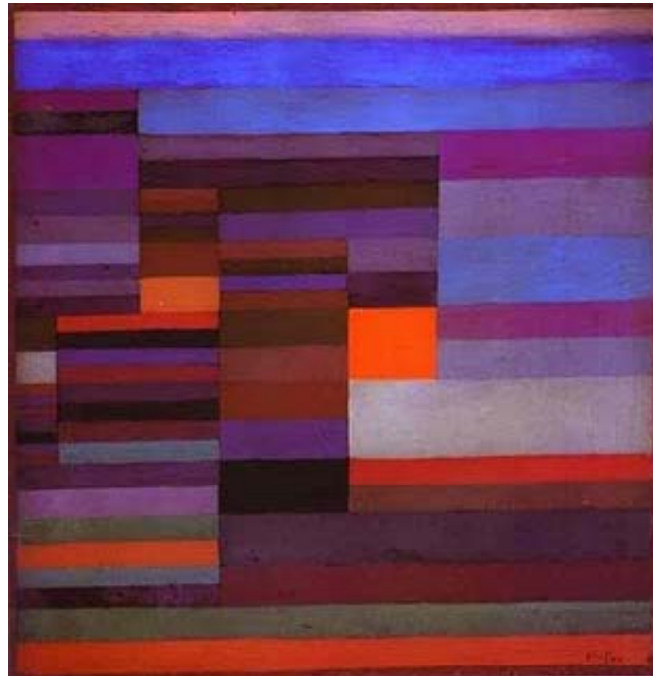


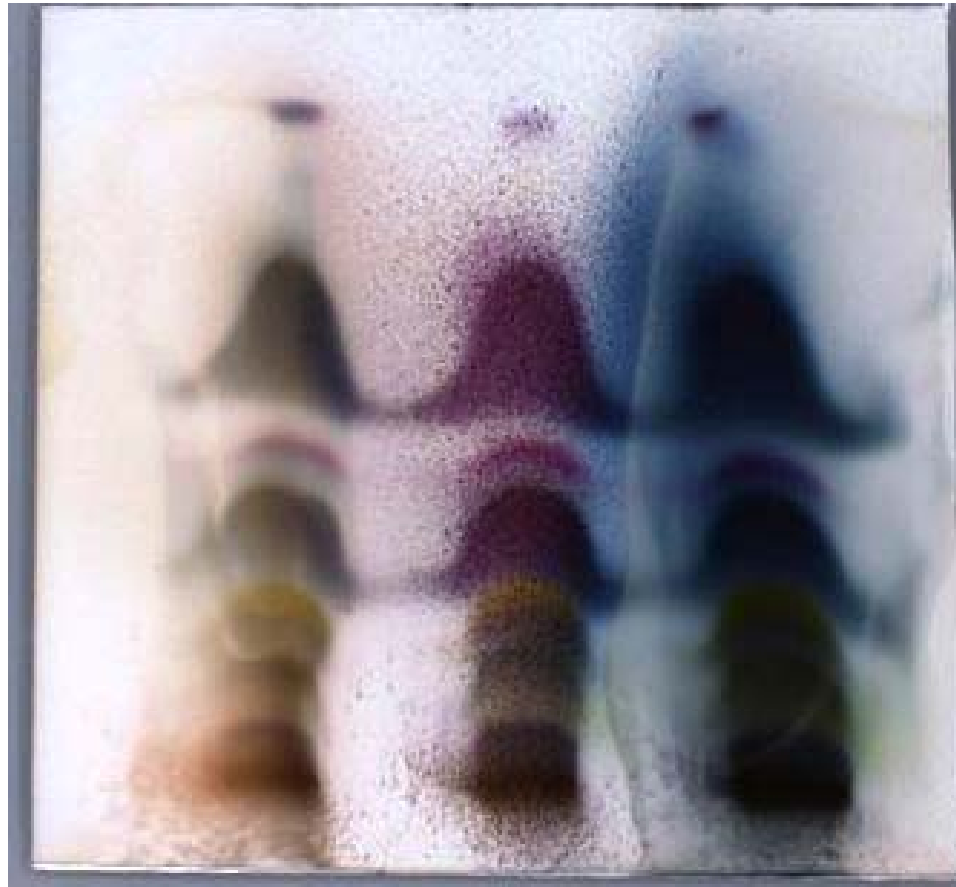
La révélation en chromatographie
sur couche mince

Est elle un art?

Paul Klee



Étudiant pharmacognosie



UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS TOURS

- Joëlle Dorat* .Michelle Pinault**.
- Jacques Pothier*
- laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer de l'équipe Inserm U921 de la faculté de médecine de TOURS
- Laboratoire de pharmacognosie
- Avenue Monge 37200 tours

Révélation, Dérivatization

- La phase de la chromatographie couche mince mal maîtrisée.
- Evaluation qualitative
 - Révélation par pulvérisation
 - Révélation par immersion
 - Révélation biologique
 - Evaluation sous lampe UV et vidéo

Les plaques sans révélation

- *la plaque contient un indicateur fluorescent* : on soumet la plaque à un rayonnement UV et les composés sont révélés sous forme de taches sombres.
- - *les UV (254 nm)* : en exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés (systèmes conjugués ou aromatiques) apparaissent sous forme de taches brillantes.

L iode un grand classique

- - *l'iode* : on plonge la plaque dans un bocal contenant un fond d'iode broyé. Les composés apparaissent sous forme de taches brunâtres.

Les pièges de la révélation

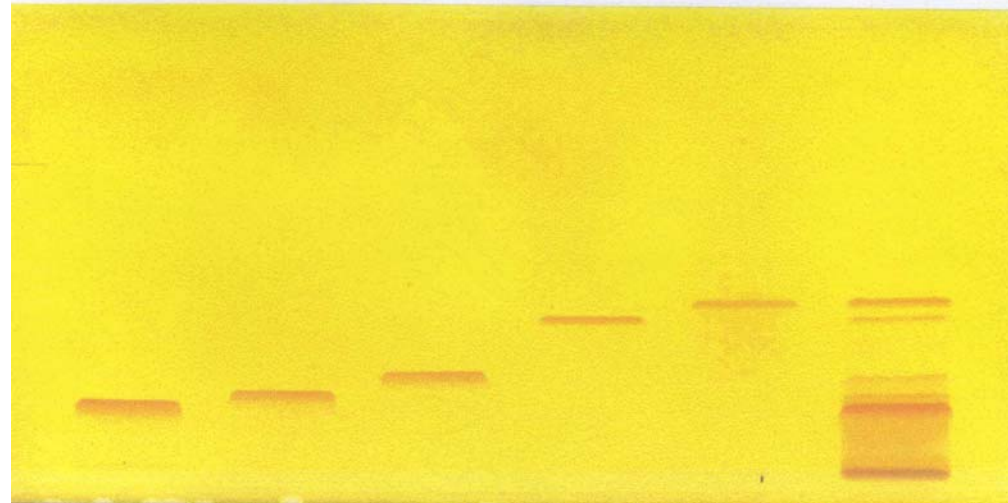
- Mauvais séchage avant la révélation
- Mauvais chauffage après application du révélateur

IMPORTANCE DU SECHAGE PREALABLE

il dépend des composés à isoler et des éluants
si l'éluant est acide ou basique il faut un séchage
préalable avec chauffage pour éviter une réaction
« éluant révélateur »

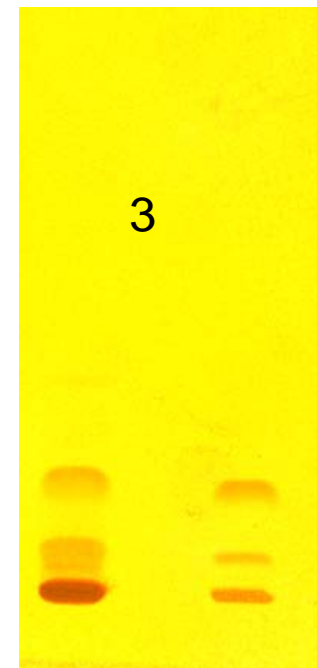
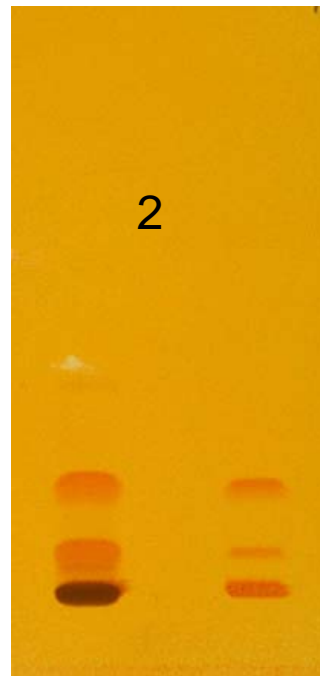
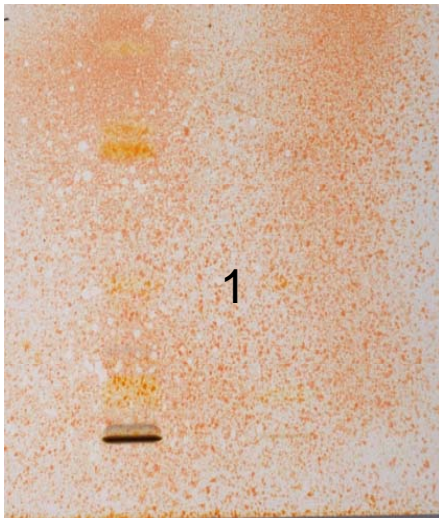
Exemples alcaloïdes de l'opium

Opium par AMD au Dragendorff
Laboratoire de pharmacognosie Tours



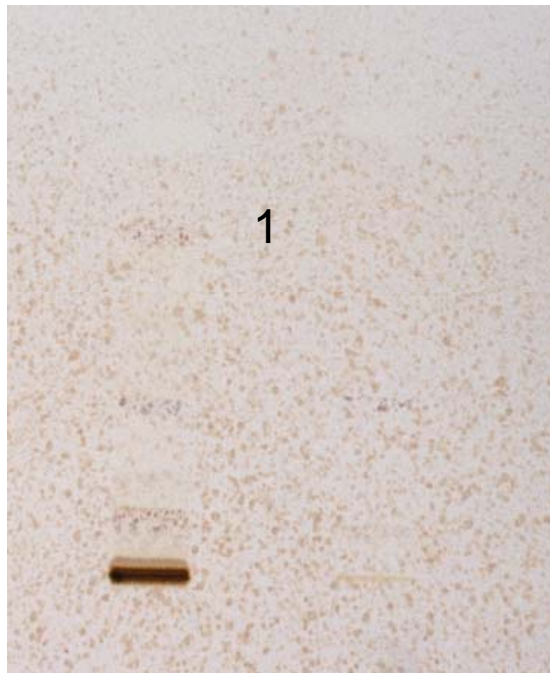
Dragendorff 1- sans séchage, 2- séchage, 3- séchage plus acide formique

opium avec éluant alcalin

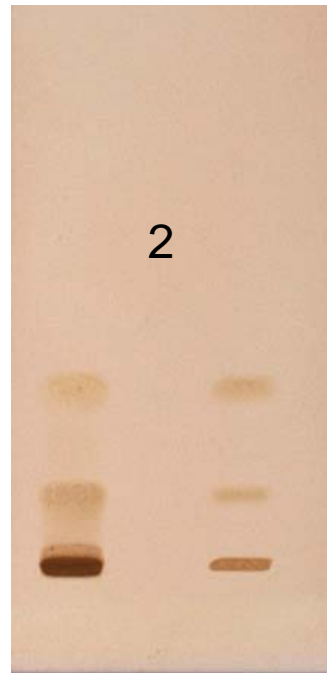


Opium iodoplatinate réactif peu acide non destructif de la molécule

- 1 mauvais séchage



- 2 bon séchage

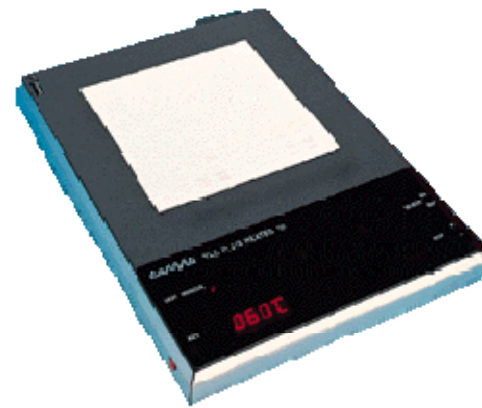


IMPORTANCE DU SECHAGE PREALABLE

- si on chromatographie des produits volatiles comme les huiles essentielles éviter bien évidemment un séchage trop chaud
- Laisser par exemple s'évaporer l'éluant de la plaque sous la hotte aspirante

Révélation puis chauffage

- La plaque chauffante est préférable à l'étuve pour :
 - Une meilleure homogénéité de la température.
 - Une meilleur suivi de la révélation.



A éviter (à proscrire)

- Le chauffage cow boy

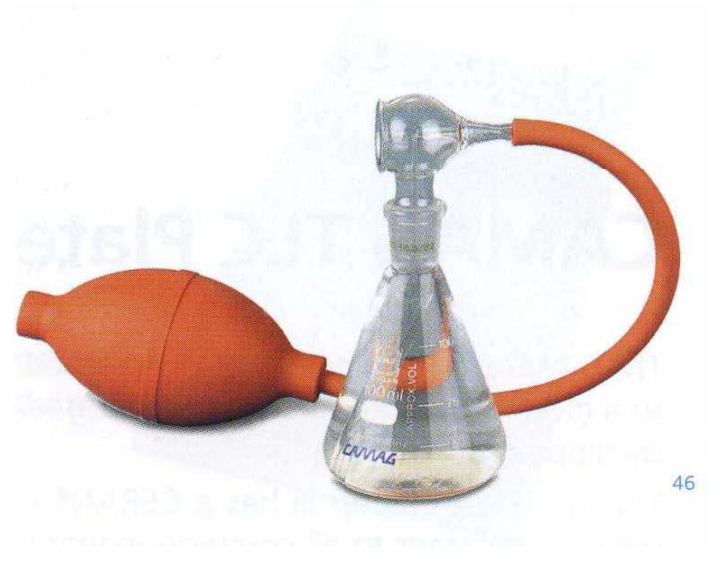


Le chauffage « bonne
maman »

Pulvérisation

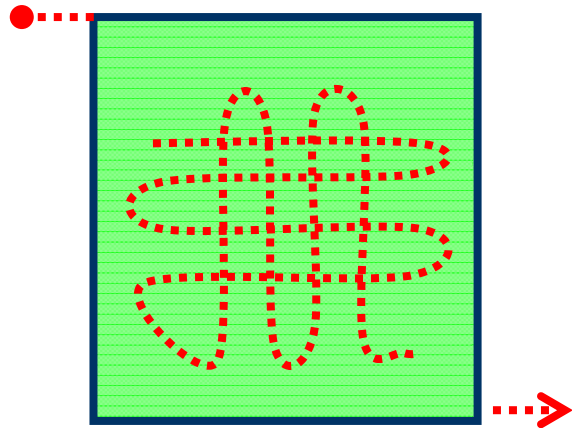
- Imprégnation de la couche par pulvérisation d'une substance réactive.
- Reproductibilité difficile très liée à l'opérateur
 - puissance de pulvérisation
 - distance
 - durée
 - balayage, homogénéité du fond de plaque

Pulvérisateurs



Révélation par vaporisation

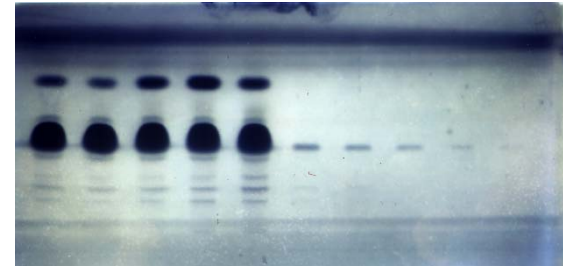
- La vaporisation d'un réactif sur la plaque nécessite un minimum d'équipement, mais surtout des précautions pour se protéger et protéger l'environnement des vapeurs toxiques, et une méthode bien maîtrisée pour limiter le manque de reproductibilité et le bruit de fond.



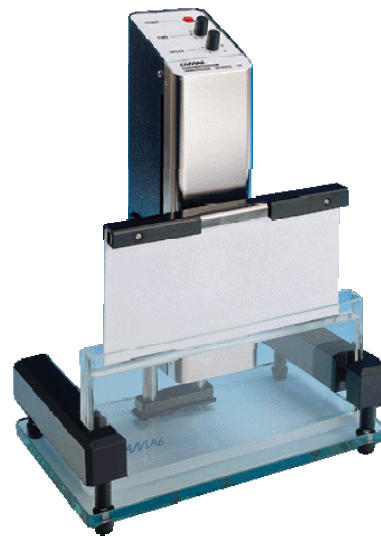
- Schéma de vaporisation

Révélation par immersion

- La révélation par **immersion** de la plaque dans la solution de réactifs est de loin la meilleure solution (non polluante , reproductible, quantitative) mais attention aux excès d'échantillon sur la plaque, et aux révélations multiples.



*Plaque de stéroïdes
révélés au réactif
phosphomolybdique*



Chromatogrammes établissant une comparaison entre pulvérisation et trempage

- d'après Hahn Deinstrop

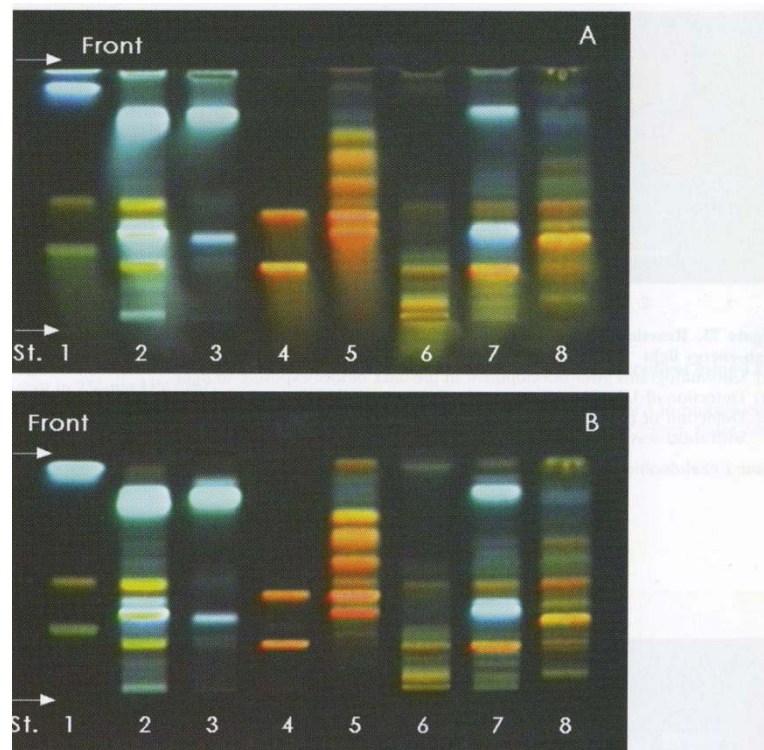


Figure 80. Comparison of a dipped plate with a sprayed plate (shots in 365-nm UV light after derivatization with the flavone reagent according to Neu)
(a) Plate derivatized by dipping
(b) Plate derivatized by spraying

Méthodes de Dérivation

- UV 254 et 366 nm
- Pulvérisation
- Trempage
- Exposition aux vapeurs
- Réactifs dans le solvant
- Réactif dans l'adsorbant

Réactifs non spécifiques

- Acide sulfurique plus chauffage
- Vanilline sulfurique plus chauffage
- Acide phosphomolybdique plus chauffage
- Anisaldéhyde sulfurique plus chauffage
- Sel de Bleu solide B

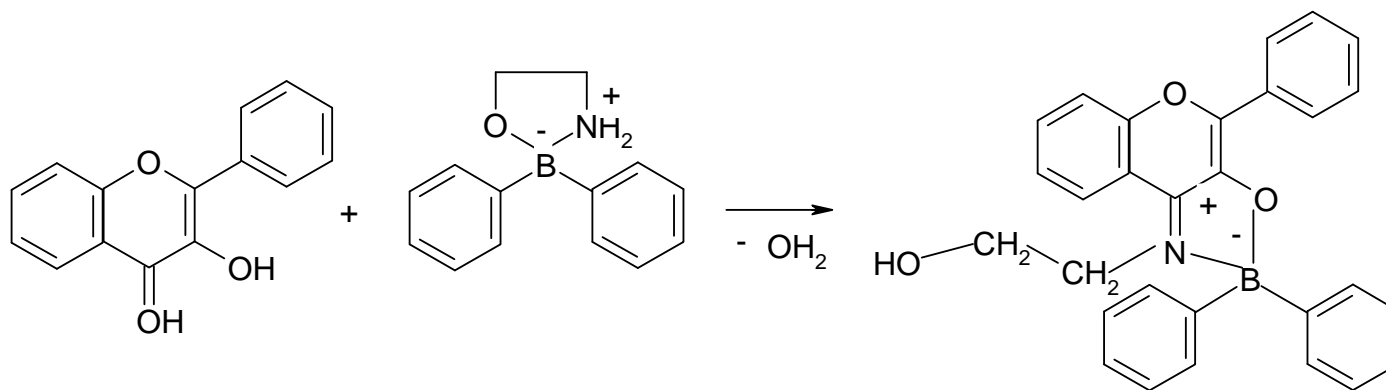
Réactifs Généraux des Alcaloïdes

- Dragendorff
 - Acétique (selon Munier et Macheboeuf)
 - Chlorhydrique (bases puriques)
(Coloration du orange au rouge sur fond de plaque jaune)
- Iodoplatinate de potassium
(Couleurs allant du rose au bleu intense en passant par le violet)

Réactifs des Hétérosides flavoniques

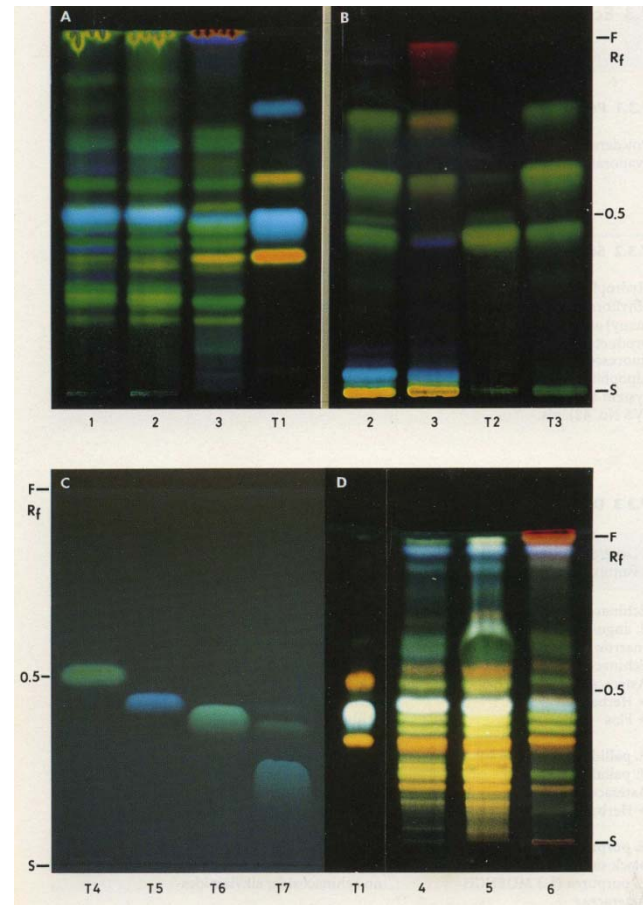
- Potasse alcoolique
- Réactif au chlorure ferrique
- Réactif au trichlorure d'aluminium
- Réactif de NEU (NP/PEG)

Mécanisme réactionnel avec le Réactif de NEU



Chromatogrammes de Ginkgo biloba

D'après Wagner



Réactifs les plus couramment utilisés

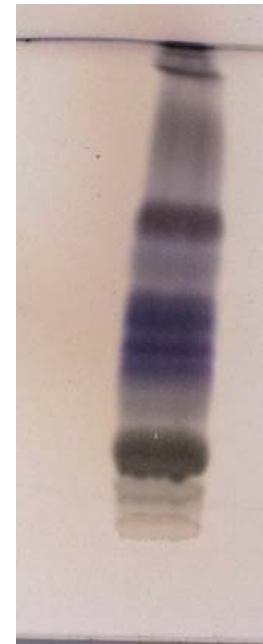
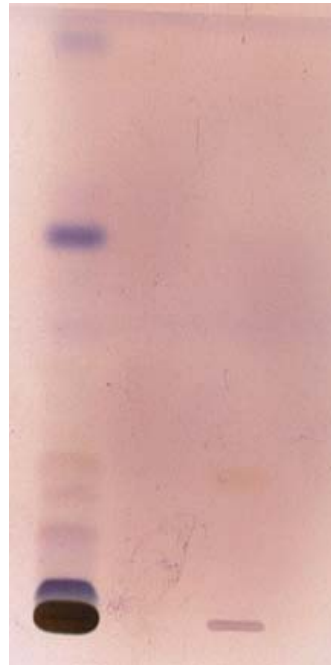
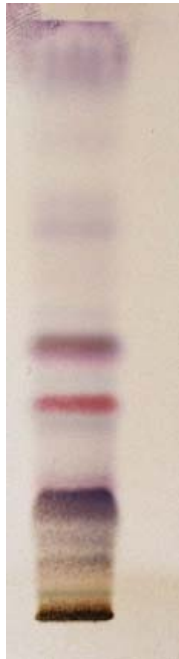
- Vapeurs
 - Iode
 - Ammoniaque
- Dragendorff acétique ou chlorhydrique (alcaloïdes)
- Iodoplatinate (alcaloïdes)
- Aniline(carbohydrates)
- Acide Diphénylborique (Flavones)
- Acide Phosphomolybdique + chauffage (stéroïdes, phénols...)
- Acide sulfurique + chauffage (substances organiques)
- Anisaldéhyde sulfurique ou acétique + chauffage (sapogénines, huiles essentielles)

Réactifs les plus couramment utilisés

- Dichloroquinone-4-chlorimide (Phénols, indoles)
- Sel de Bleu Solide B (cannabinoïdes, phénols, tannins)
- **Réactif de Neu (NP/PEG)** (Flavones)
- **Vanilline sulfurique** (Stéroïdes, saponines huiles essentielles)
- Trichlorure d'Antimoine (terpènes, stéroïdes, sapogénines)
- Acide trichloracétique + chloramine T (H. cardiotoniques)
- Dinitrophénylhydrazine (Aldéhydes et cétones)
- PDAB = *Para*-diméthylaminobenzaldéhyde (Indoles)
- Acide chlorhydrique – acide acétique

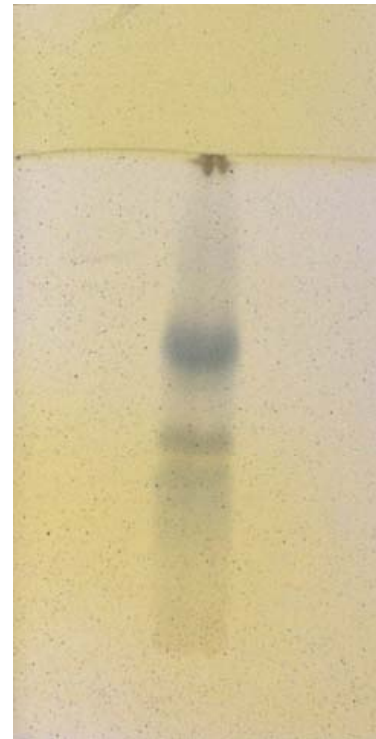
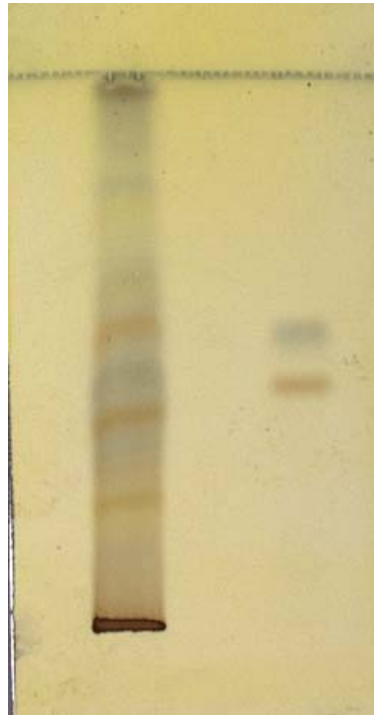
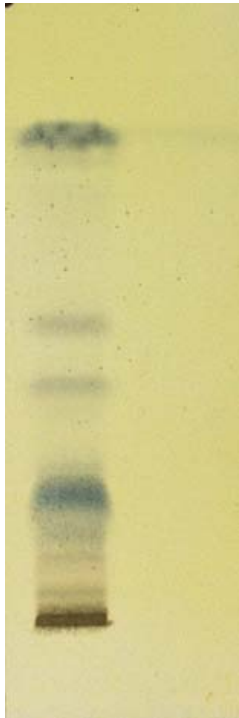
Des révélateurs très utilisés

- Anisaldéhyde sulfurique 1-cannabis2- opium3- ginkgo 4-ginseng



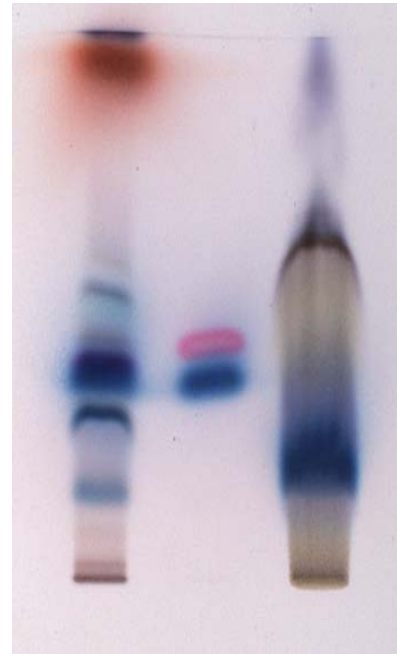
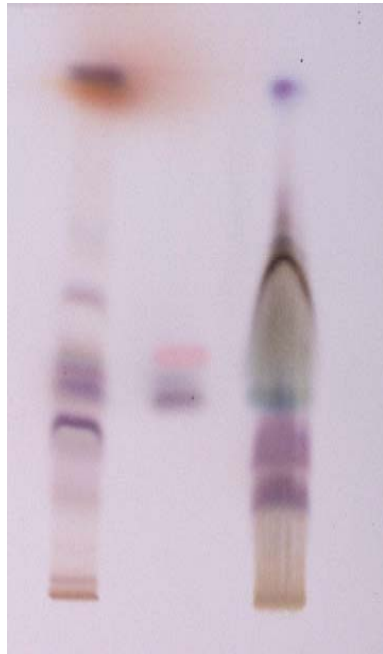
acide phosphomolybdique

- 1 cannabis 2 ginkgo 3 ginseng

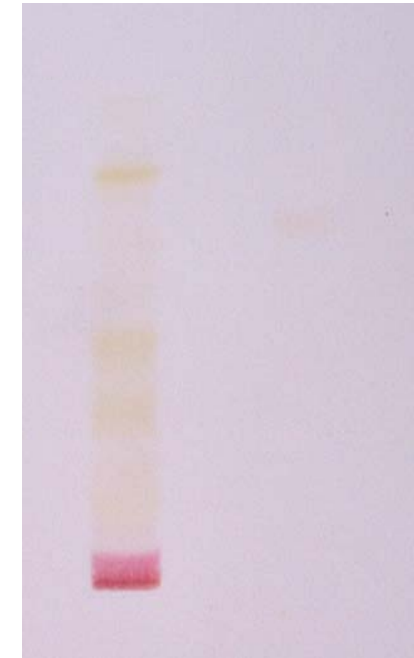
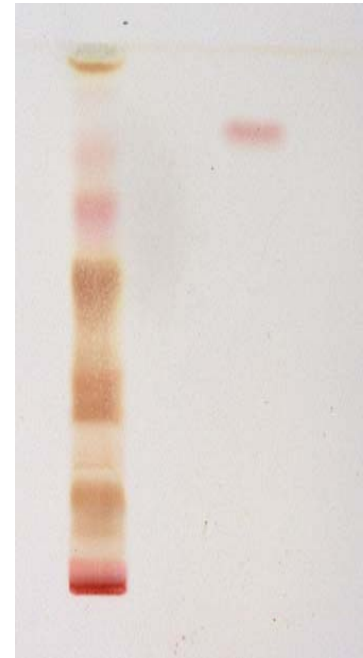


Différences entre deux révélations à la vanilline **chlorhydrique** et **sulfurique**

- Huile essentielle



- extrait de cranberry

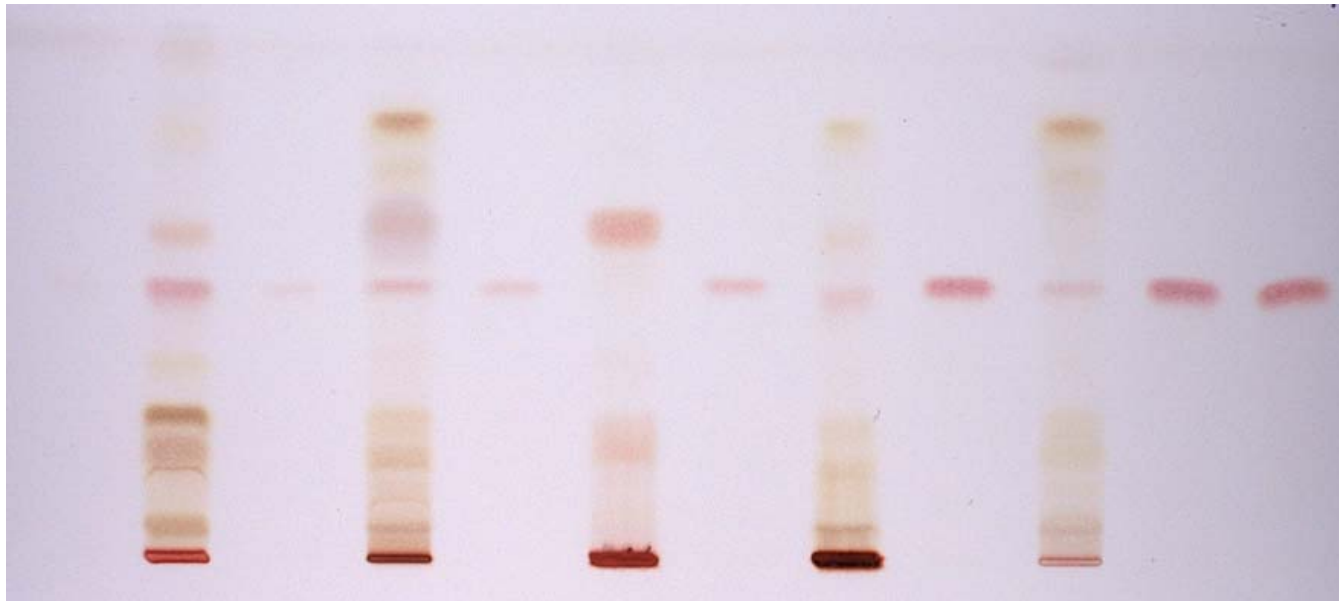


Choix de la plaque

- Expérience récente
- Ne pas changer de fournisseur de plaque

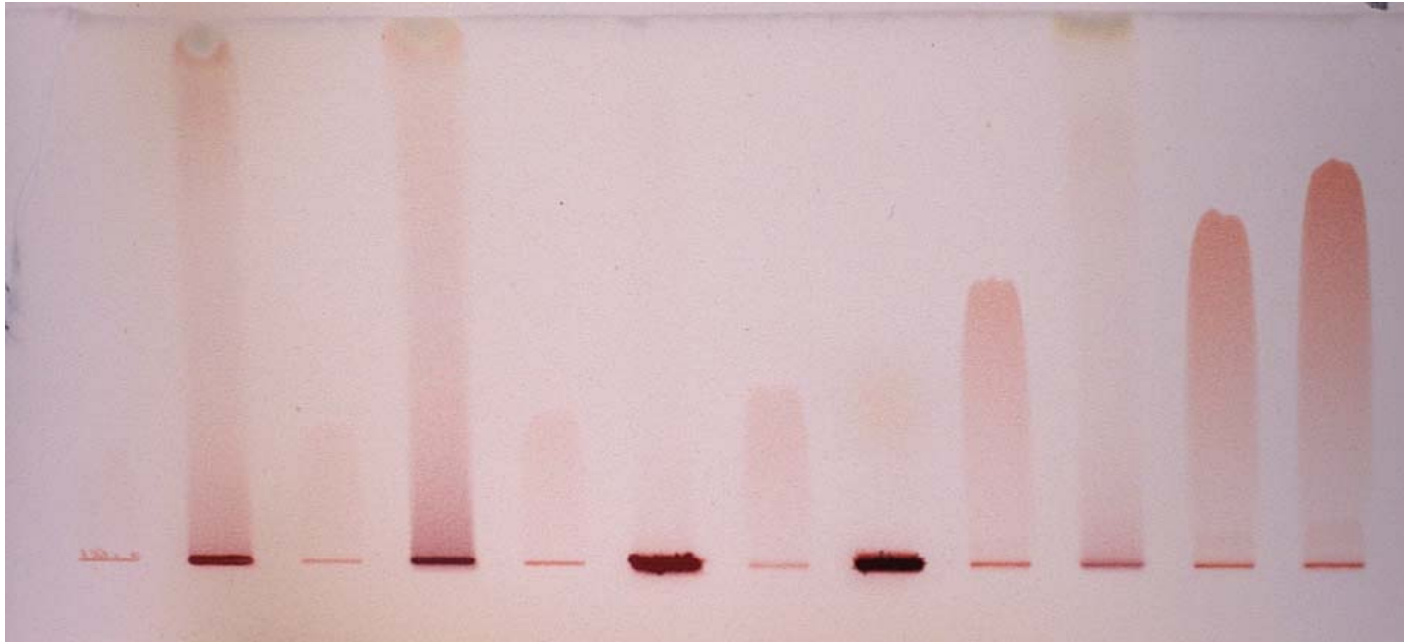
Ne pas changer de fournisseur

- Plaque merck



Plaque x

- Même éluant même révélation



glycolipides

- Exemple de mise au point d'une méthode de révélation

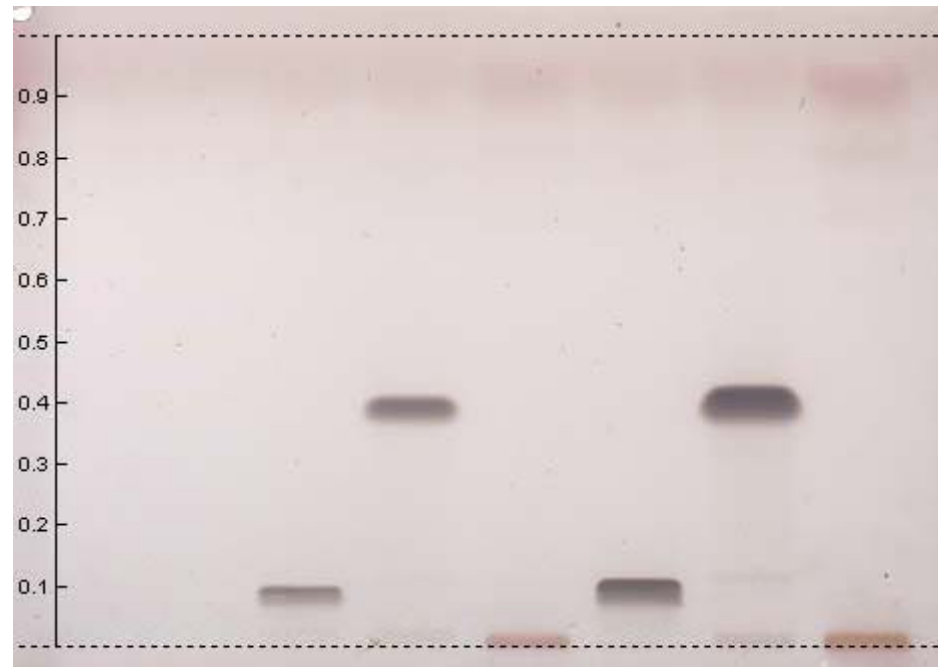
Différents révélateurs utilisés et testés sur des glycolipides.

- Ces manipulations ont été réalisées dans le laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer de l'équipe Inserm U921 de la faculté de médecine de TOURS, avec l'aide de l'équipe de Monsieur Bernard Savary du laboratoire Camag et les conseils de Monsieur Jacques Pothier

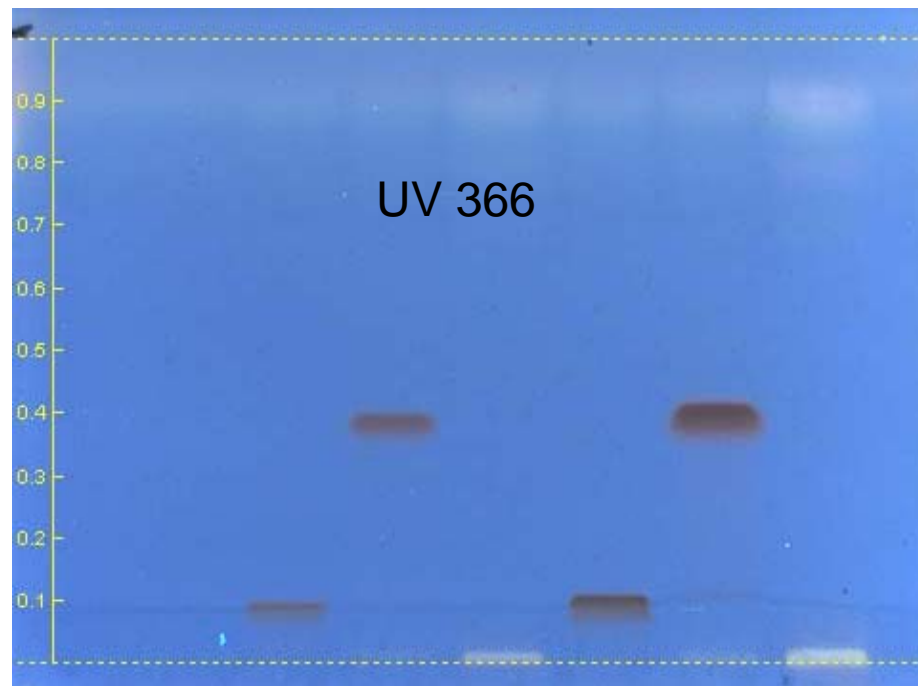
- **Deux molécules A et B**, dérivés glycolipidiques différent par une substitution en sn-3.
- (Réactifs : Primuline, Berbérine sulfate de cuivre avec acide ortho phosphorique, Acide sulfurique à différents dosages.

Acide sulfurique à 10% dans l'éthanol : 20mL d'acide sulfurique avec 180mL d'éthanol. Les plaques sont chauffées à 130°C pendant 5min.

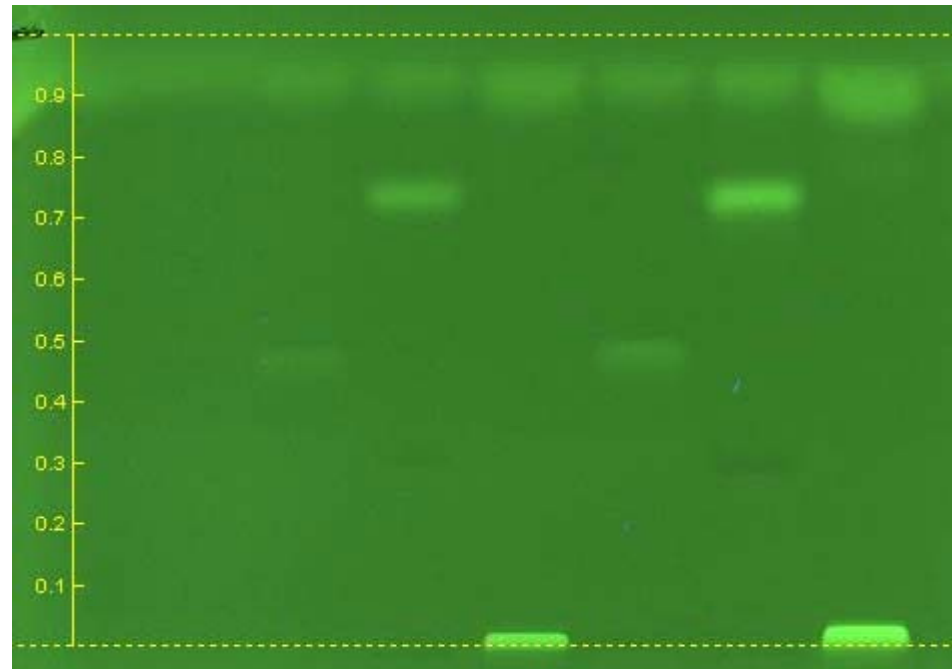
Image avec plaque dérivée en WRT



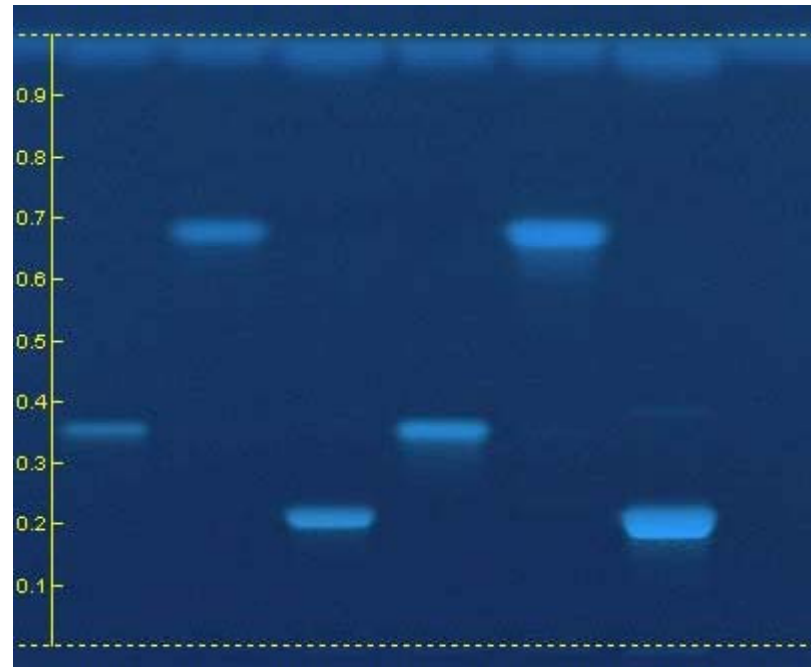
Réactif avec le sulfate de cuivre : 20g de sulfate de cuivre dissous dans 200mL de méthanol auquel on ajoute 8mL d'acide sulfurique et 8mL d'acide ortho-phosphorique (à 85%). Les plaques sont chauffées à 140°C pendant 30min.



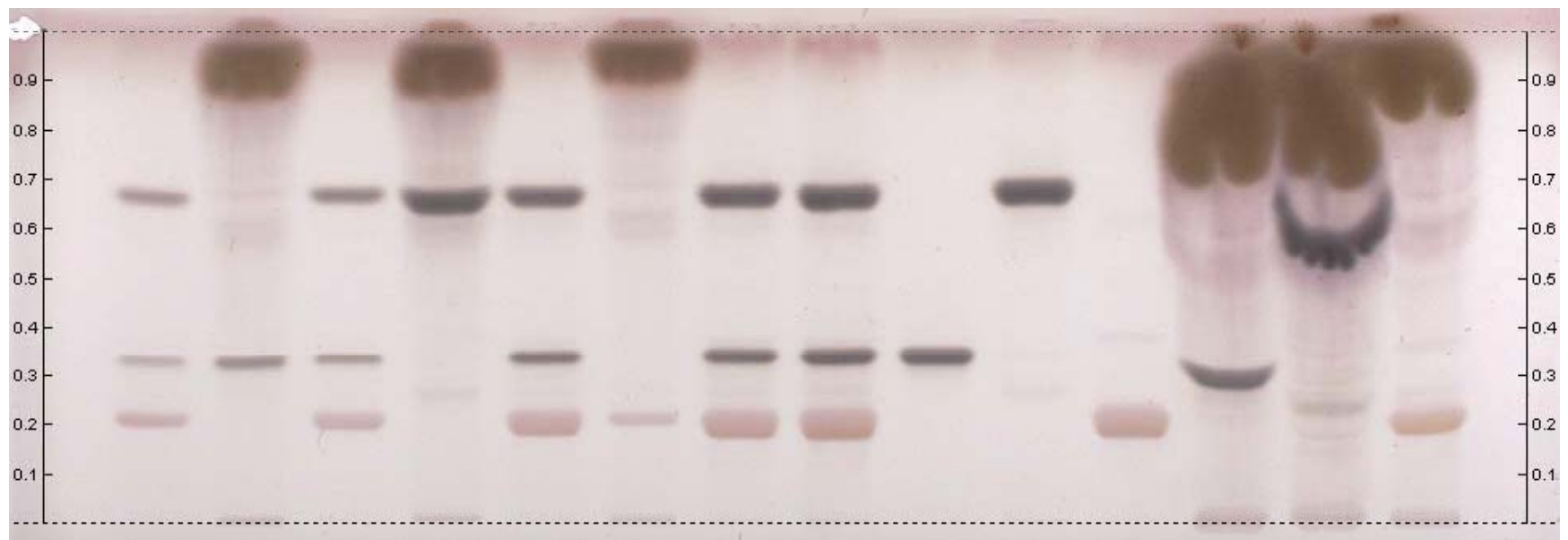
Berberine

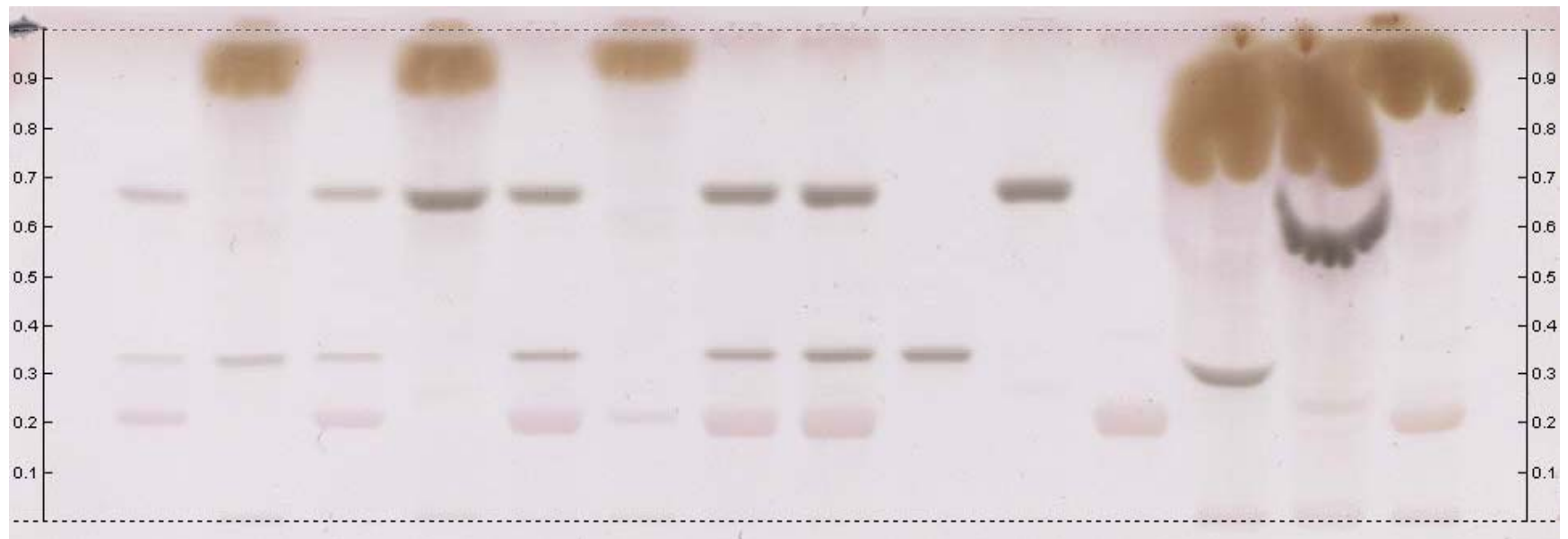


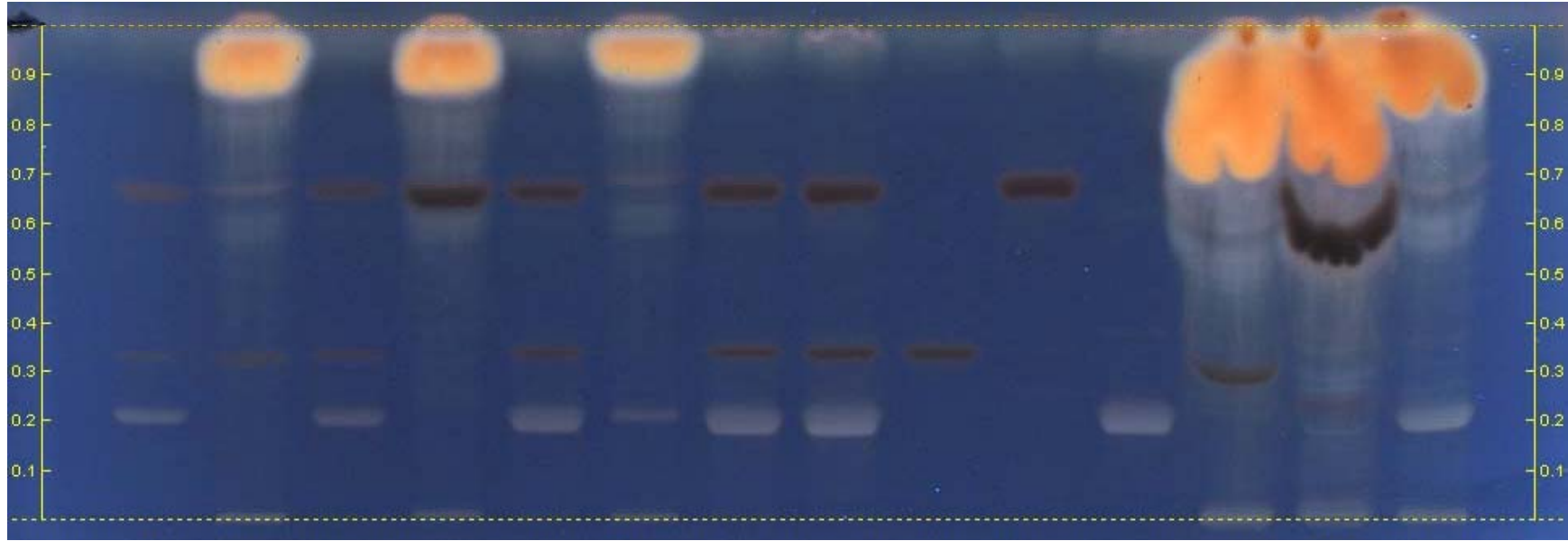
Test à la primuline sur molécule c



Les réactifs retenus







- Remerciements

Les étudiants en pharmacognosie

Michelle Pinault

Joelle Dorat

Paul Klee

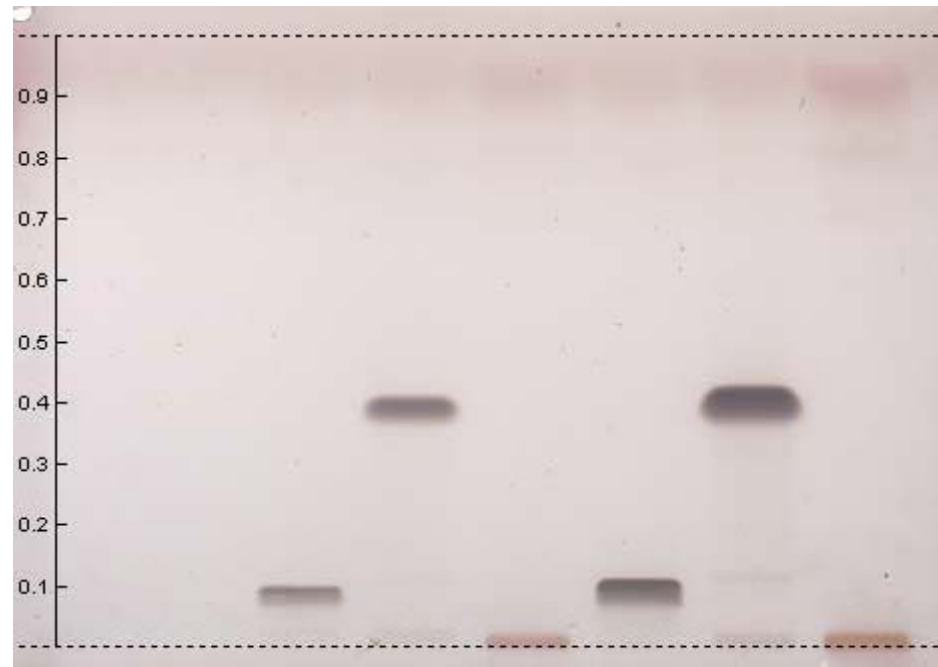
Nicolas de stael

Nicolas de Staël

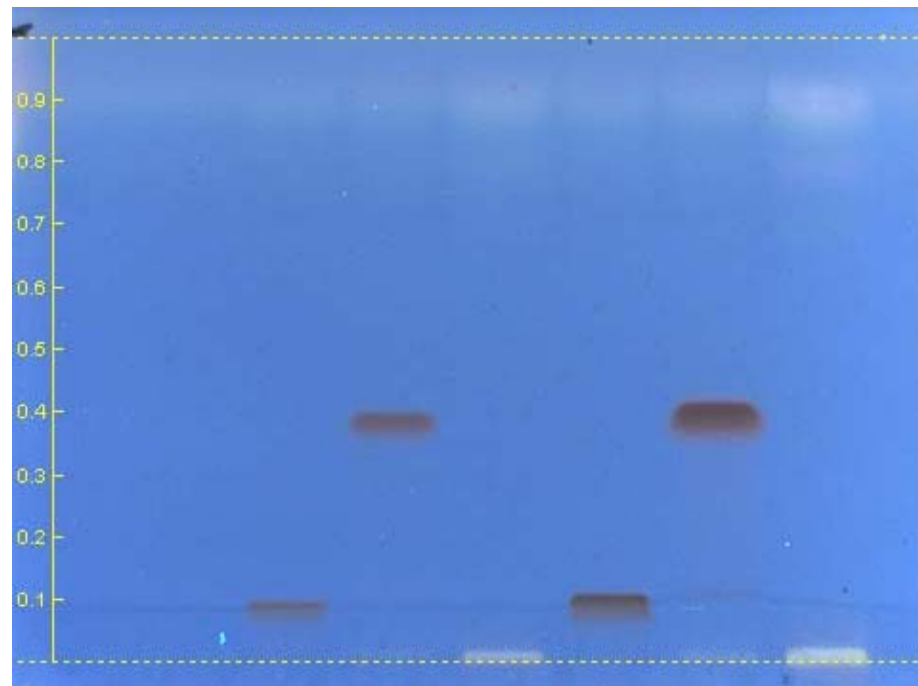


Acide sulfurique à 10% dans l'éthanol : 20mL d'acide sulfurique avec 180mL d'éthanol. Les plaques sont chauffées à 130°C pendant 5min.

Image avec plaque dérivée en WRT

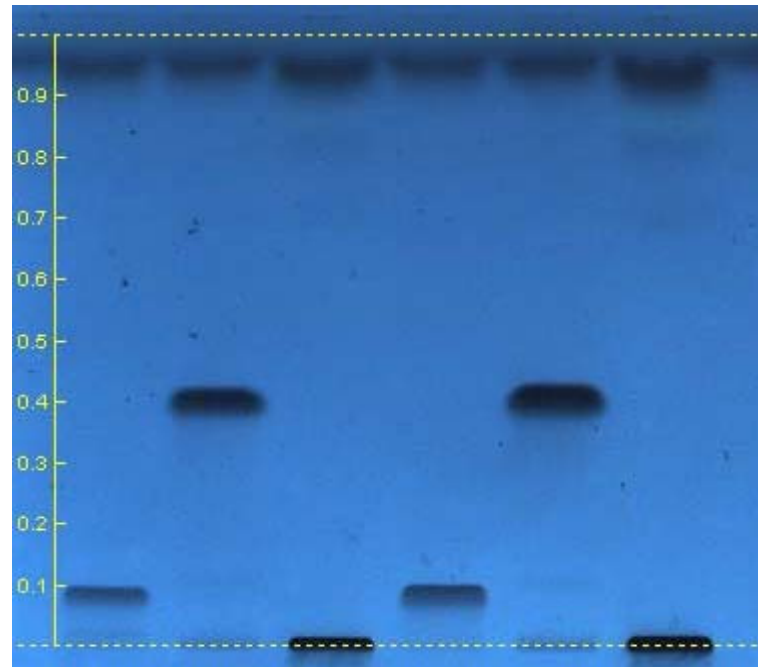


Réactif avec le sulfate de cuivre : 20g de sulfate de cuivre dissous dans 200mL de méthanol auquel on ajoute 8mL d'acide sulfurique et 8mL d'acide ortho-phosphorique (à 85%). Les plaques sont chauffées à 140°C pendant 30min.



. Les 2 réactifs ensemble sont appropriés. Les 2 molécules A et B sont séparées mais il faudrait une meilleure position, elles restent basses sur la plaque.

Le révélateur peut être utilisé.



Test primuline sur molécule c

