiaux, pour la sensibilité, la quantification, (AMD, densitométrie).

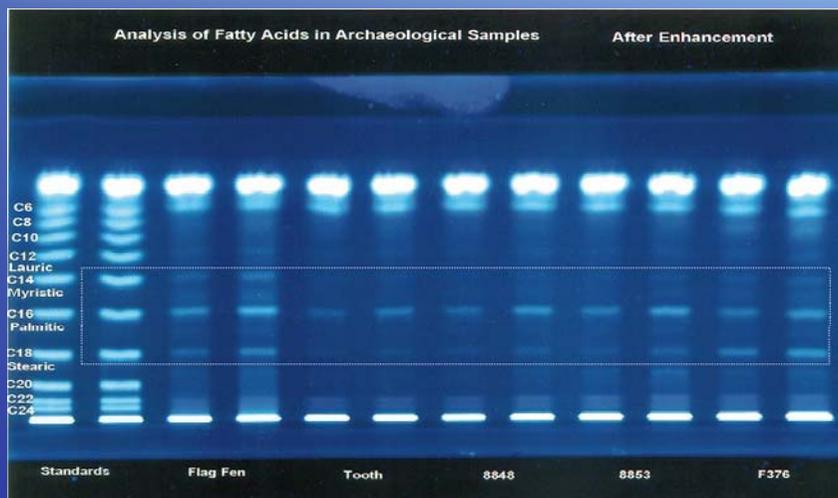
Pr S. Ebel Interlaken 1997, Dr K. Burger Lyon 2003

Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

Quelques illustrations



Echantillons prélevés sur des fouilles archéologiques pour déterminer l'alimentation de l'époque grâce aux profils d'acides gras



Échantillons dont on élimine la matrice au cours de la migration, pour une meilleure sensibilité.

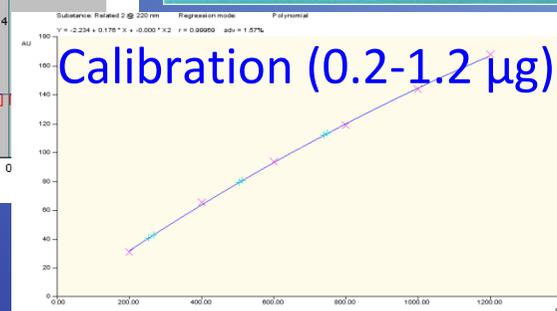
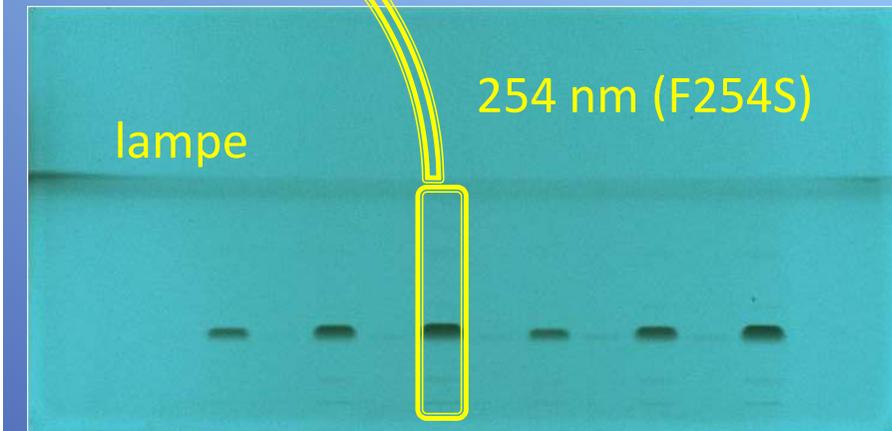
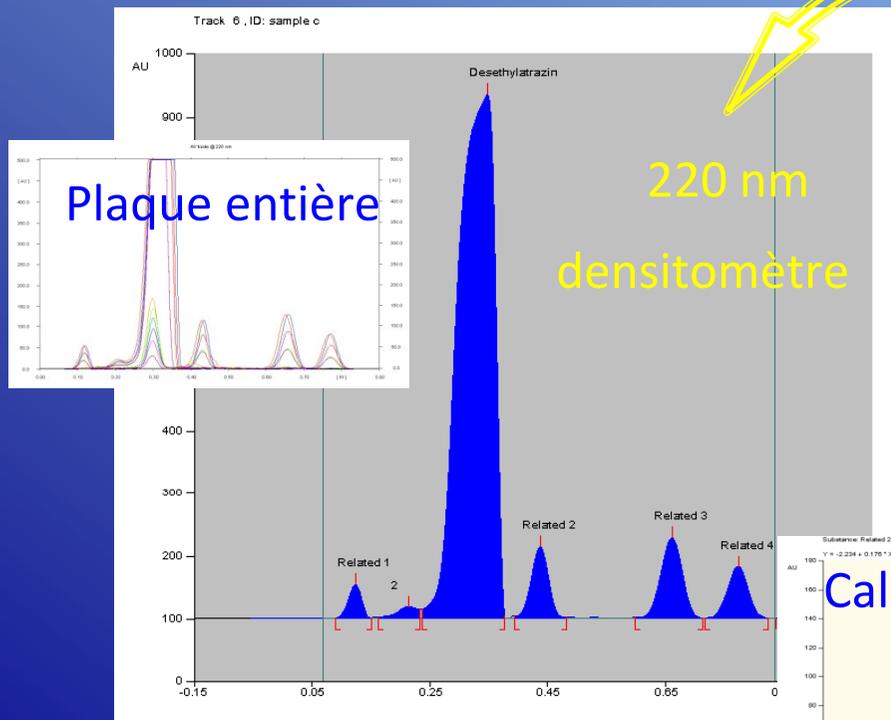
Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

Quelques illustrations



Evaluation d'impuretés dans un produit de protection des plantes (desethylatrazine).

Selon la longueur d'onde d'évaluation, les résultats sont très différents



Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

Que peut-on faire ? Comment ça marche ?



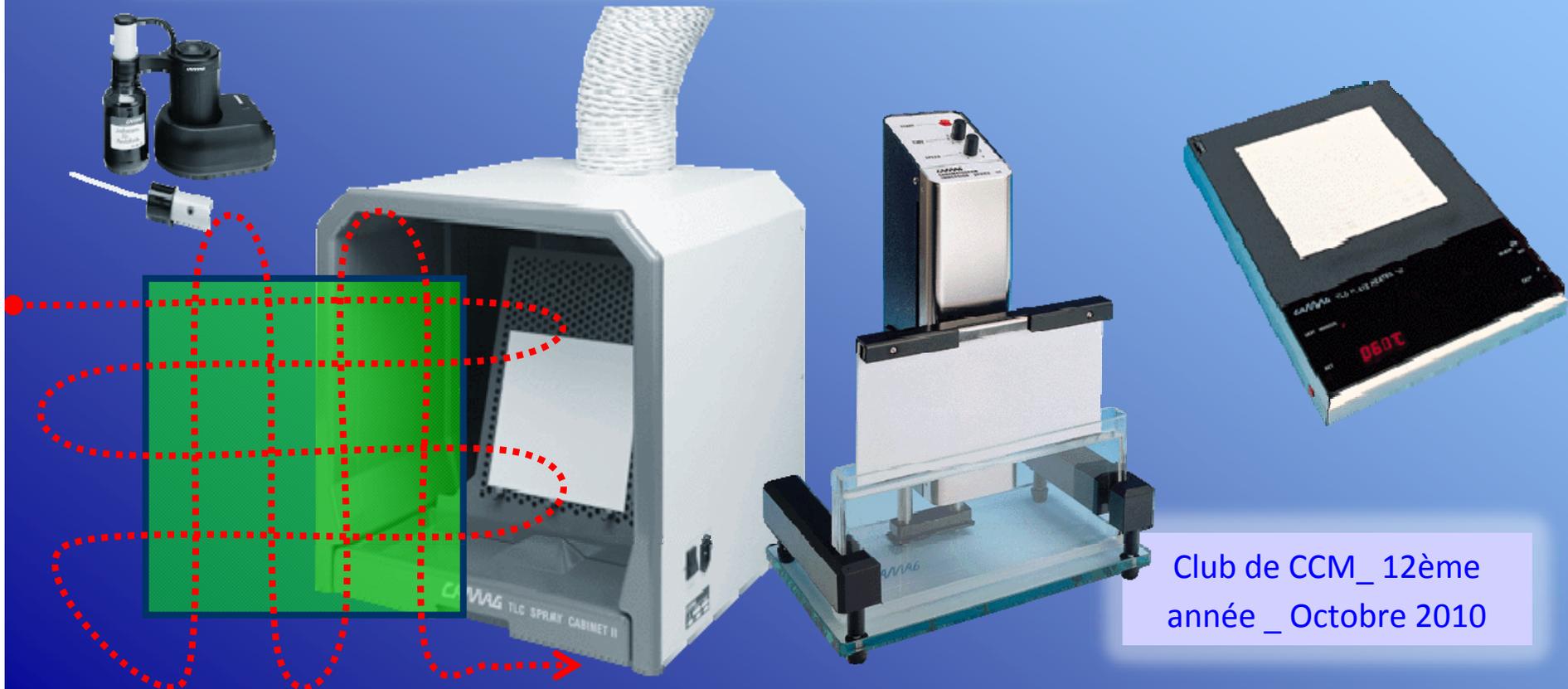
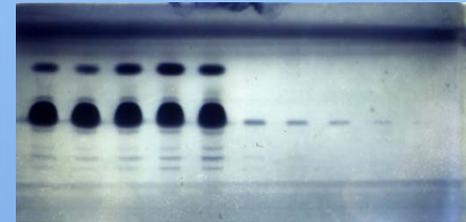
1- si nécessaire : révélation chimique (ou biologique ...)

2- détections classiques (lampe UV 254 ou 366 nm, ou spectres UV et multi longueurs d'ondes par densitométrie)

3- couplages MS, IR, Raman,...

Révélation pré- ou post-chromatographique

L'immersion permet d'obtenir un fond plus homogène, surtout en fluorescence.

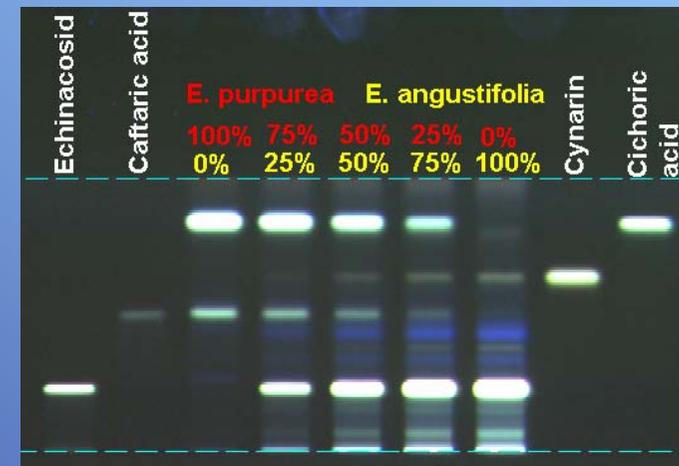
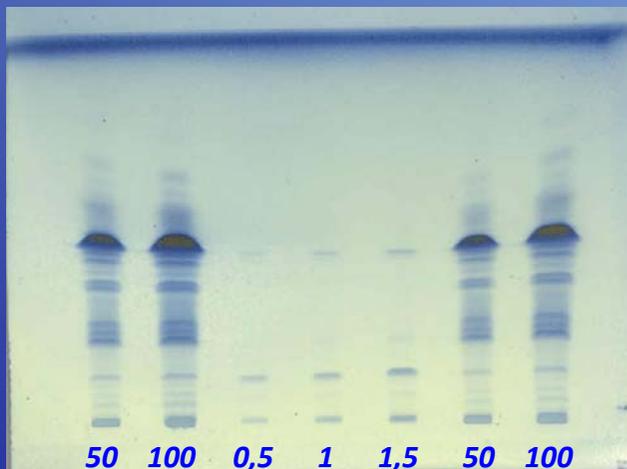


Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

Evaluation par l'opérateur



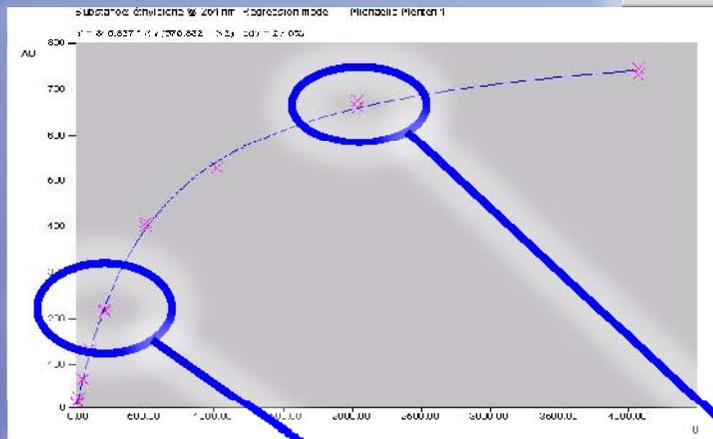
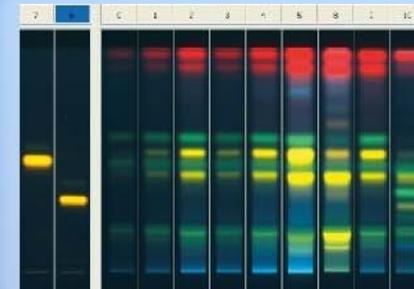
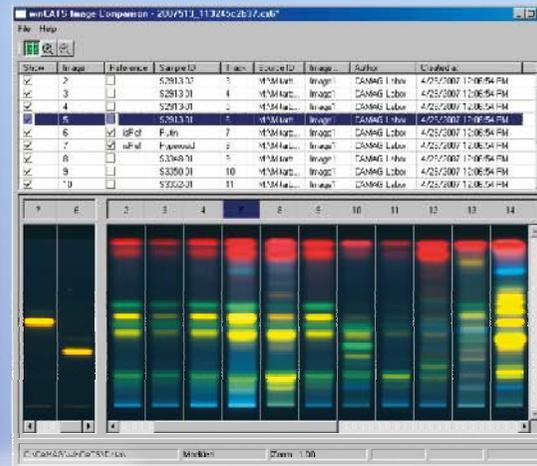
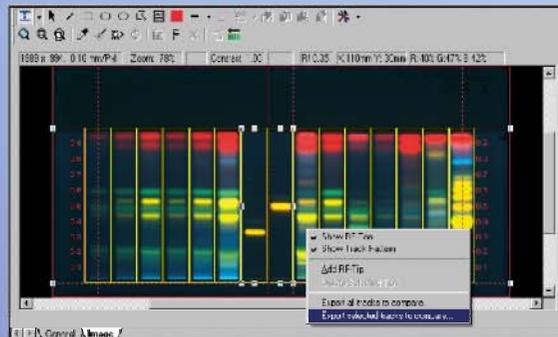
Contrairement à ce que l'on pourrait croire: **l'évaluation par l'opérateur** (à l'œil et /ou sous lampe UV) répond à des critères sensiblement identiques que l'évaluation instrumentale (qualité de la séparation, bruit de fond, sélectivité, saturation,...). Il n'y a simplement pas l'objectivité de la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



Attention à l'encadrement et/ou à la proximité des valeurs à comparer et/ou à évaluer

Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

Evaluation par l'opérateur



illustrations :

1- "image comparison viewer", option du Visualizer (et du Digistore 2) Camag

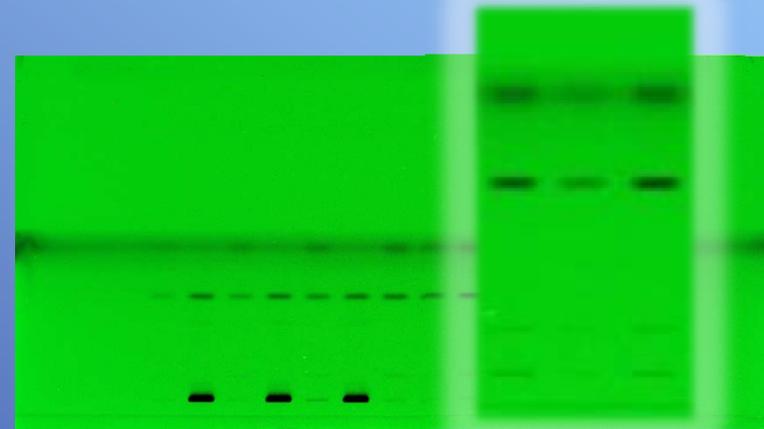
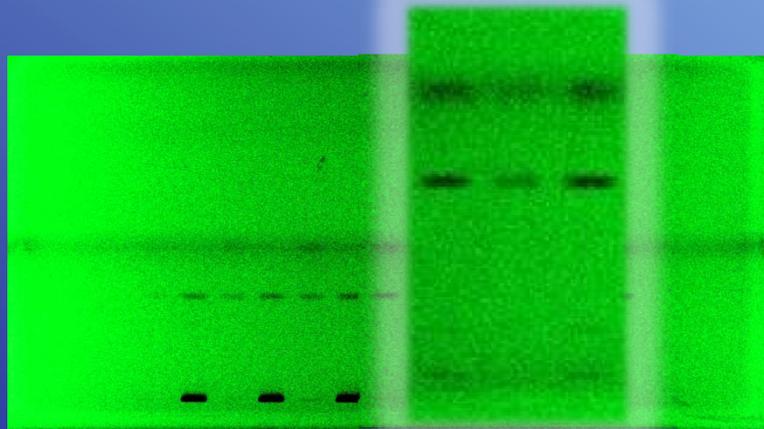
2- attention à la gamme utilisée

Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

Bruit de fond d'image à 254 nm



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.

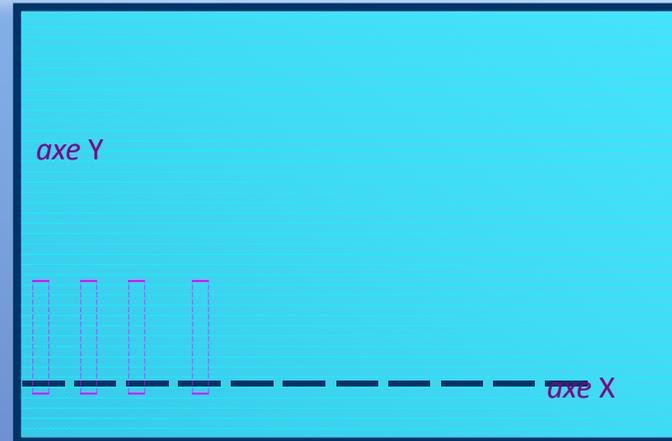


Le système d'acquisition est important :

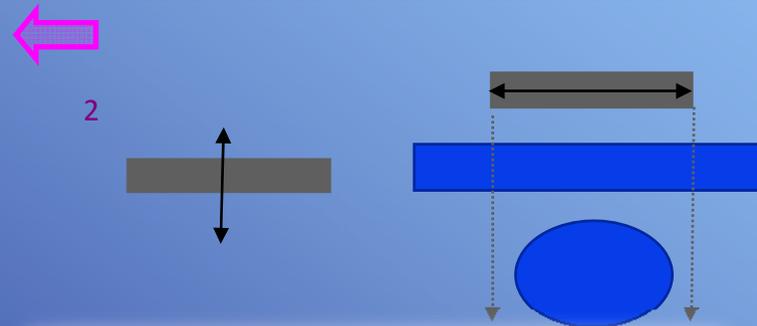
- caractéristiques de la caméra (linéarité,...)
- focale fixe (netteté)
- correction du bruit de fond (sensibilité)

Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

Densitométrie_ *taille & position fente de lecture*



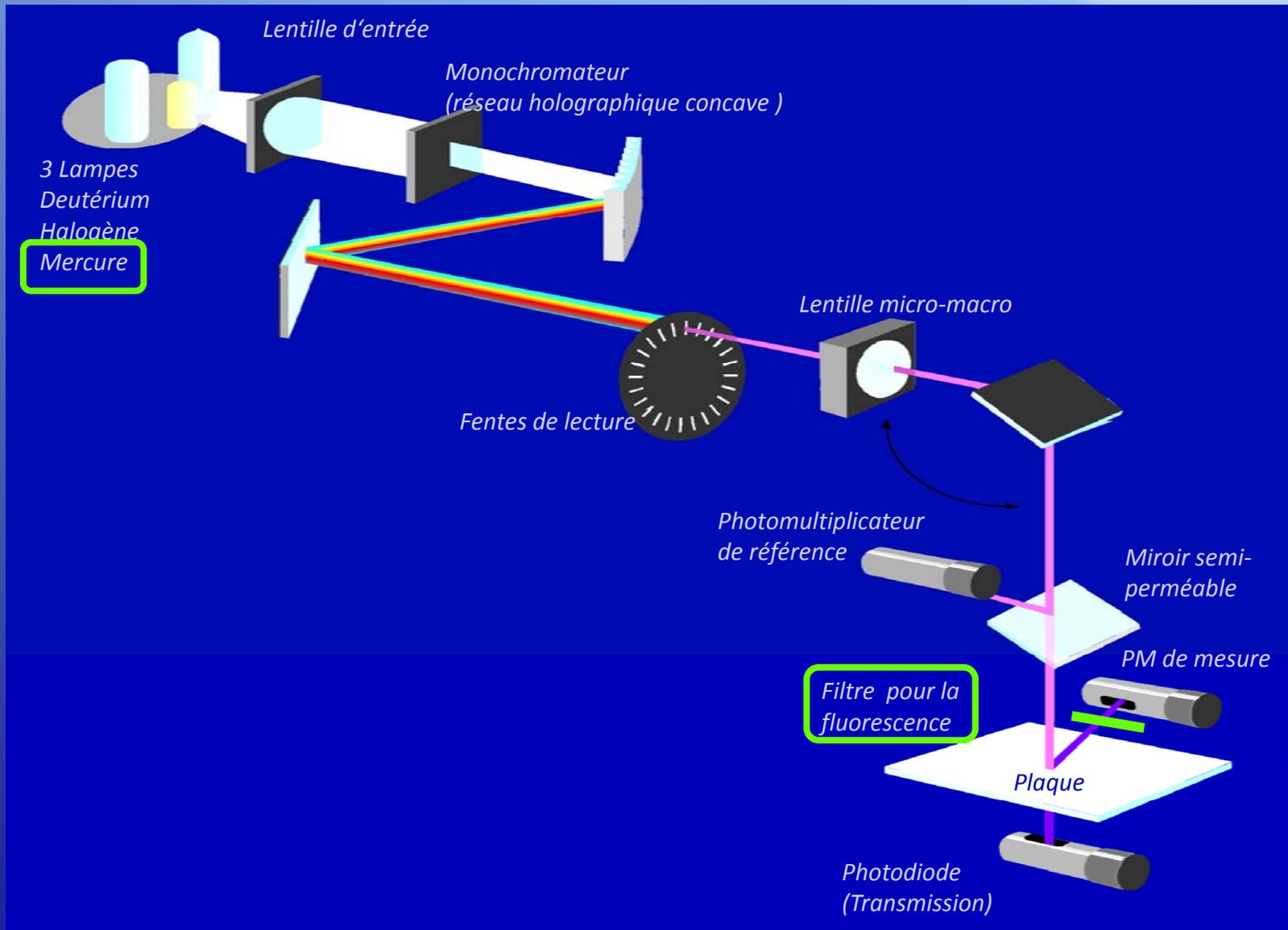
Éléments garantissant une lecture correcte :
Positionnement et déplacement exacts (par rapport aux pistes à mesurer sur la plaque) = origine x, nombre de pistes, et espacement.



Taille de la fente de lecture
(plus fine=résolution,
plus épaisse = sensibilité)
120% en lecture de spot
80% en lecture de bande

La 1^{ère} piste doit être visible

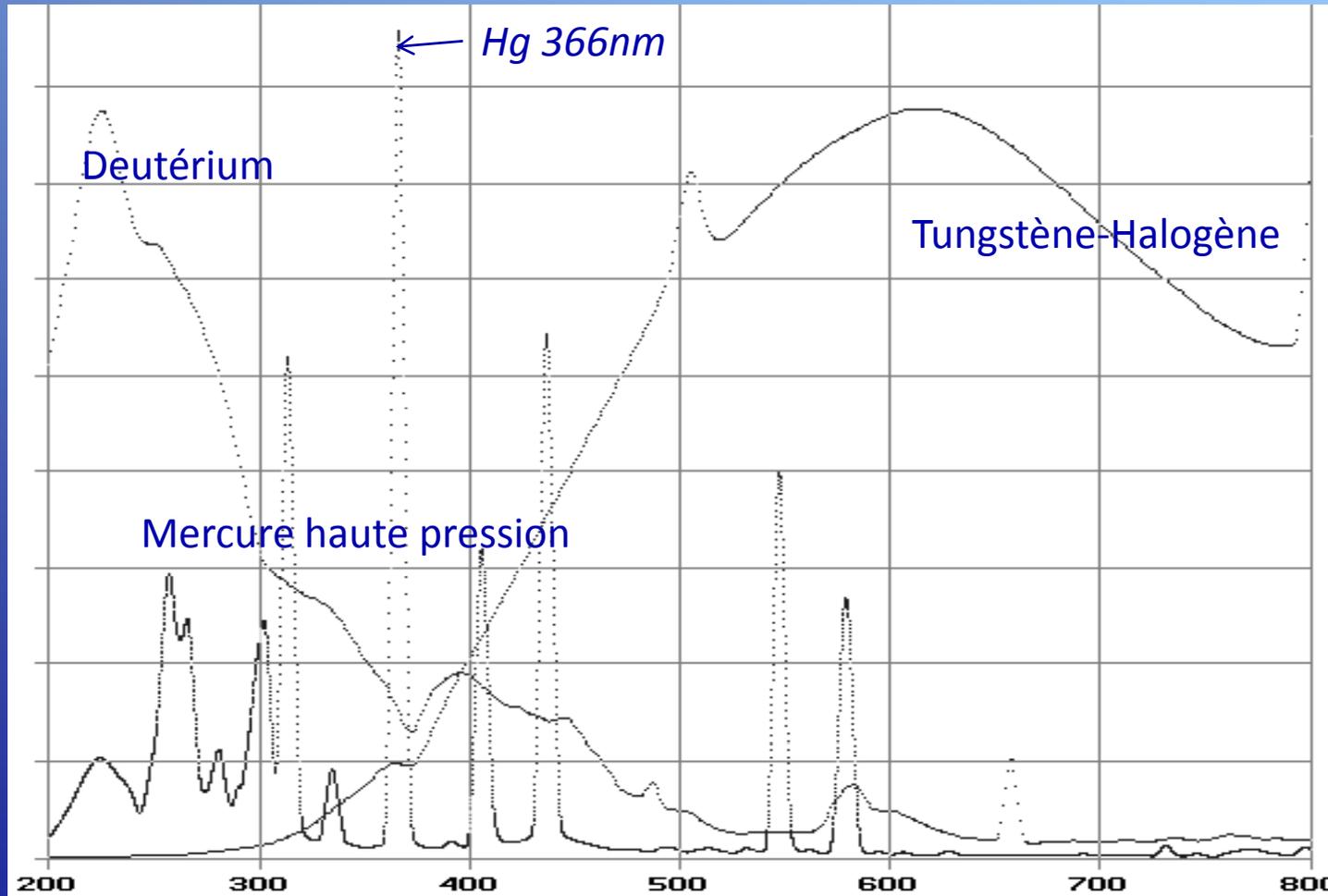
Densitométrie *Schéma optique*



Densitométrie_ Longueurs d'ondes des lampes



Intensité normalisée 100%



Longueurs d'ondes en nanomètres

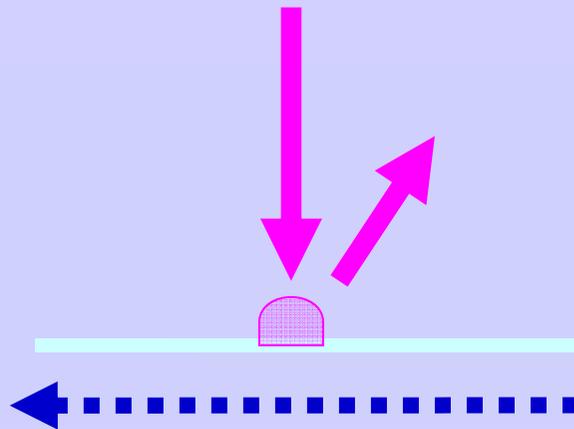
Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

Absorbance ou fluorescence



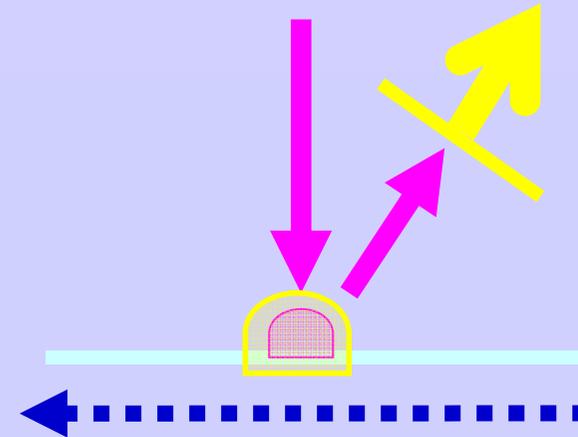
Les deux modes principaux d'évaluation sont l'**absorbance** en lumière UV ou en lumière du jour, et la **fluorescence**

l'absorbance



En **absorbance** la mesure n'est **linéaire** que dans les faibles concentrations de molécule sur la plaque. On mesure une diminution de signal. Il est conseillé d'utiliser des courbes de Michaelis-Menten ($y=ax/b+x$).

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)

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	U2 & VV
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 & VV
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 # 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

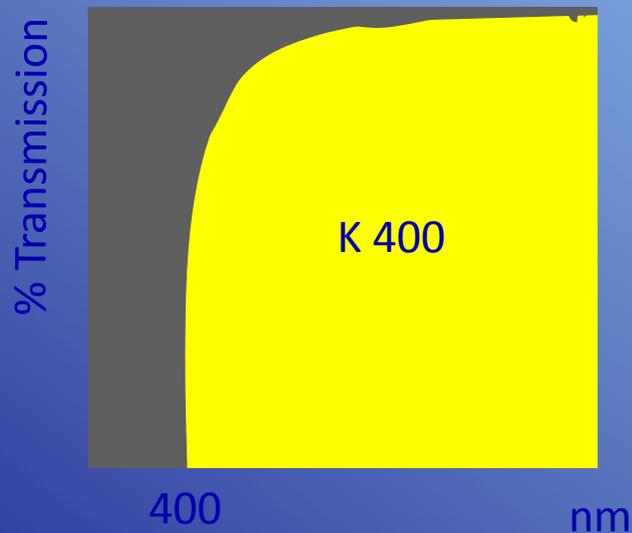
Mesure en fluorescence

Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

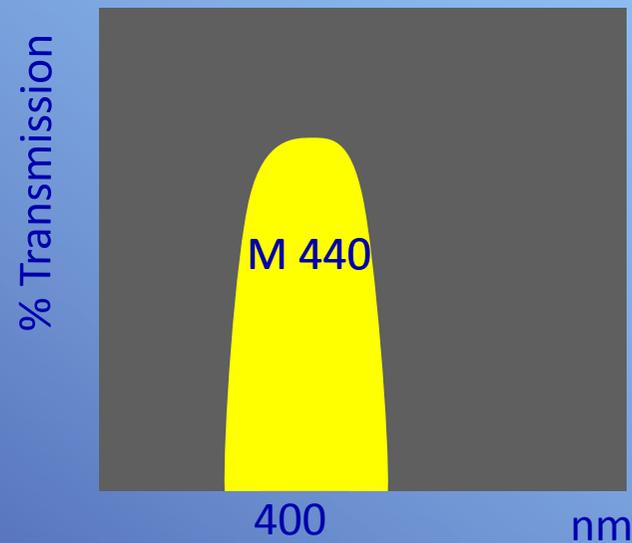
Densitométrie_ *choix des filtres en fluorescence*



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

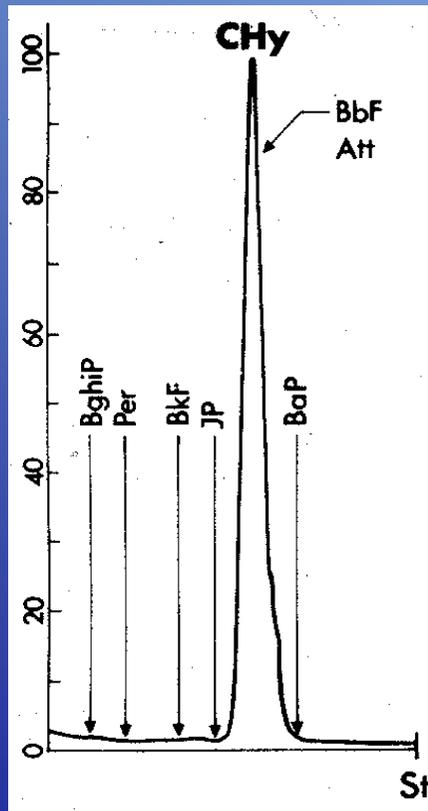
Par défaut et à priori : WL 366 nm Hg + K 400

Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

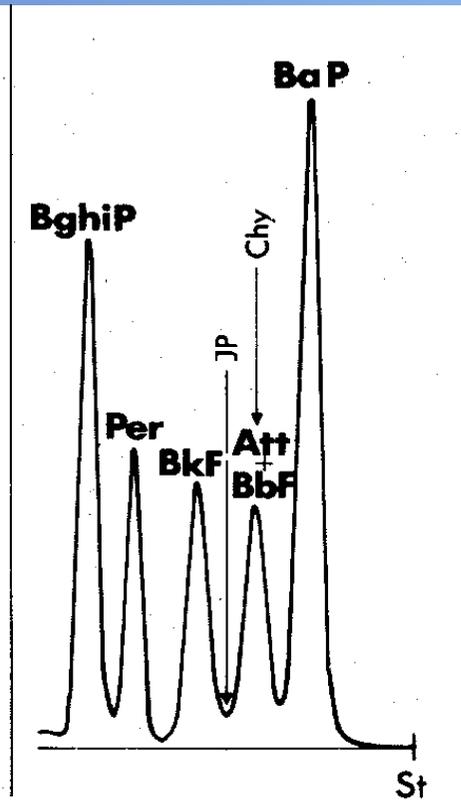
Densitométrie_ *filtres en fluorescence: exemple*



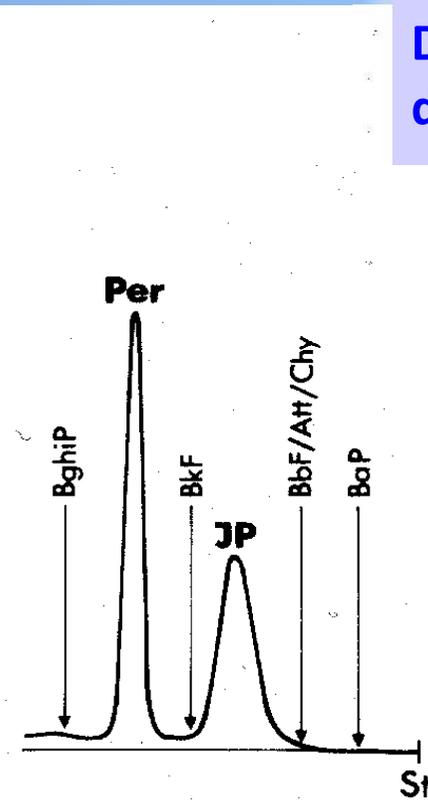
266/M365 nm



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_ 12ème
année _ Octobre 2010

Couplages sur plaque d'HPTLC

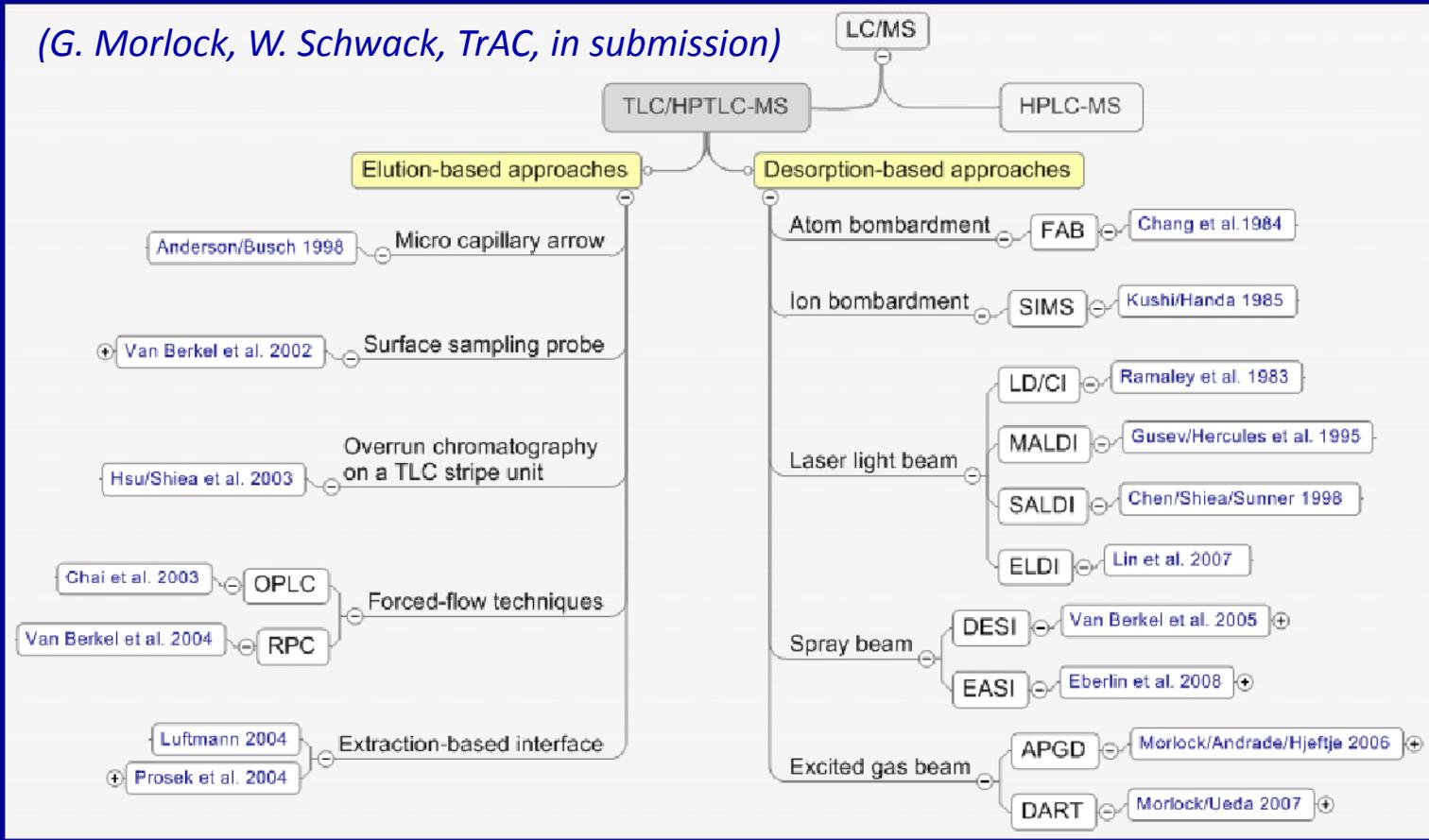


-> FTIR (Kovar)

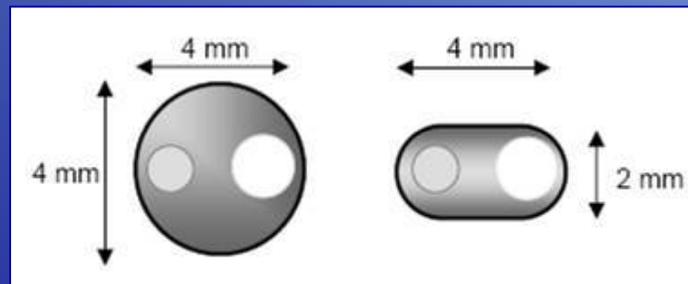
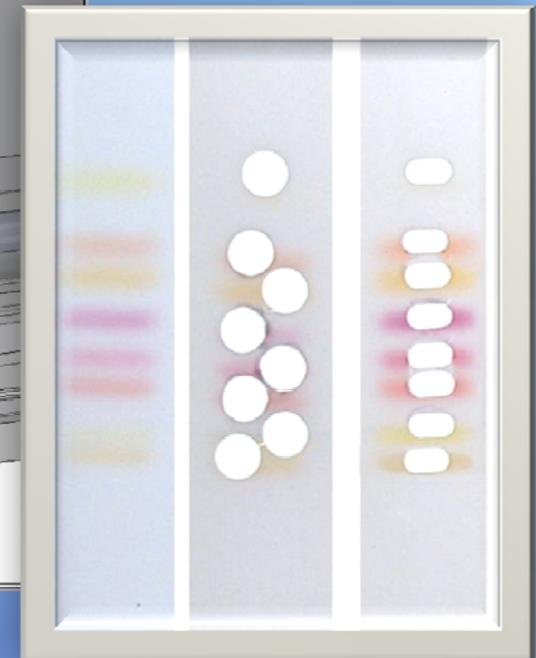
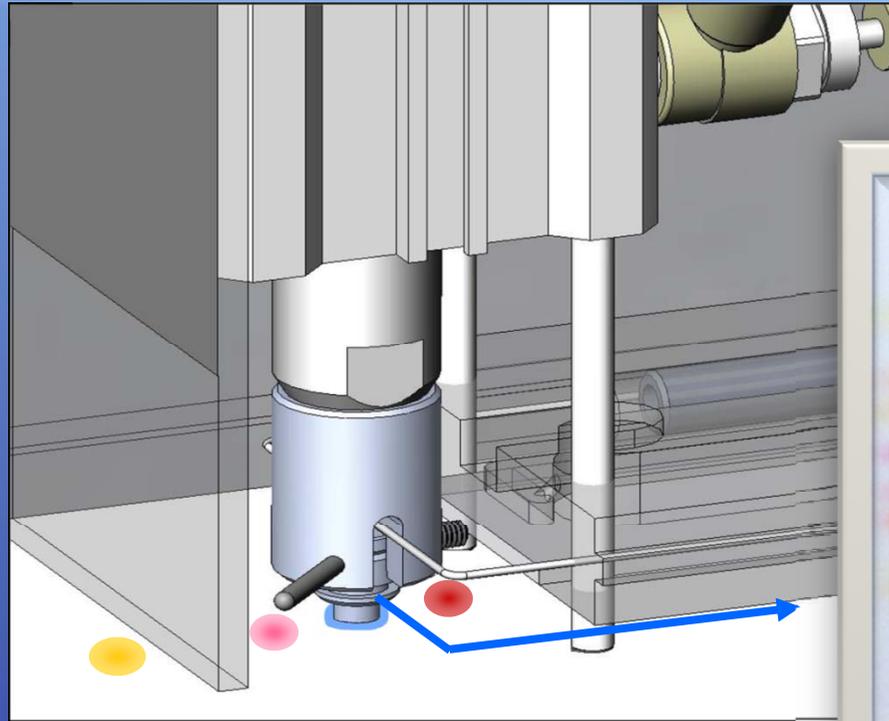
-> SERS (Burger)

-> MS

(G. Morlock, W. Schwack, TrAC, in submission)



Interface d'extraction et de couplages

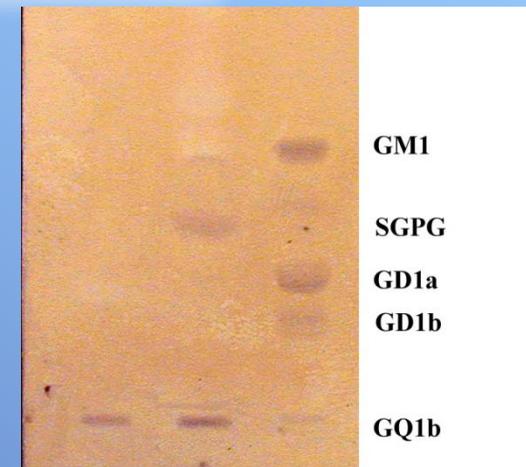
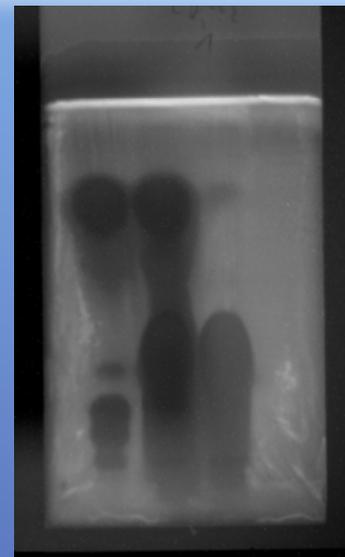


Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

Détection biologique



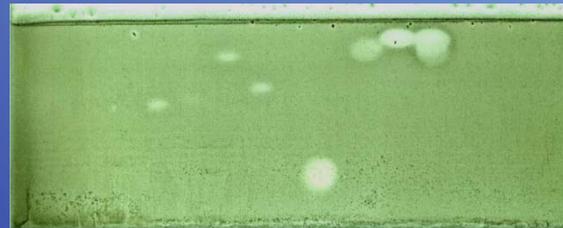
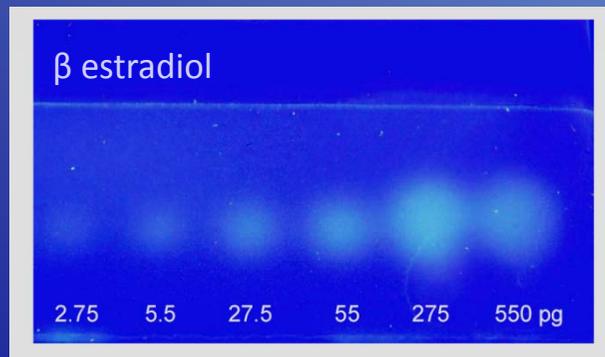
Activités enzymatiques, hormonales, anti-oxydantes, toxicité,...



GQ1b GQ1b cerveau
+nerf

Diagnostic de Guillain-Barré
forme oculaire de Fischer-Muller
(GQ1b est spécifique de cette forme oculaire)

Réaction antigène -anticorps



De nombreux tests déjà publiés (C.Weins, Berlin 2006)

Club de CCM_ 12ème
année _ Octobre 2010

Des choix complémentaires



Sur plaque tout est possible ou presque, question détection.

Il est nécessaire de développer une stratégie, pour :

- maximiser l'efficacité de la détection, en fonction de l'objectif
- optimiser les temps et les coûts d'analyse

Ne pas oublier les différentes astuces (dépôts en rectangle pour en augmenter le volume, multiples migration pour éliminer la matrice, immersion pour augmenter la fluorescence, réactif de révélation dans le solvant,...)

Utiliser les informations disponibles, et le réseau du club de CCM entre autres (clubccm@hptlc.com)

Bibliographie

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

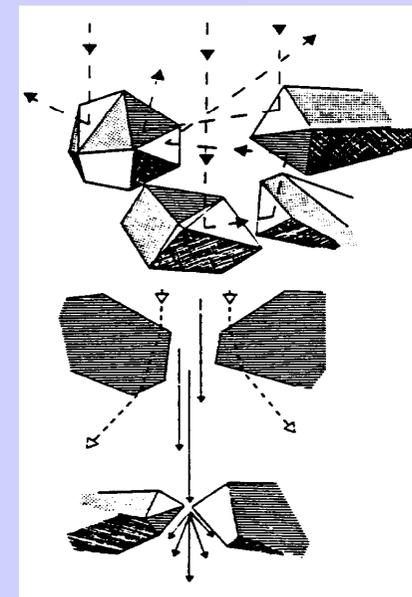


- **Pr S.Ebel** pour l'aspect **quantitatif** et relatif aux **spectres** sur la plaque. En particulier ce qui concerne les modes de calibration et la théorie sur la quantification sur plaque.

- **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, et 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_ 12ème
année _ Octobre 2010