

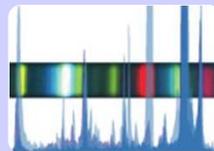


Le dépôt sur plaques de CCM/HPTLC

Pierre Bernard-Savary,

www.clubdeccm.com, clubccm@hptlc.com,

www.hptlc.com, info@hptlc.com



Le dépôt...



- un peu d'histoire (un début à tout)
- dépôt par capillarité / dépôt par vaporisation
- paramètres importants
- artefacts
- le dépôt comme outil, applications

Un peu d'histoire...



- sujet de notre première réunion en **1999**

HPTLC, Journal of Chromatography, Volume 9, chap. 1 et 5 par R.E.**Kaiser**(Inst.Chromatography) donne des éléments théoriques basés sur le concept de la qualité du dépôt. Mais les formules étaient fausses...

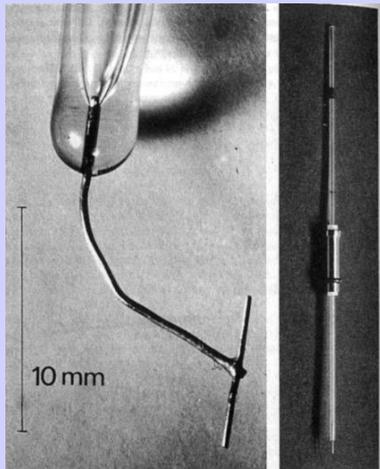
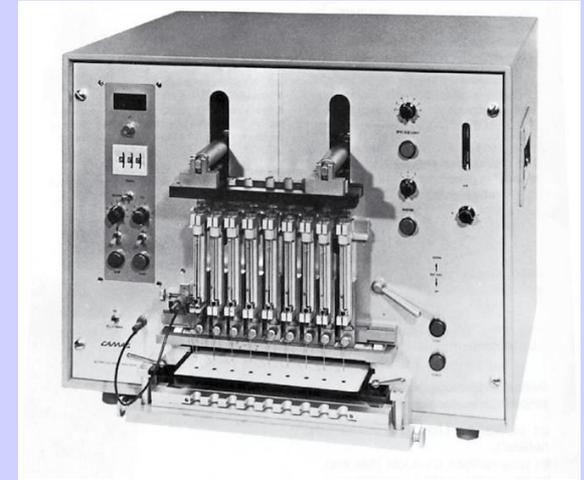
Il faut retenir que la qualité du dépôt est primordiale pour la suite et le résultat final de l'analyse

Un dépôt ne doit pas dépasser 0,5mm de diamètre (ou dans le sens de la migration)

L'évolution des outils...



manuels ou
automatiques...
(1970)



Par capillarité:
1978 Nanomat
1982 ATS

Par vaporisation:
1969 Linomat
1988 ATS 3

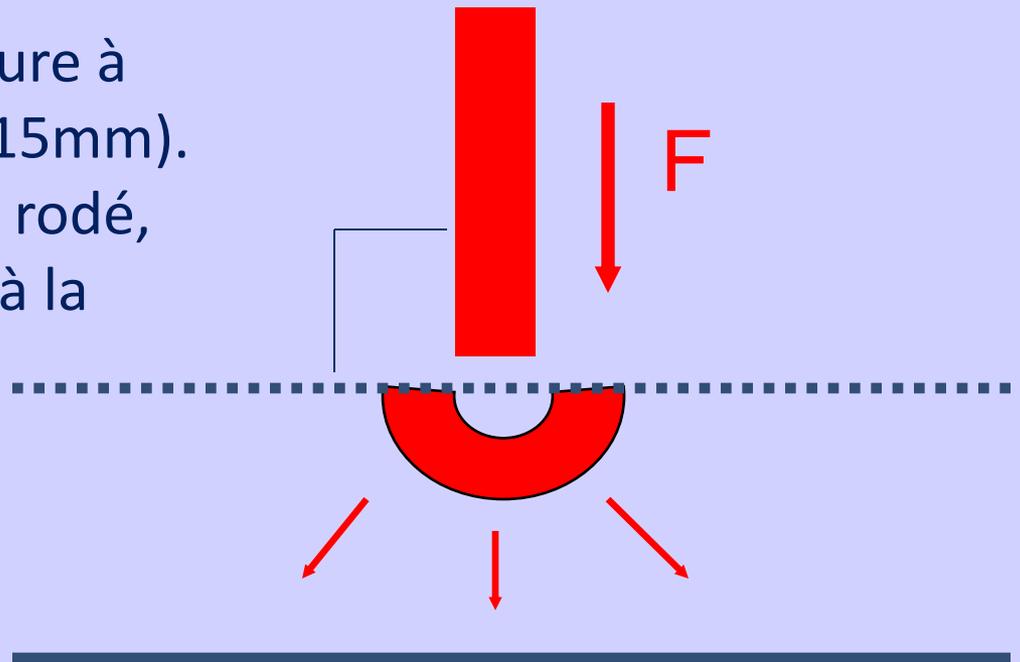




Dépôt par capillarité

Le dépôt par capillarité doit se faire par contact « léger » avec la couche pour ne pas l'endommager, et obtenir un dépôt régulier.

La pression doit être inférieure à 100g/mm^2 ($5\text{g/ext}0.3/\text{int}0.15\text{mm}$). On doit utiliser un capillaire rodé, positionné perpendiculaire à la plaque.



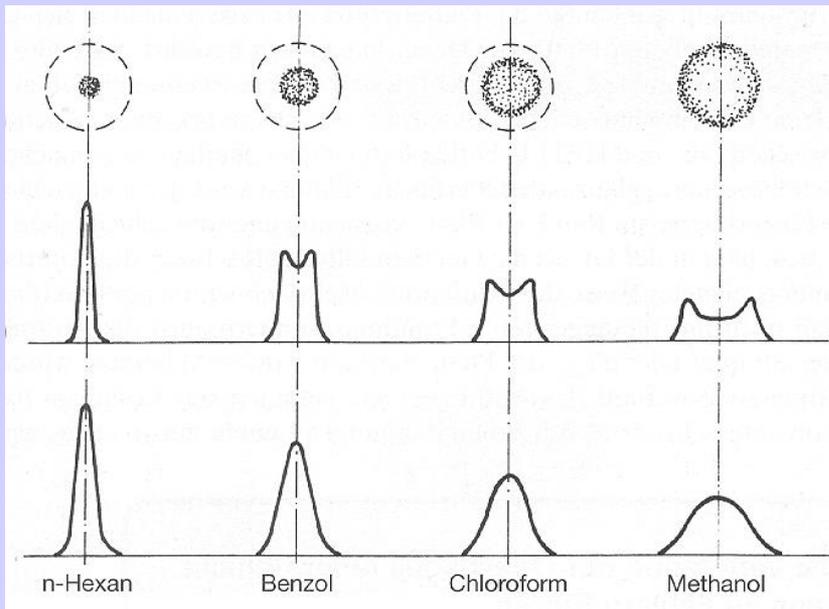
Dépôt par capillarité



Attention au choix du solvant (+volatile/-éluant).

Mettre de préférence un échantillon concentré dans un solvant dans lequel tous les constituants auraient un R_f inférieur à 0.1, afin d'obtenir un séchage rapide et le dépôt le plus fin possible.

Le dépôt ne doit pas dépasser 0.5mm de diamètre (0.3mm), et le volume de dépôt inférieur à $1\mu\text{l}$ en HPTLC et $5\mu\text{l}$ en CCM.

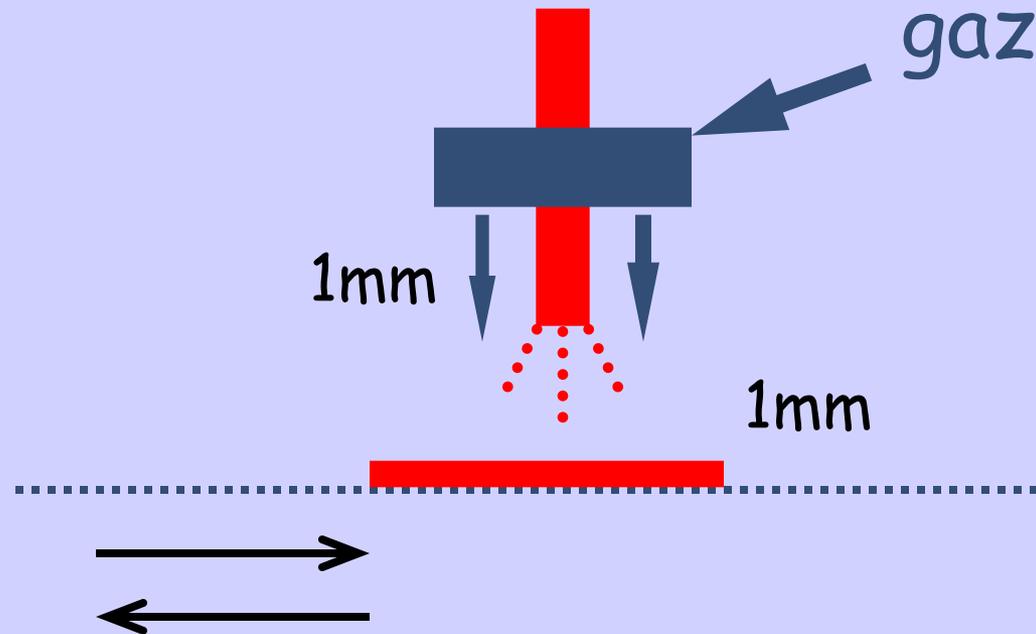
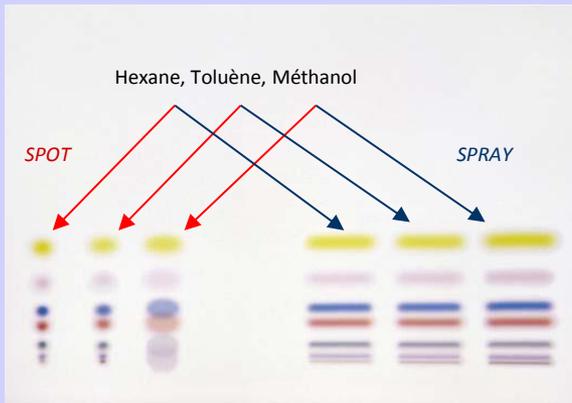


Dépôts vus par dessus, après lecture au densitomètre, avant et après migration

Dépôt par vaporisation



Pas de contact avec la plaque
Séchage des dépôts



Compatible solvants polaires et non volatils
Compatible gros volumes

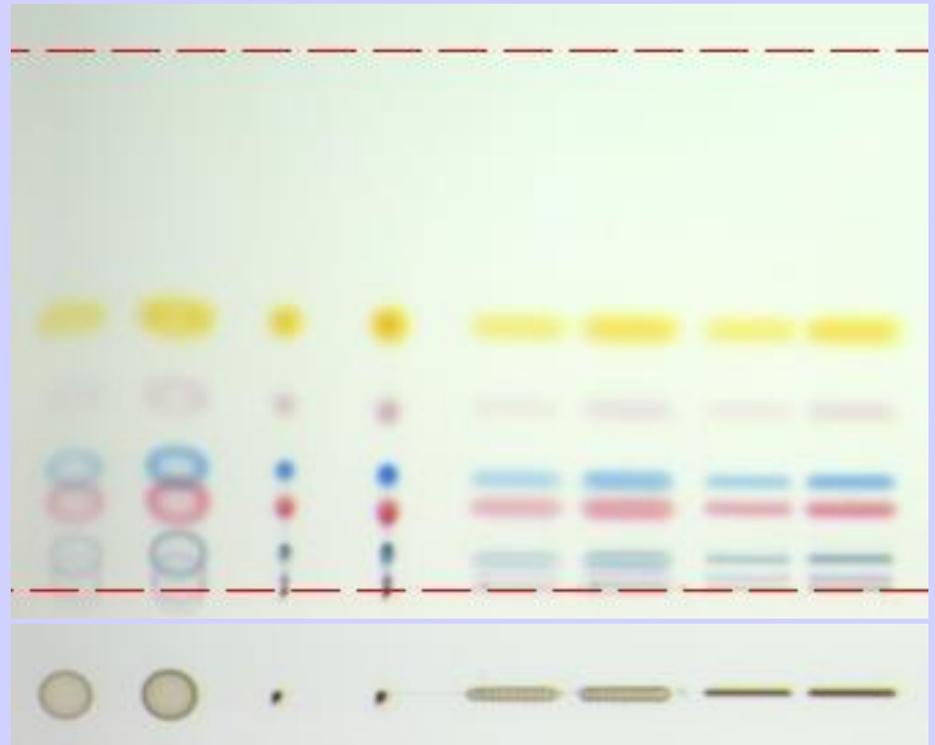
Comparaison



Il est possible de réaliser des dépôts en bandes manuellement sans vaporisation, mais dans ce cas le résultat est de qualité inférieure en particulier pour les bas R_f (hormis le temps passé...)

Dépôts après migration

Dépôts avant migration

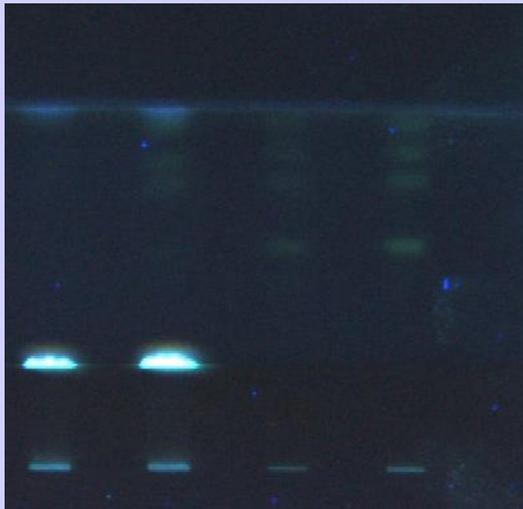


Comparaison

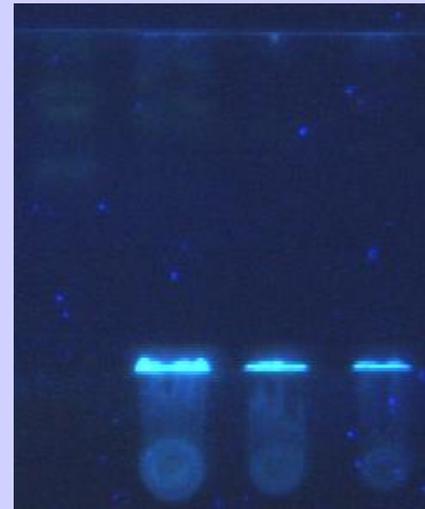


Il est possible d'obtenir des spots en bandes grâce aux plaques à zone de concentration (porosité 5000 Å) mais :

- la diffusion sera plus importante (sensibilité plus faible)
- l'homogénéité ne sera pas bonne (pas quantitatif)



Avec dépôts par
vaporisation



Avec dépôts par
capillarité

Paramètres importants



- positionnement, taille et forme
- paramètres de prélèvement et de rinçage
- paramètres du dépôt proprement dit

positionnement, taille et forme



1 le plus important : le dépôt doit se situer au dessus du niveau de solvant, juste au dessus.

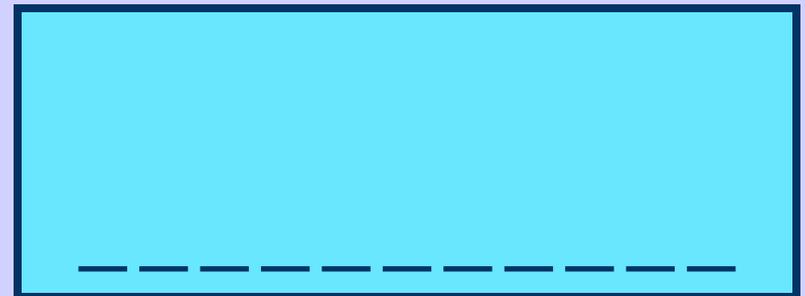
Par exemple :

niveau du solvant d'une cuve 20x10 remplie de 10 mL de solvant = 5mm environ, donc dépôt à 8mm du bas de la plaque

2 pour éviter les effets de bord sur la migration, conserver une zone de 20 mm environ libres en bord de plaque

3 il est possible d'avoir des dépôts très proches

latéralement, presque en contact

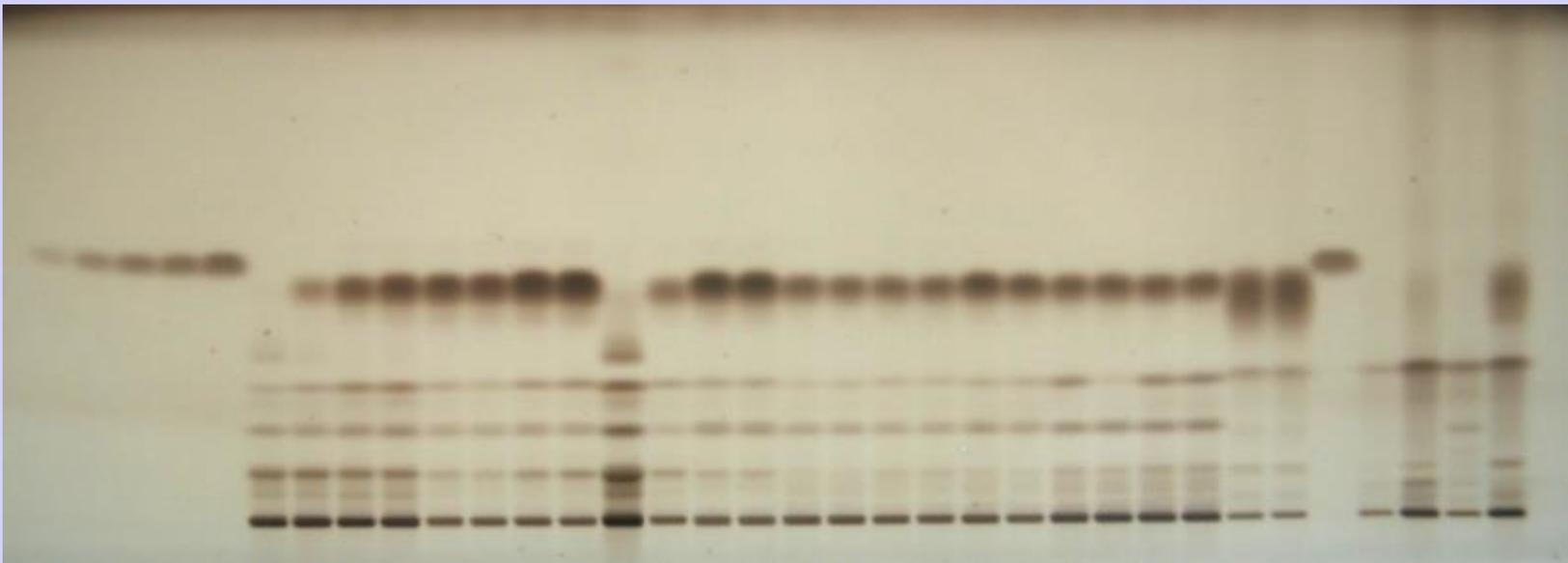


... permet optimisation HTS



30 dépôts d'extraits d'algues avec dépôts par vaporisation

C17:0 TAG (gamme de témoins de 0,2_ 0,5_ 0,75_ 1 _et 1,5 μ g) / criblage algues



Remerciements à S.Cuiné et Y Hua (CEA Cadarache)

Réglages prélèvement et rinçage

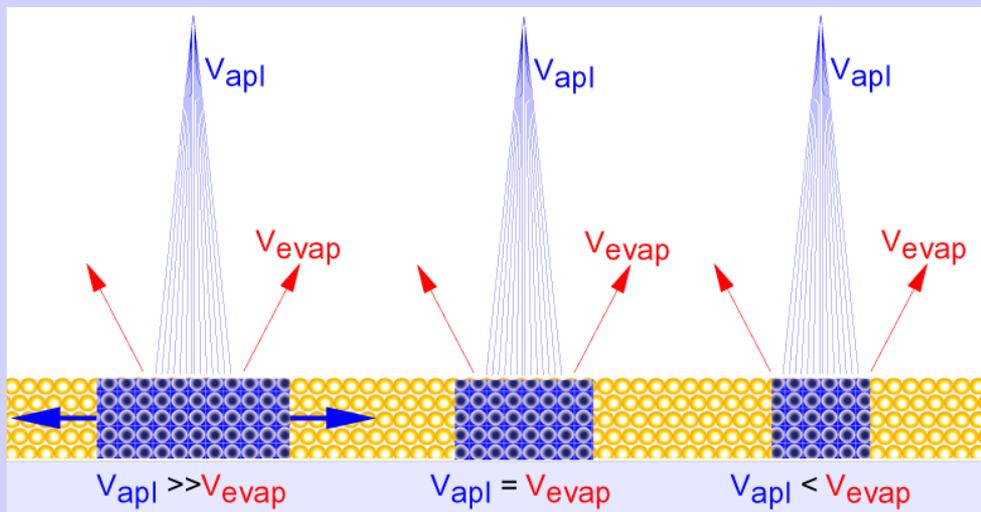


- conserver si possible le méthanol pour le solvant de rinçage
- régler les paramètres en fonction des échantillons en prenant le cas le plus défavorable
- attention si le volume d'échantillon est faible :
 - régler éventuellement le mode de rinçage
 - régler si nécessaire la profondeur de prélèvement
- bien différencier rinçage (rinsing) avec le solvant et remplissage (filling) avec l'échantillon.

paramètres du dépôt proprement dit



- vitesse de dépôt (plus vite = diffusion ?)
- chauffage (plus vite = instabilité ?)
- le ratio: taille/volume/vitesse pour les paramètres de dépôt doit rester constant pour des résultats identiques



Paramètres importants



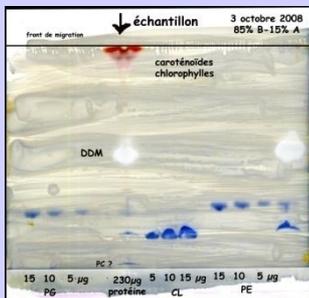
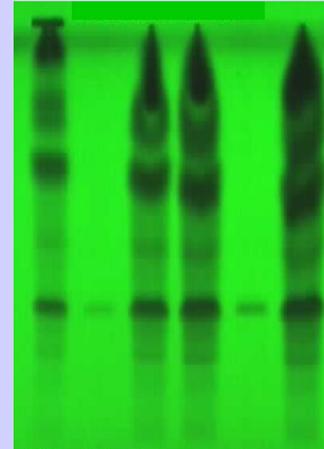
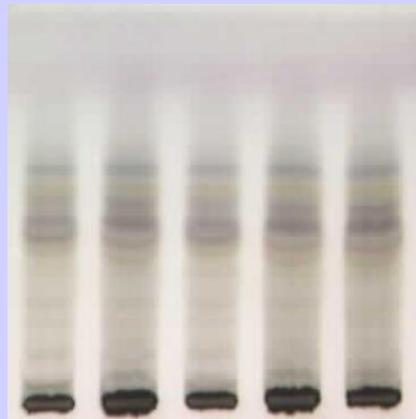
Récapitulatif des paramètres
accessibles sur le logiciel winCATS

Voir également l'aide en ligne pour
tous les paramètres (solvants de
rinçage, volumes morts,...)

Quelques artefacts



Il est toujours conseillé de bien vérifier le séchage des dépôts avant de démarrer la migration

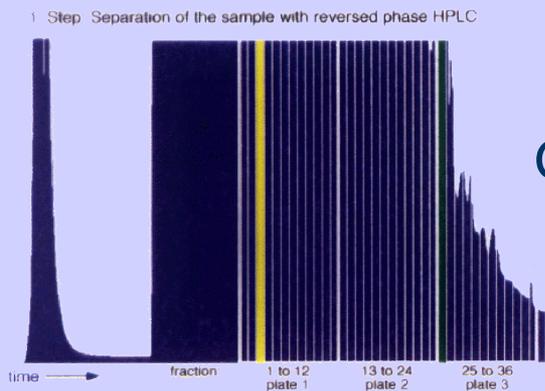


Les problèmes rencontrés ont parfois leur origine dans la qualité du dépôt et son séchage qui peut influencer secondairement la solubilité dans le solvant d'éluion



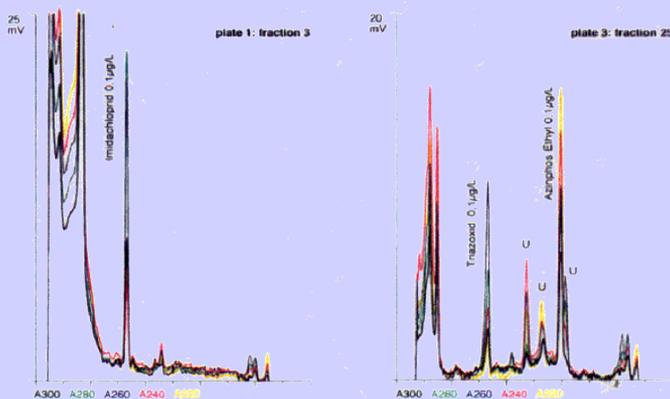
Le dépôt comme outil de couplage

Le DUOCHROM, appareil de couplage HPLC-AMD a été commercialisé par Camag en 1990 représente l'optimum en matière de couplage chromatographique liquide.

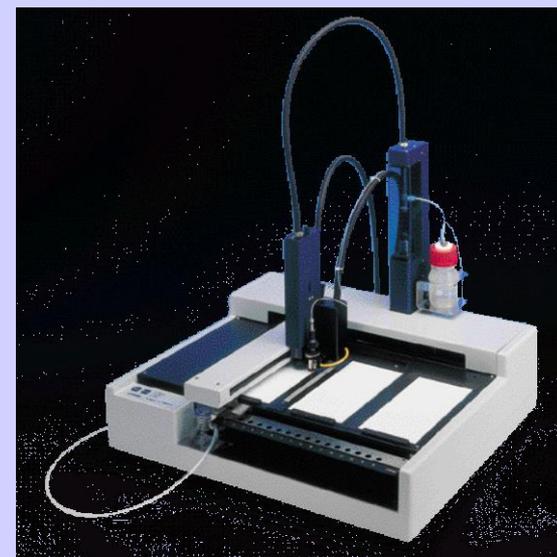


Gradient RP LC

2 Step: Separation of fractions from HPLC with AMD on silica



Gradient AMD Si

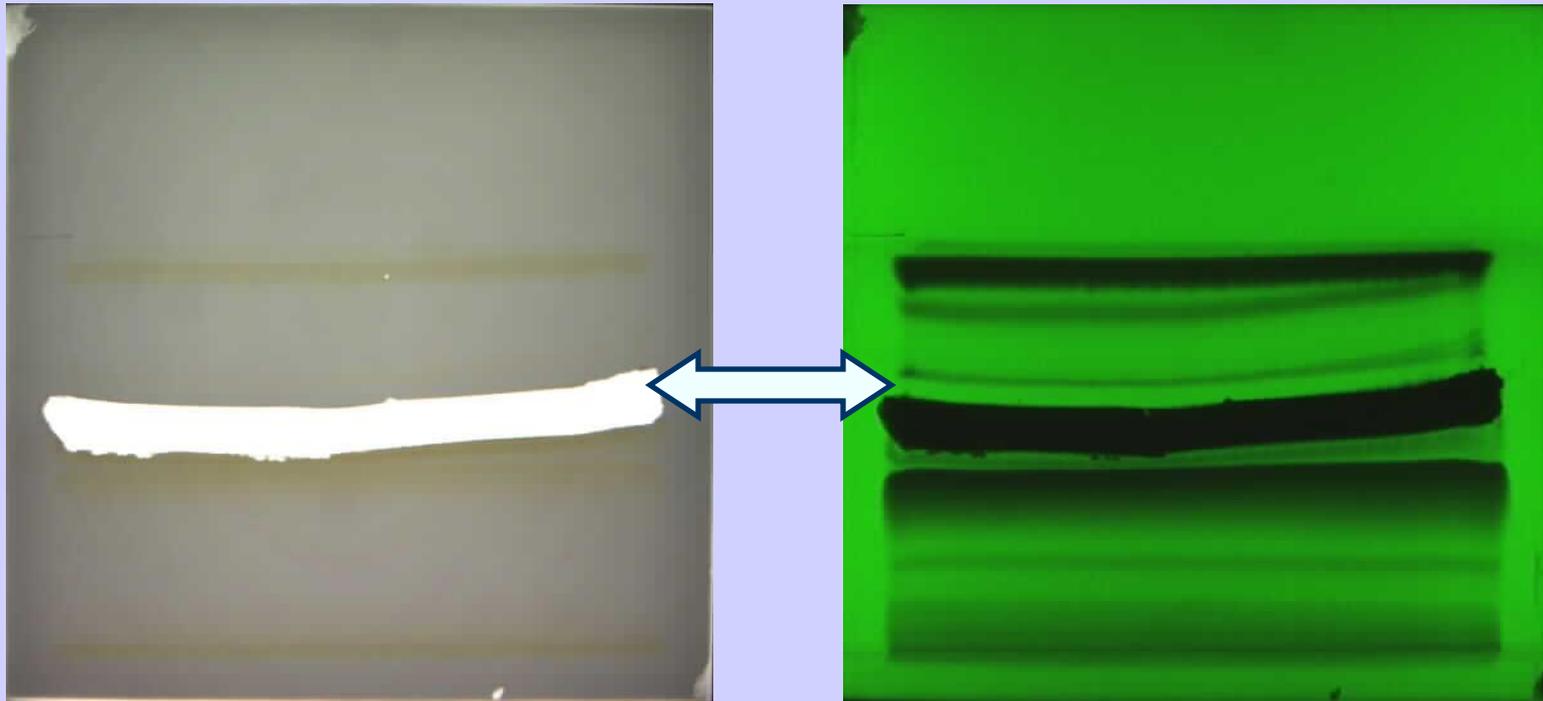


Duochrom

Le dépôt comme outil de purification



Isolement de 120 mg sur plaque de 0,5 mm à partir d'un dépôt de 160 mg d'échantillon issu de chimie parallèle (sous lumière visible et UV à 254 nm).



Le rendement est 4 à 5 x supérieur à un dépôt manuel.

Le dépôt comme outil d'identification

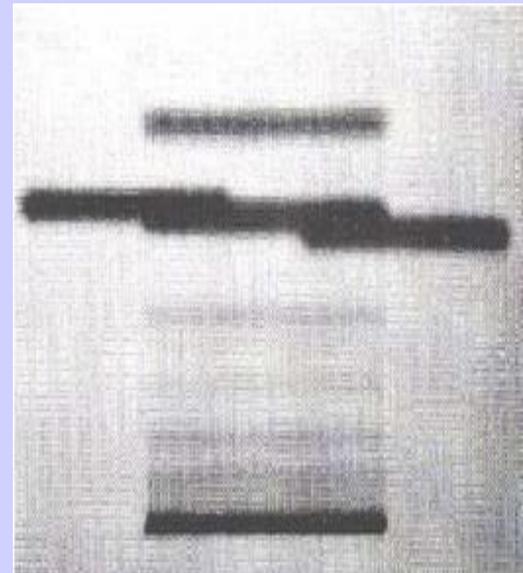


Par le dépôt, il est possible d'enlever un doute sur l'identification d'une molécule par un dépôt partiellement superposé de l'échantillon et de la référence témoin.

Substances
identiques



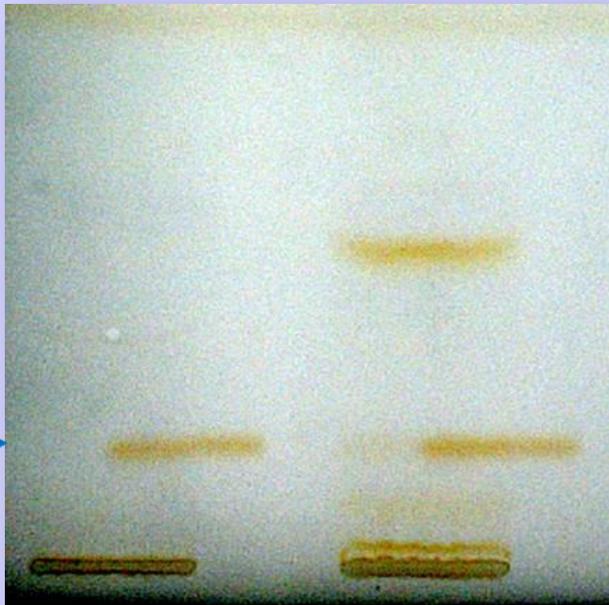
Substances
différentes





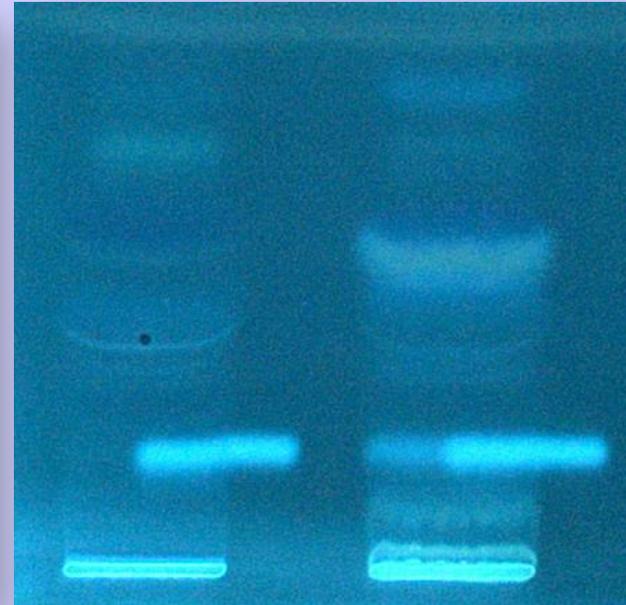
Exemple d'identification

Présence de lactose (ou dérivé) à une teneur $\leq 10\text{mg}/100\text{g}$ (0,01%) de produit lacté



Käseländer
Paprika-Jalapero

Ziegenkäse
Natur



Käseländer
Paprika-Jalapero

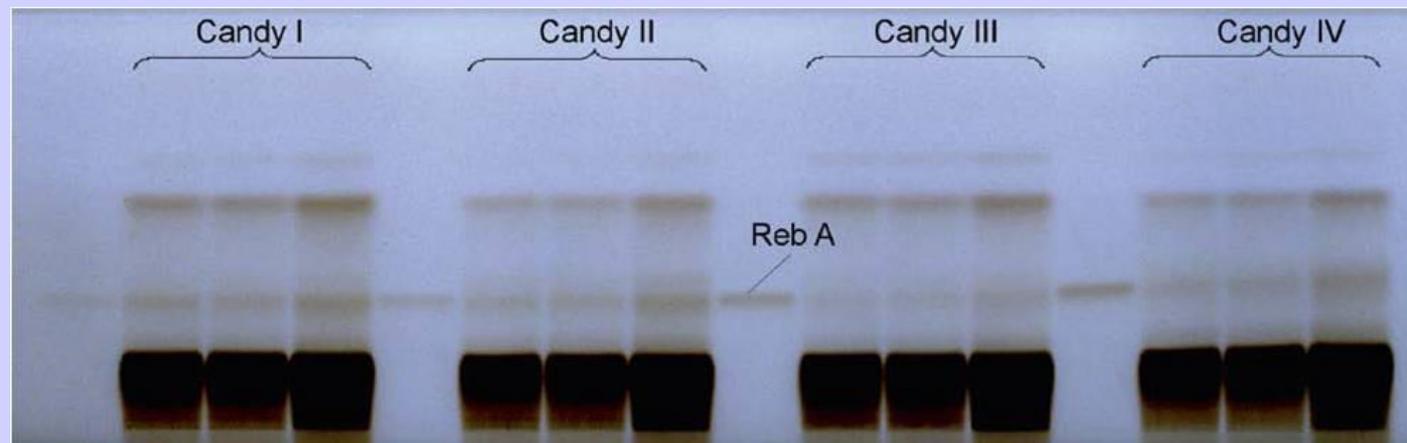
Ziegenkäse
Natur

Un outil de préparation d'échantillon



Il est possible de réaliser la préparation d'échantillon et la séparation en une seule étape, grâce aux possibilités du dépôt par vaporisation.

Stéviolosides dans bonbons Candy

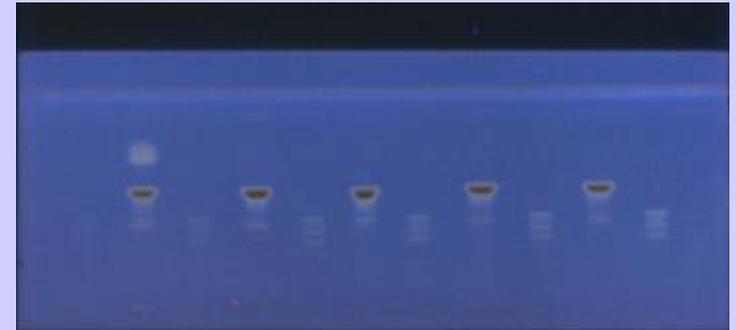


Remerciements à **Gerda Morlock**

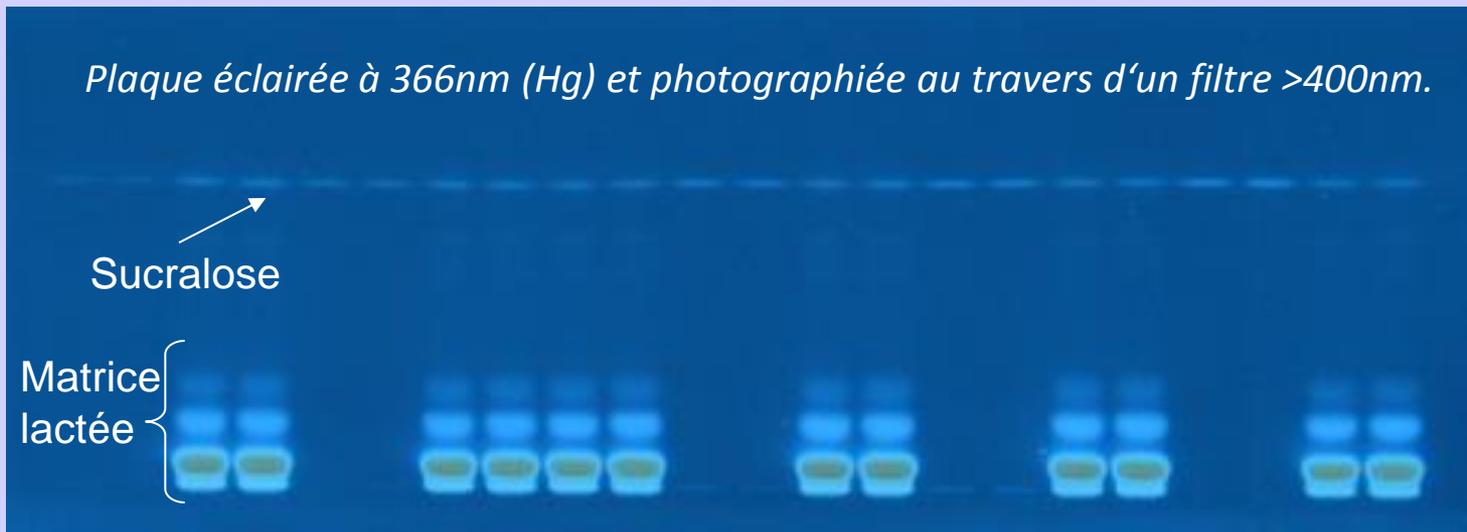
Un outil de préparation d'échantillon



Le domaine des sucres est particulièrement représentatif de ce type d'application compte tenu de la matrice.



Sucres dans la mélasse (A-81.2)



Sucralose dans les caramels

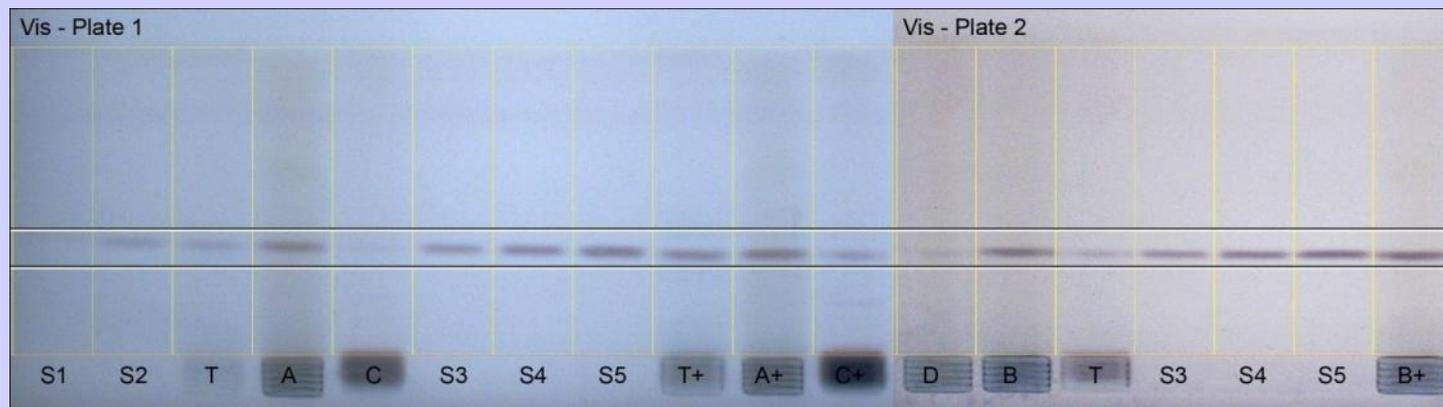
Remerciements à **Gerda Morlock**

Un outil de préparation d'échantillon



L'utilisation du dépôt en particulier en rectangle peut se justifier pour augmenter la sensibilité.

Sucralose dans les effluents (eau), avec l'HPTLC-Vis en alternative aux méthodes isotopiques ou HPLC-ToF ou MS-MS

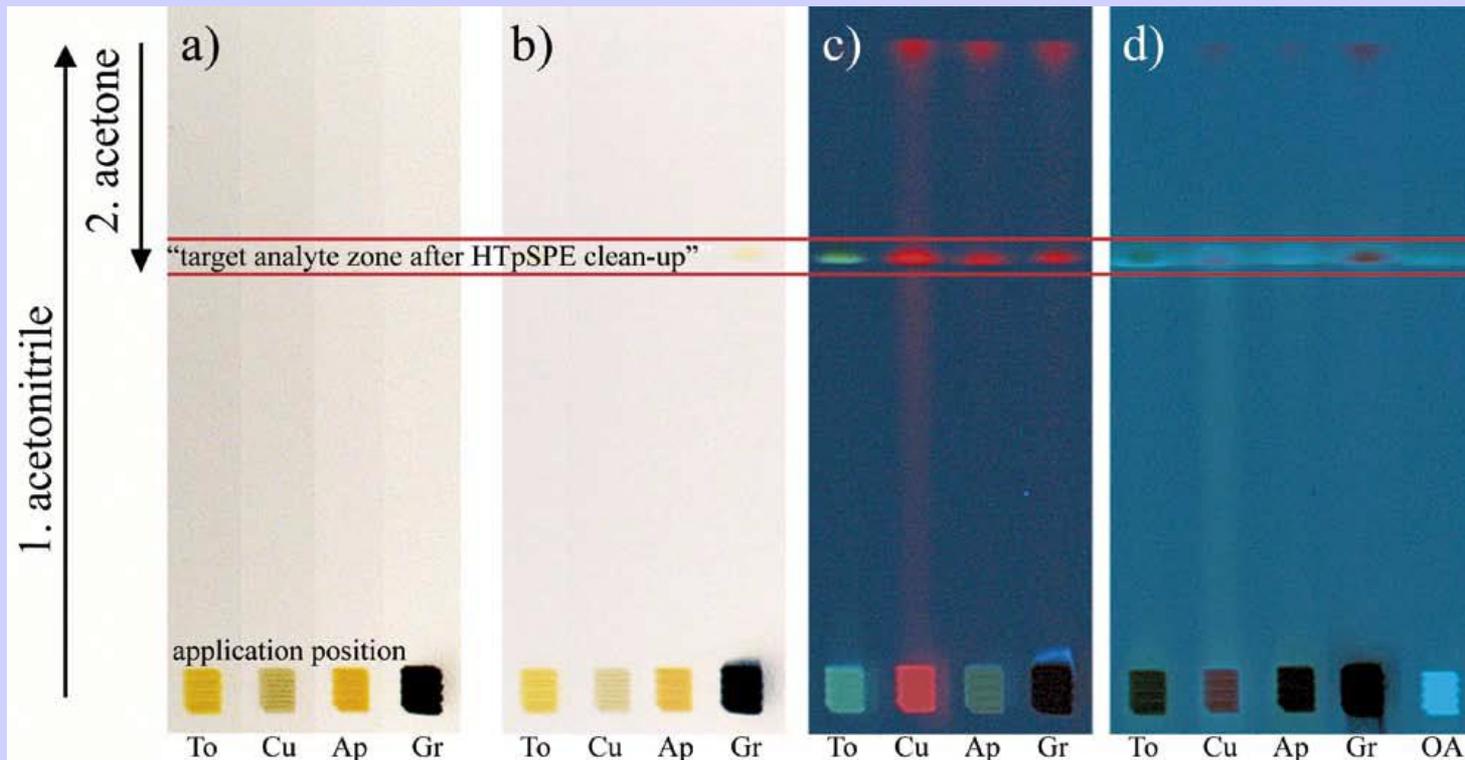


Mean value (ng/L)	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D
HPLC-TOF or -MS/MS (n = 6 laboratories)	5869	7302	186	200
HPTLC-Vis (n = 2)	5863	7034	247	218

Un outil de préparation d'échantillon



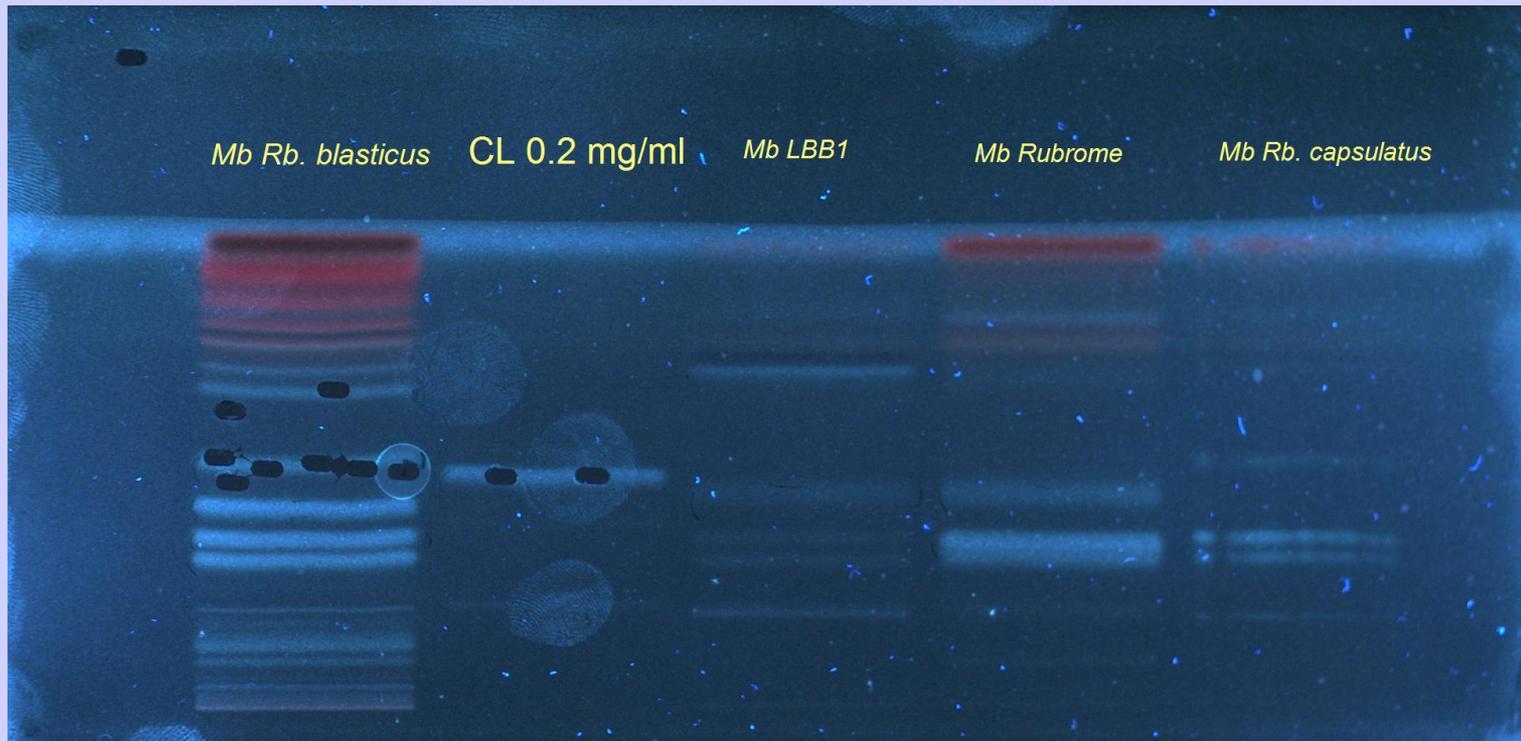
Pour l'analyse des résidus de pesticides dans différentes matrices. La plaque est l'étape préliminaire à l'extraction par l'interface masse de la zone contenant les analytes recherchés.





Pour le couplage avec la masse

Un dépôt plus long (30mm) permet plusieurs analyses sur la même bande, pour augmenter la sensibilité en RMN ou différencier des substances insuffisamment résolues en SM.



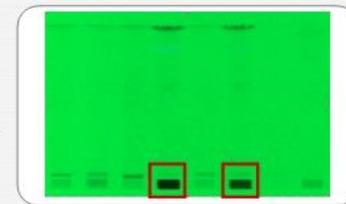
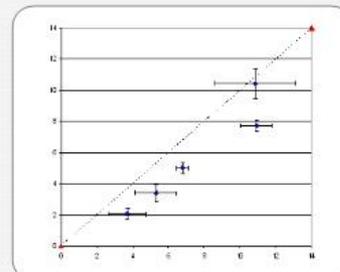
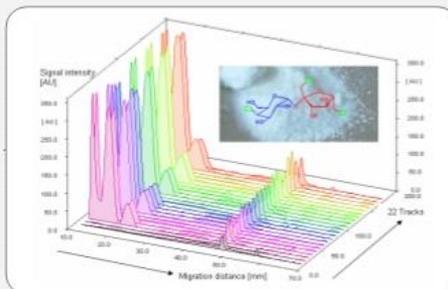
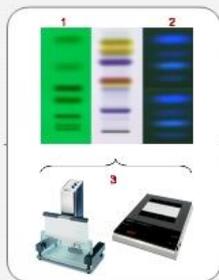
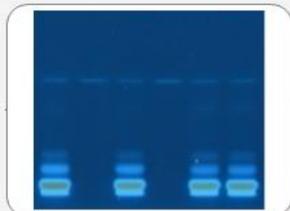
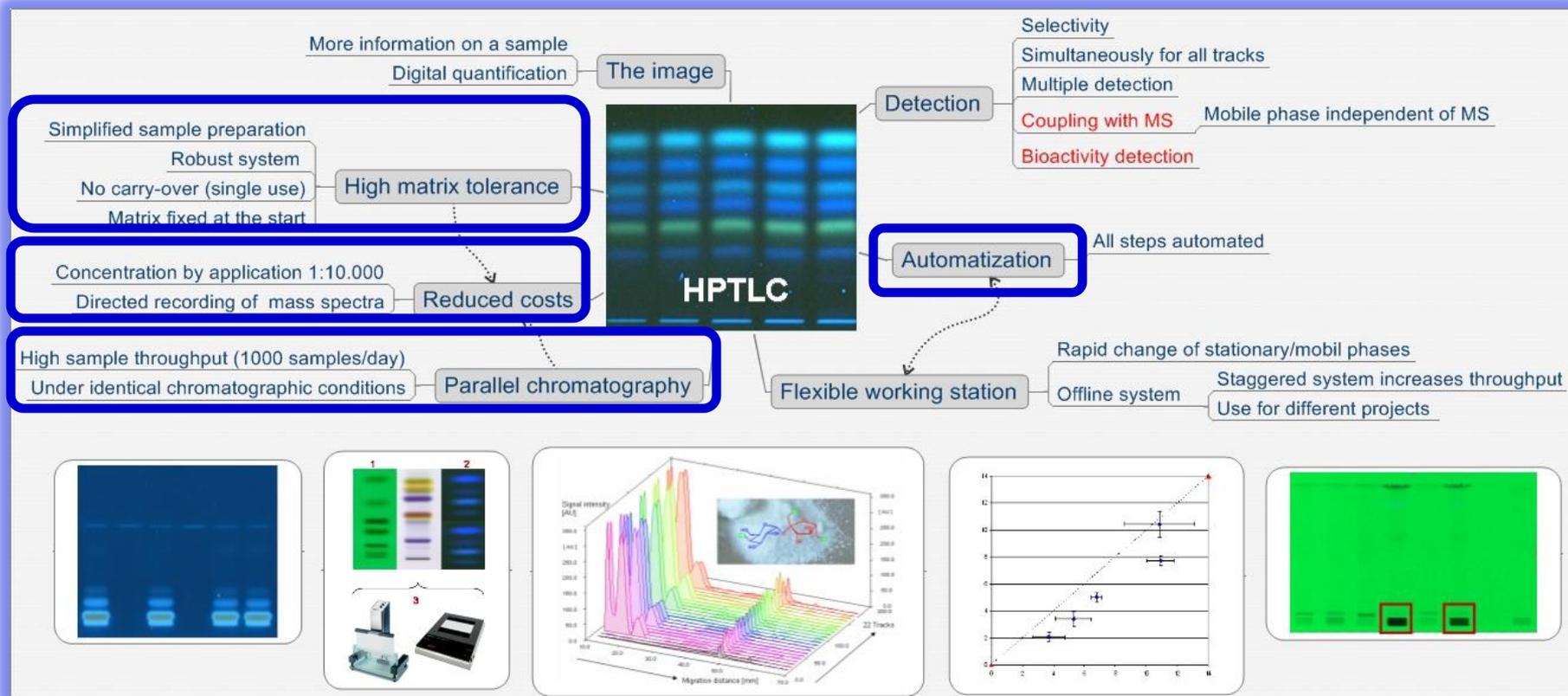
... et bien d'autres possibilités



- ...
 - une gamme de dépôts en volume (0.2 à 20 μL = x100) évite la préparation de dilutions de la solution de référence , pour une analyse quantitative
 - la révélation pré-chromatographique peut se réaliser en déposant le réactif par-dessus le dépôt d'échantillon ou de témoin
 - L'ajout de matrice pour la détection en SM Maldi peut se faire également par dépôt de matrice superposé au produit séparé à analyser.
- ... et d'autres méthodes de dépôt (lipides de vaisseaux sanguins)



HPTLC : divers avantages



G.Morlock, Analytica 2008 "Separations in a 3/8 time (3/8 min) with 300 μ L as dancing partner or 1000 runs per day"

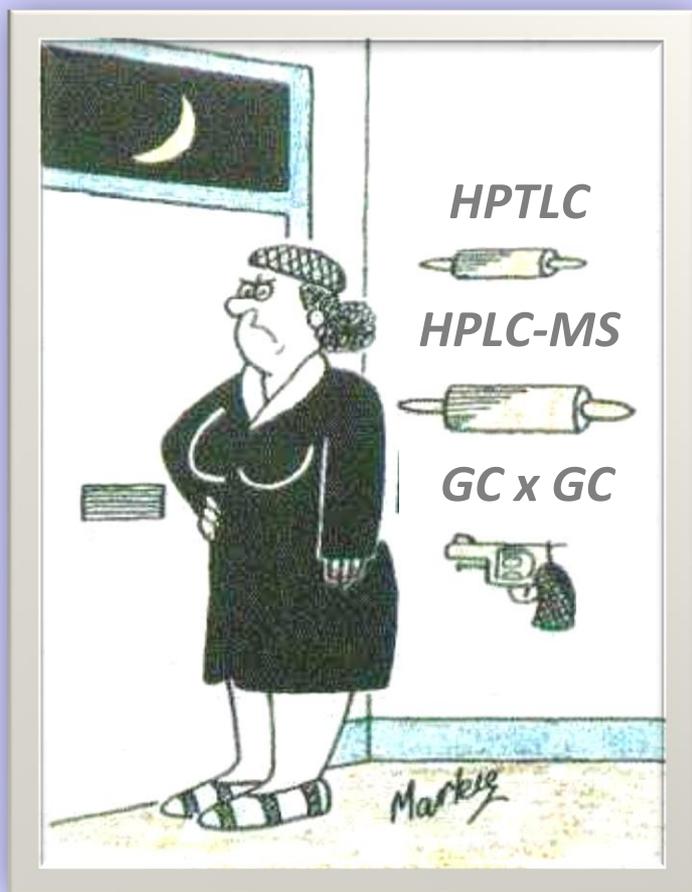


Conclusion : importance du dépôt

- une étape primordiale pour la suite de l'analyse
- un certain nombre de paramètres à maîtriser
- une grande variété d'applications basées sur les possibilités du dépôt, analytiques quantitatives, de purification et comme préparation d'échantillon
- il reste encore des possibilités inexplorées au niveau des couplages directs avec la plaque comme milieu de séparation et réaction



Why more analytical laboratories are using HPTLC today ?...



May be because they are just trying to use an optimized analytical solution to a given question

