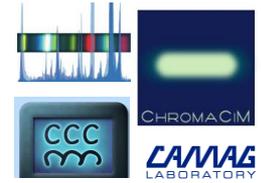


Chromatographie Couche Mince Haute Performance

**Mise au point du solvant : approche
pratique et questions fréquentes**

La plaque

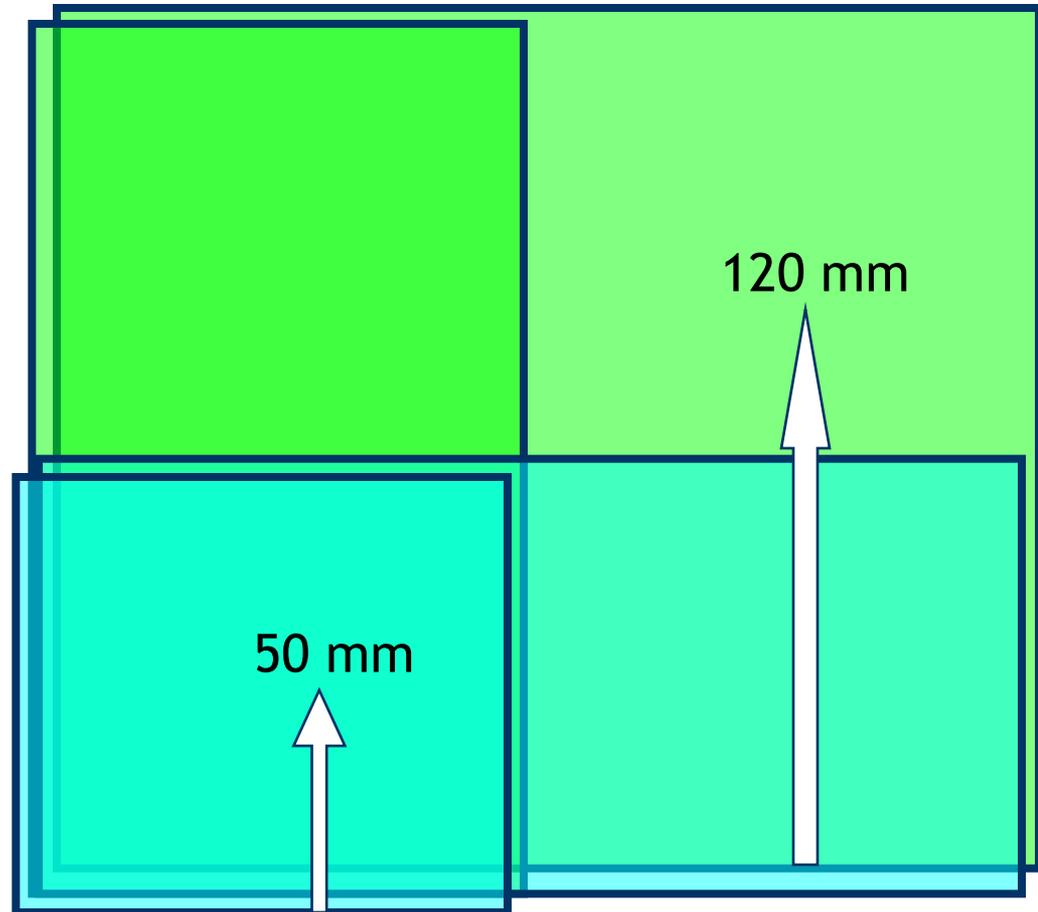


■ CCM :

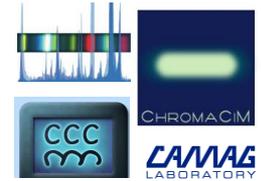
Taille 20x20 ou 10x20
Migration sur 120 à 150 mm
Granulométrie 12 μm
Répartition large
Épaisseur 250 μm
Peu sensible
Pas quantitative

■ HPTLC :

Taille 10x10 ou 20x10
Migration sur 50 mm
Granulométrie 7 μm
Répartition étroite
Épaisseur 200 μm
Sensible et quantitative
Coût x 1.2

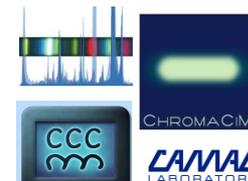


Les plaques de silice greffée

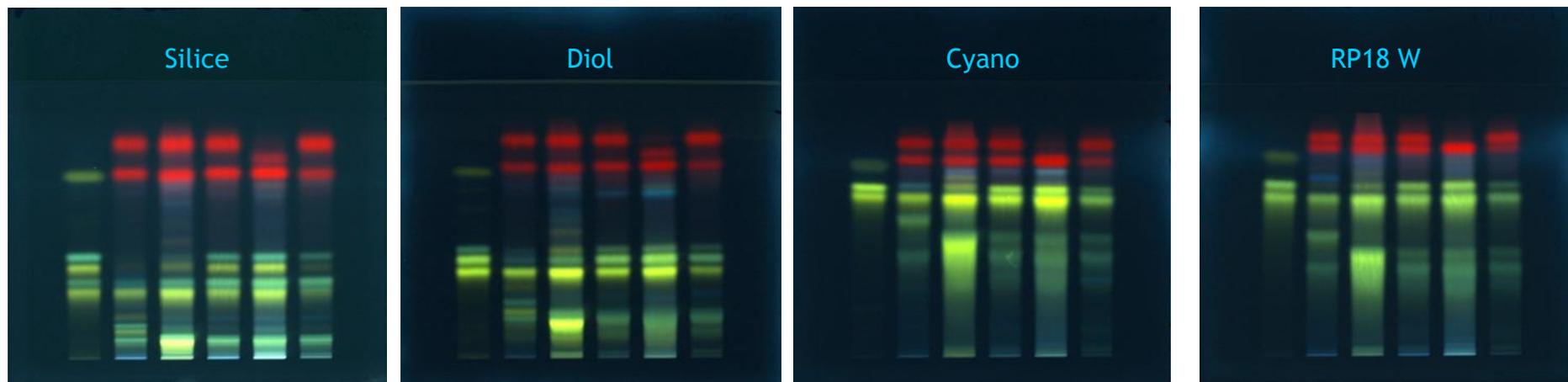


- Ordre des polarités : Silice, Diol, NH₂, CN, RP2, RP8, RP18w, RP18.

Les plaques de silice greffée



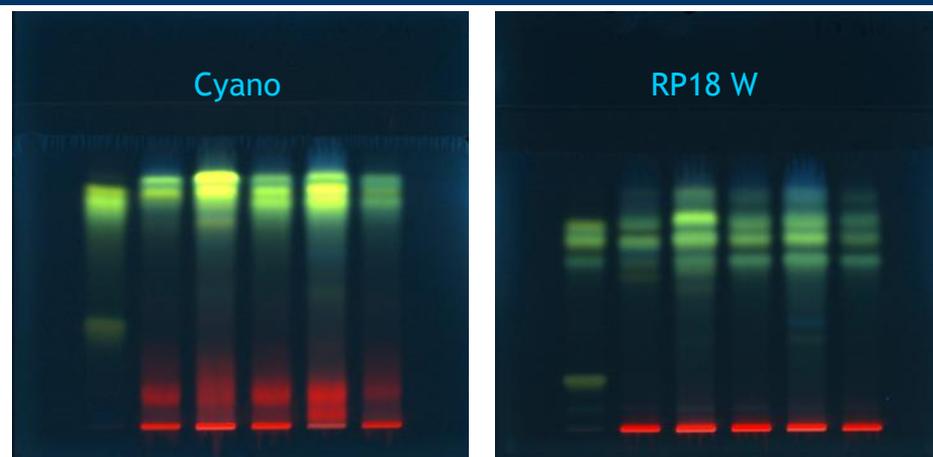
Phase normale



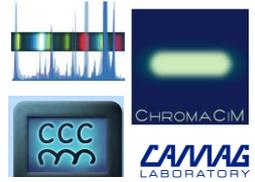
Solvants de migration : Normal = THF, toluène, acide formique, eau (24:12:3:1.5) Inverse = méthanol, acide formique, eau (5.5:1:4.5).

Un témoin contenant : Vitexine, orientine, isovitexine, isoorientine, chrysin et 5 échantillons de Fleurs de la Passion

Phase inverse

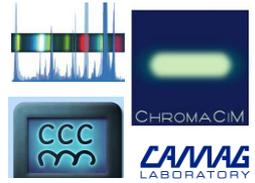


Choix des plaques



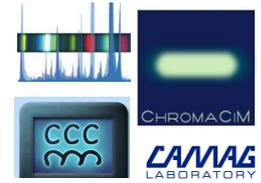
- Energies d'interaction
(rétention des molécules en Kj/mole) :
 - *van der Waals* 5-20
 - *dipôle* 8-25/25-40
 - *liaison Hydrogène* 25-40
 - *liaison ionique* 250-1050
 - (*covalente* 670-3360)

Choix des plaques

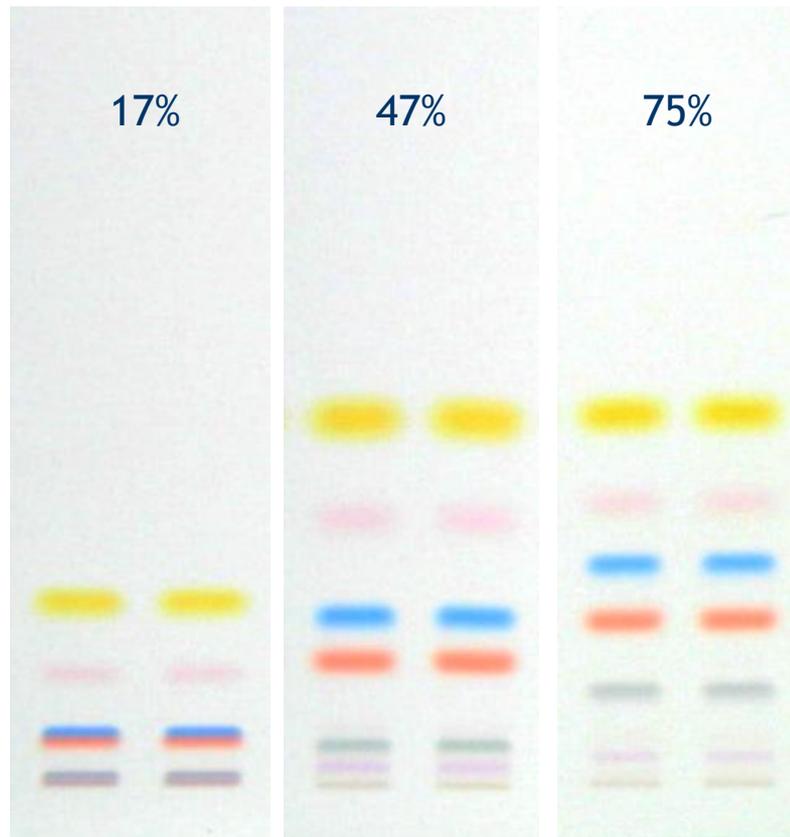


- Que choisir ?
 - *Silice = 80%, mais attention à l'humidité*
 - *Diol pour éviter l'humidité et les pics traînants*
 - *RP lorsque les substances trop polaires restent au Rf0 (W=100% H2O)*
 - *NH2 échange d'ions et révélation par chauffage*
 - *CN vraiment intermédiaire*
 - *Chir pour les diastéréoisomères des dérivés d'Ac.Aminés*
 - *Attention à la pérennité et la reproductibilité des autres phases*

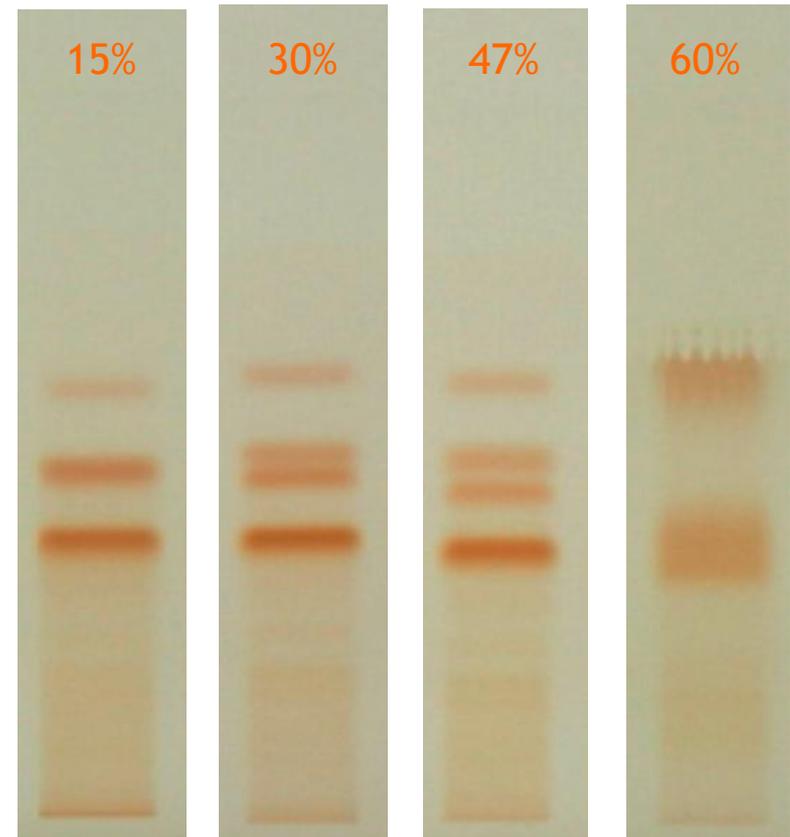
Influence de l'humidité sur la Silice



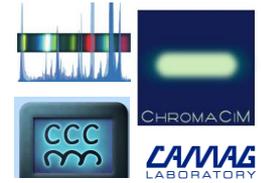
- *Colorants, solvant : toluène*



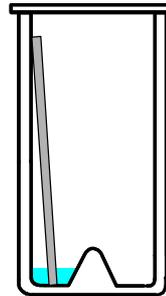
- *Polyphénols du thé, solvant : toluène, acétone, acide formique (4.5:4.5:1)*



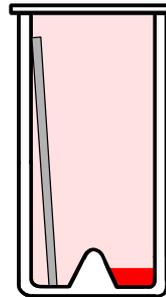
Modes de migration



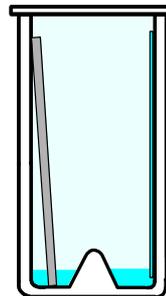
■ Sandwich



■ Sans saturation de la cuve

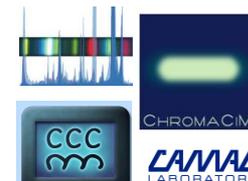


■ Avec saturation de la cuve et pré conditionnement de la plaque

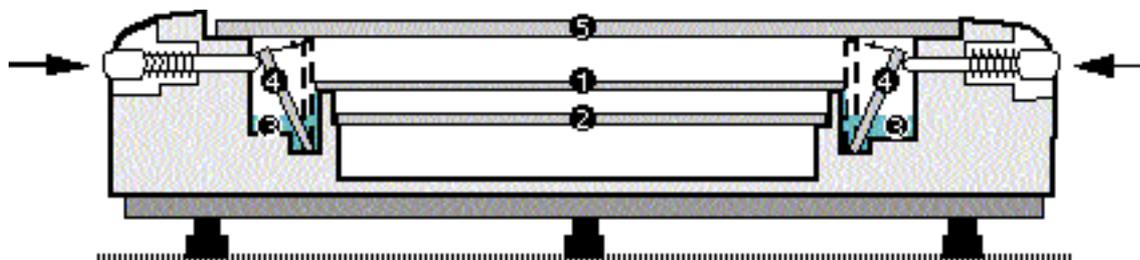


■ Avec saturation de la cuve

Paramètres influençant le Rf



- La cuve horizontale est un outil qui permet de contrôler aisément la phase vapeur.

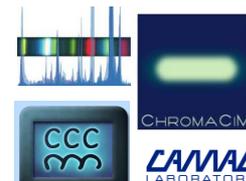


1 HPTLC Silice vers le bas; 2 contre plaque; 3 solvant; 4 lamelle de contact au démarrage; 5 plaque de fermeture

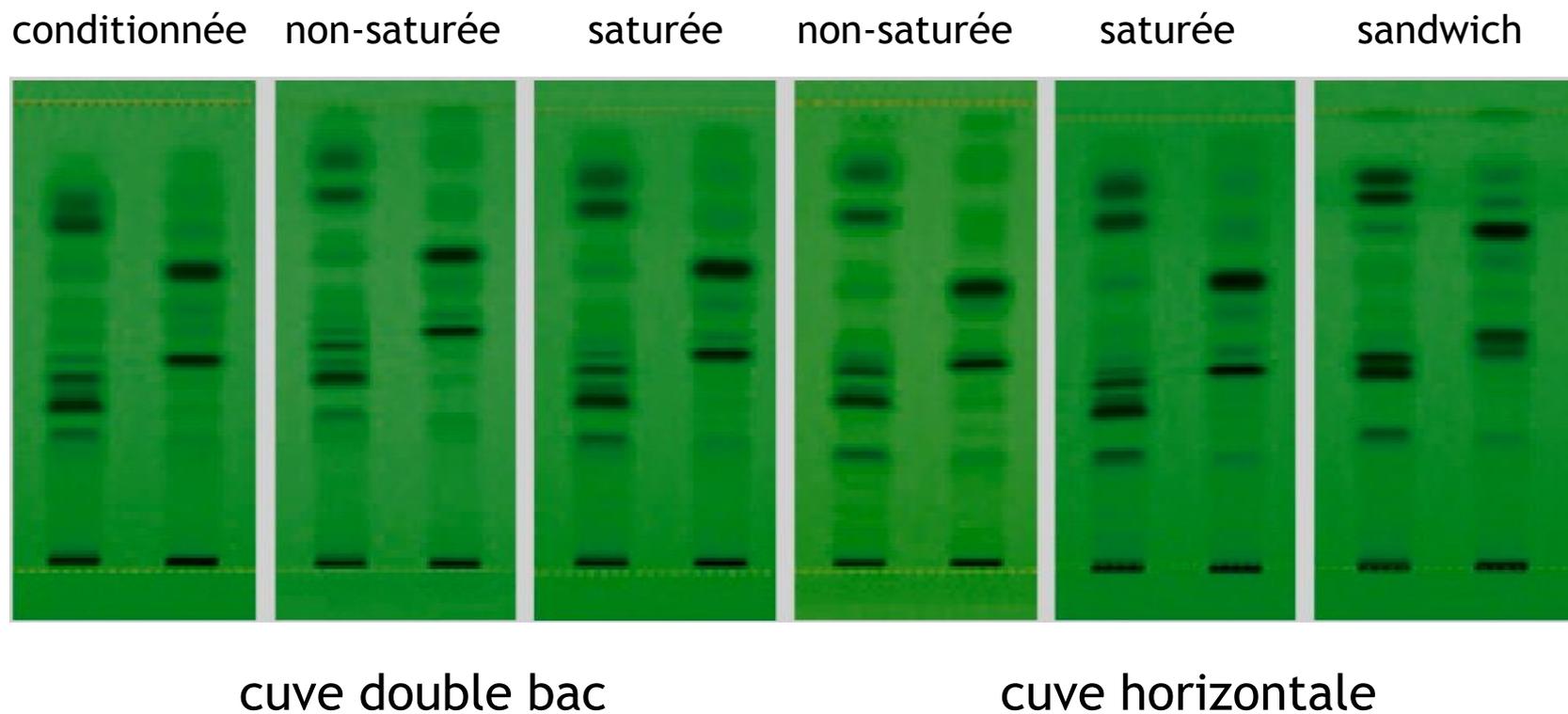


- Le choix du mode de migration est également facilité.

Paramètres influençant le Rf



- Exemple 'comparatif'



Paramètres influençant le Rf



- Exemple 'comparatif'

conditionnée



saturée



non-saturée



conditionnée



non-saturée



sandwich

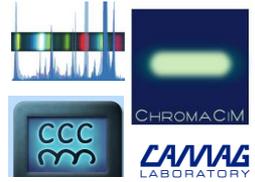


cuve double bac

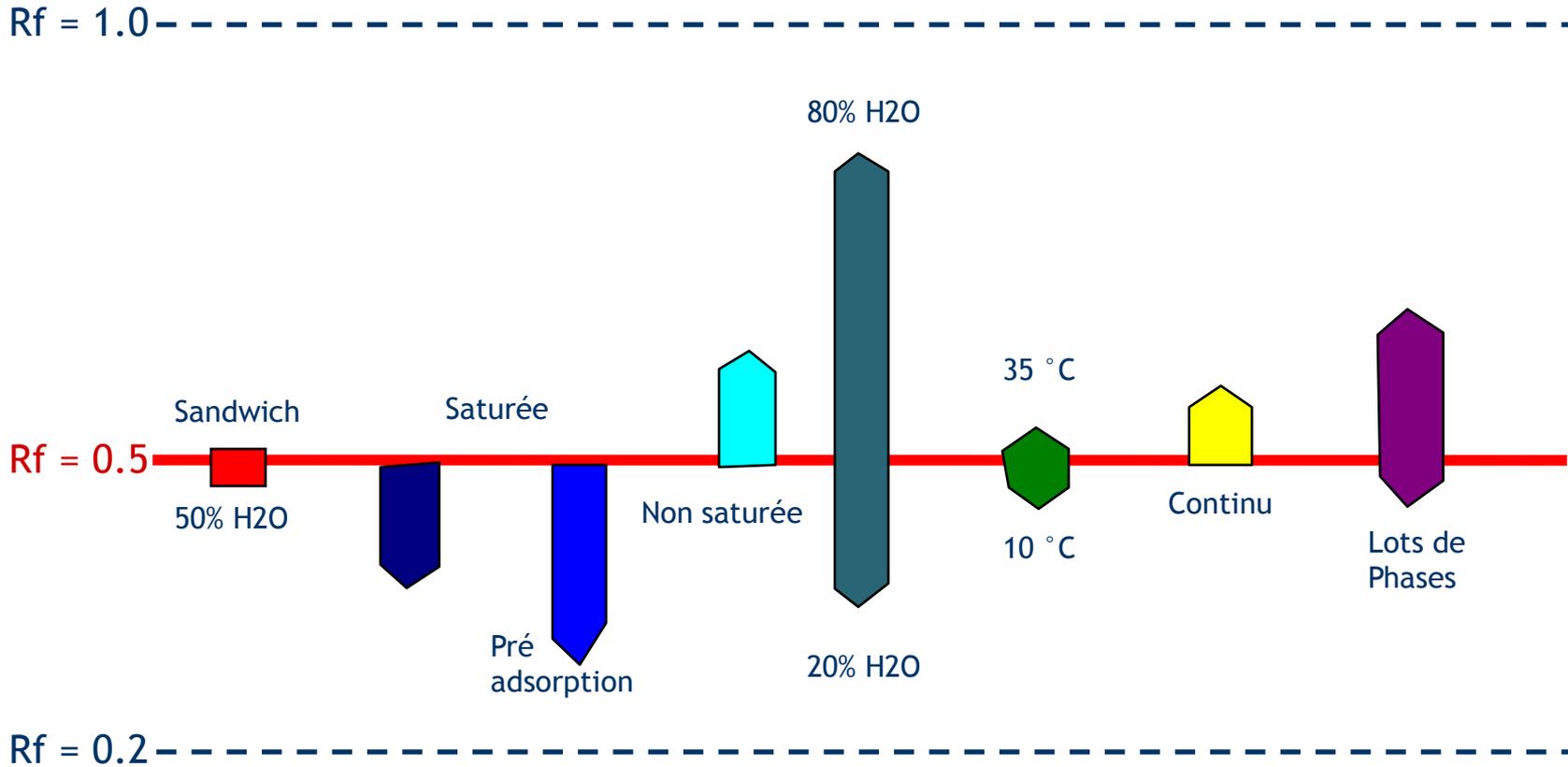
cuve horizontale

- plaque HPTLC SI 60, toluène - acétate d'éthyle - a.acétique (70 : 33 : 3); de gauche à droite : *Schisandra chinensis*, *Schisandra sphenanthera*.

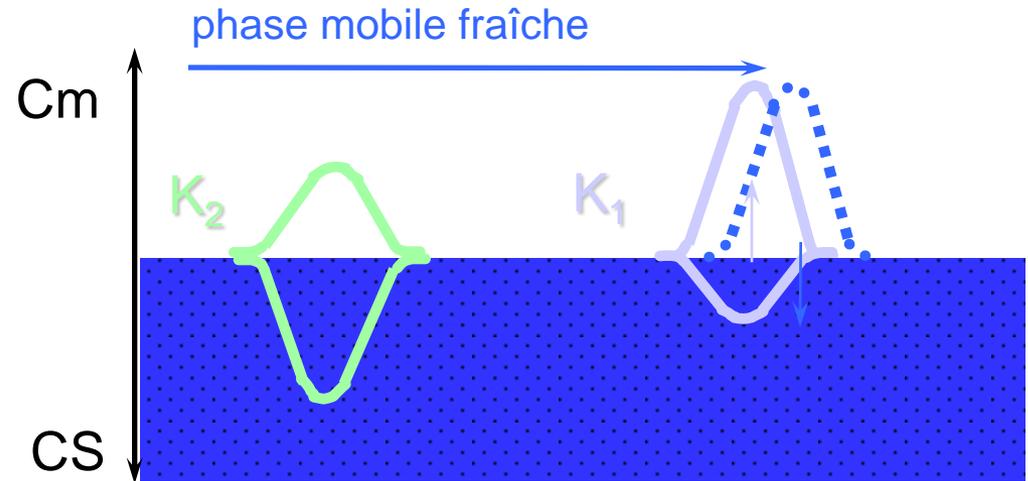
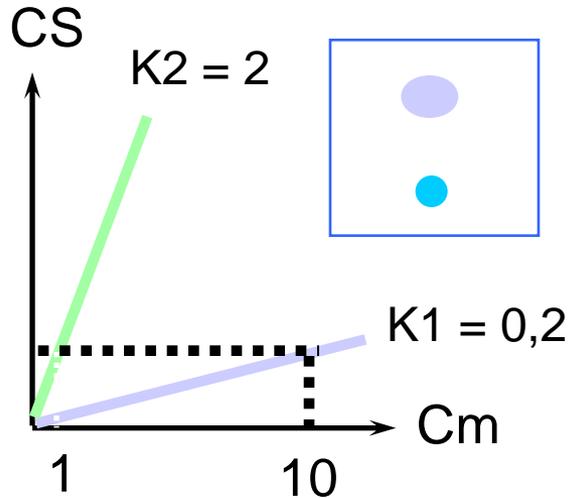
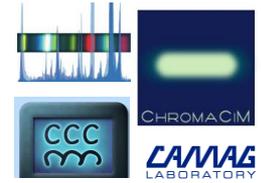
Paramètres influençant le Rf



- Tableau récapitulatif (en chromatographie d'absorption)



Isothermes de partition-adsorption

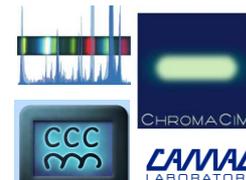


$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

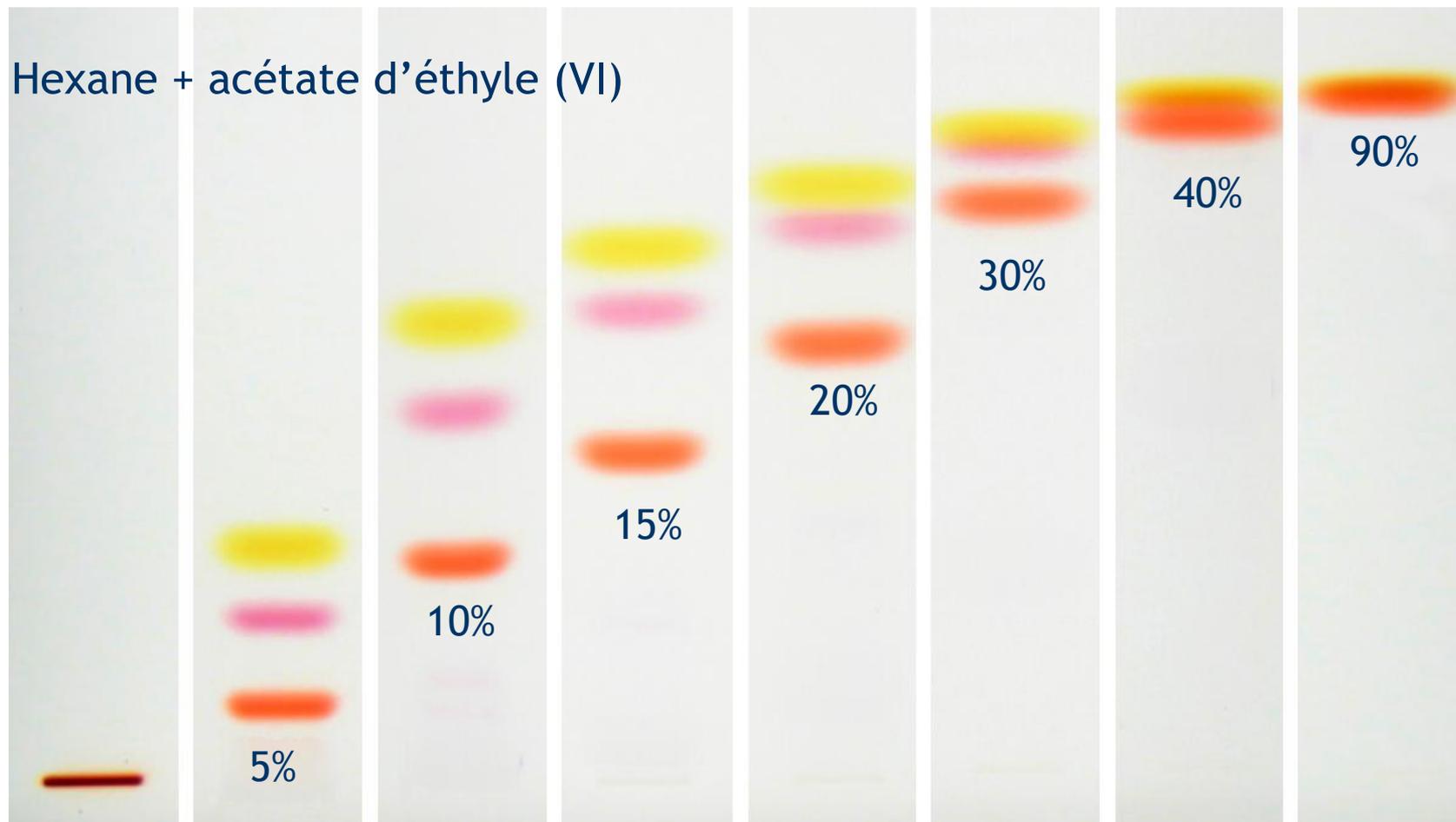
sélectivité $\alpha = \frac{K_1}{K_2}$

K coefficient de distribution, de partage
 C_s concentration dans la phase stationnaire
 C_m concentration dans la phase mobile

Force éluante et sélectivité du solvant



Hexane + acétate d'éthyle (VI)



Les forces éluantes ne sont pas additives

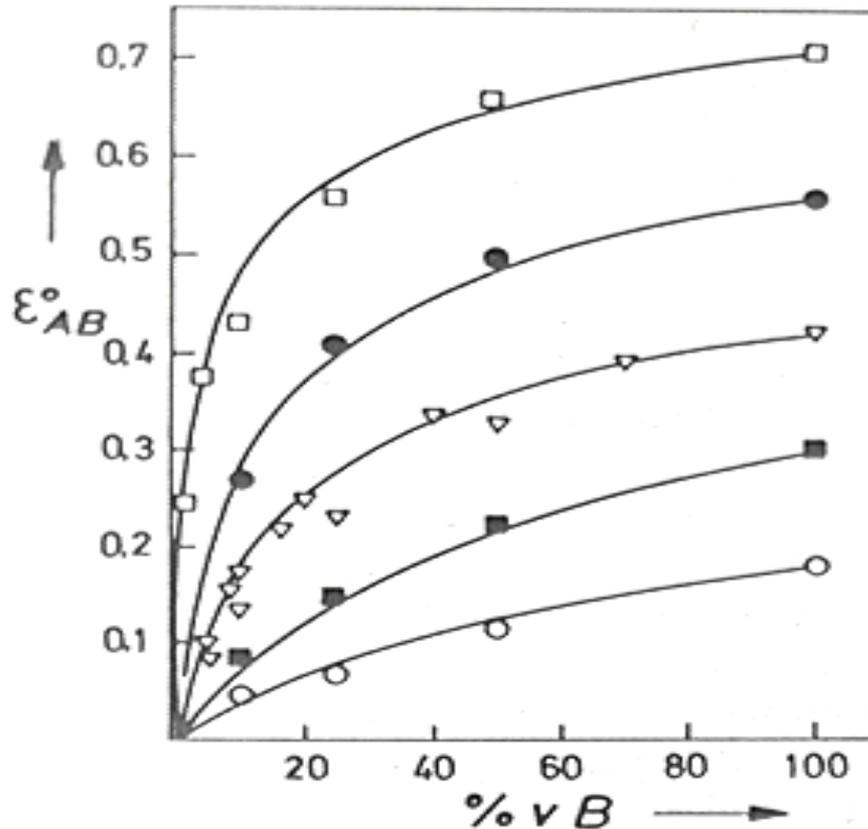
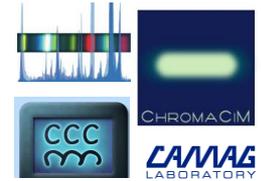


Figure 106. Solvent strengths of binary mixtures A/B. A is always n-pentane. \circ = CCl_4 , \blacksquare = n-propylchloride, Δ = CH_2Cl_2 , \bullet = acetone, \square = pyridine.

- Données originales (F.Geiss)

Force éluante et sélectivité du solvant

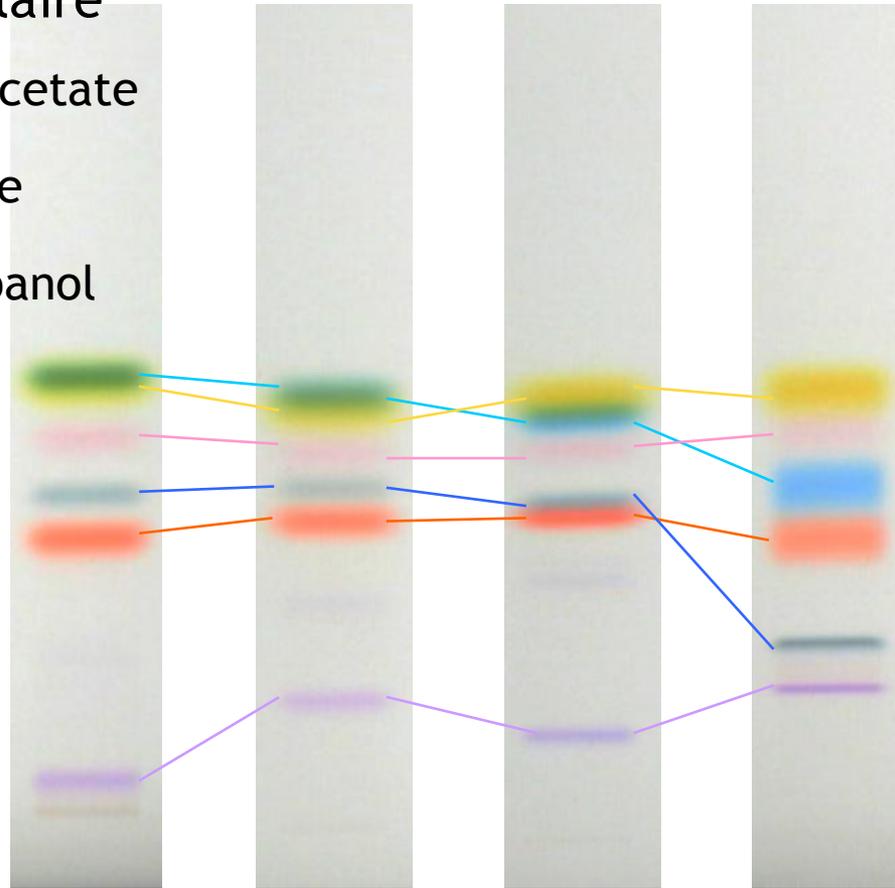
Comparaison de solvants
de force éluante similaire

a) Hexane + 15% ethyl acetate

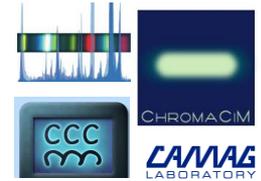
b) Hexane + 20% acetone

c) Hexane + 10% isopropanol

d) Chloroform pur



Force éluante et sélectivité



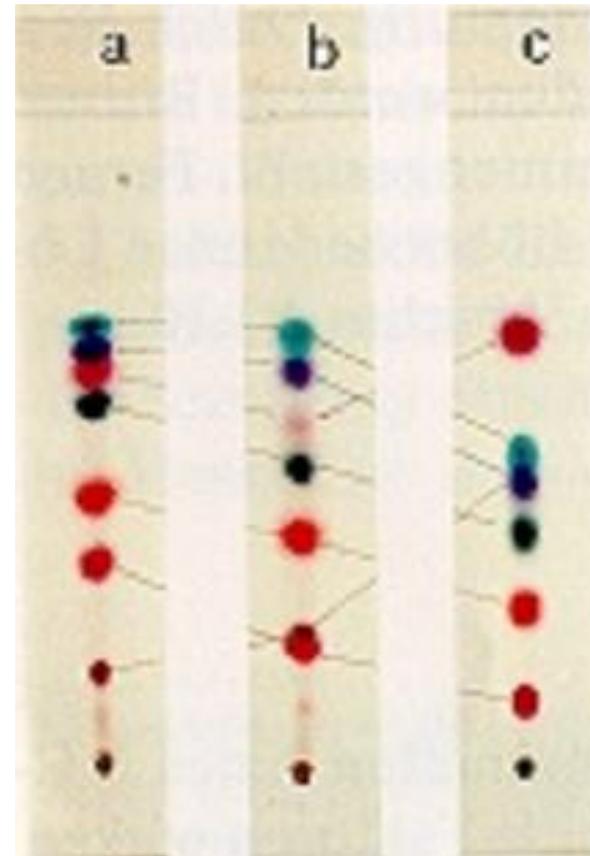
Comparaison de la migration
de solvants à force éluante

$\varepsilon_{0A,B} = 0,18$ sur plaque
d'aluminium à 58 % r.h.

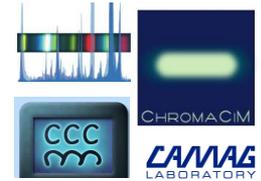
a) 7,1 % acétate d'éthyle
/hexane

b) 9,53 % acétone /hexane

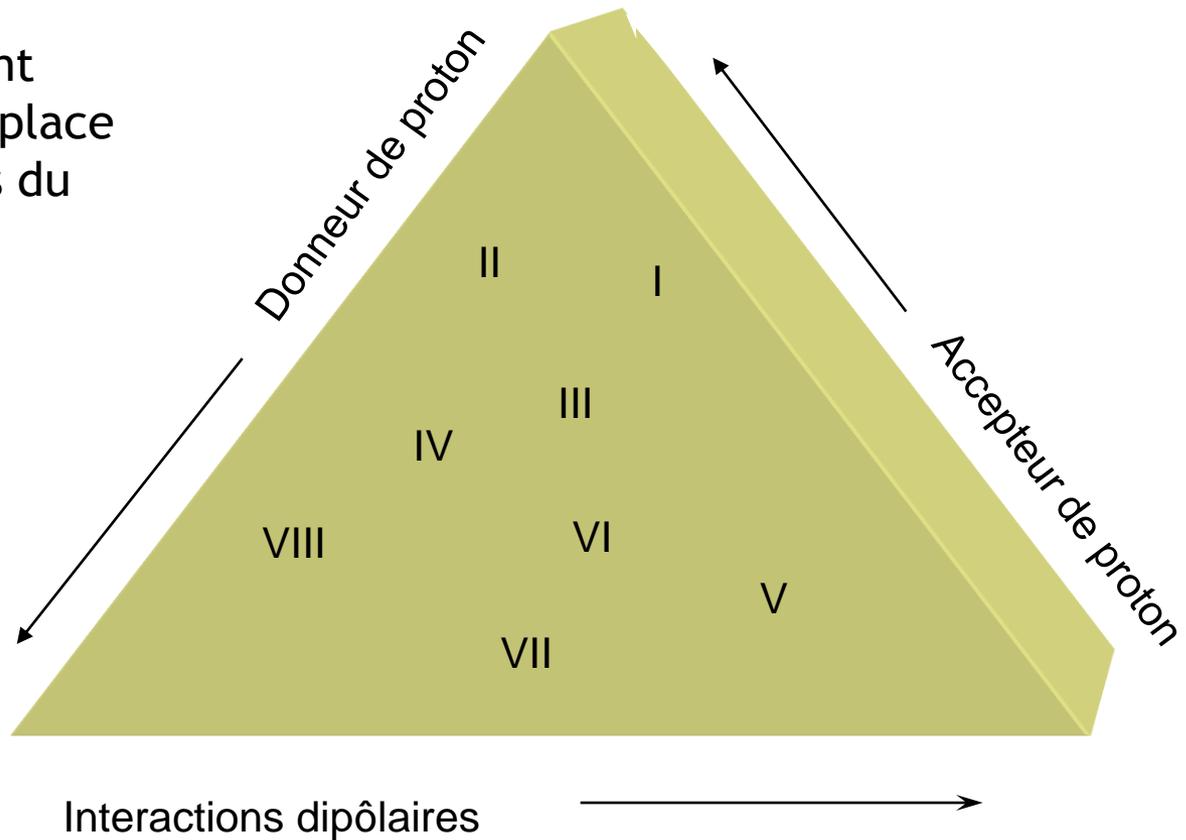
c) 29,9 % toluène /hexane



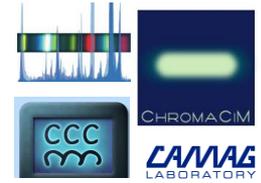
Triangle de sélectivité de Snyder



Les valeurs varient
lorsqu'on se déplace
vers les pointes du
triangle

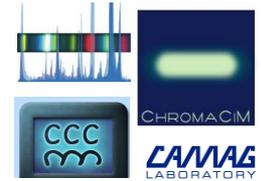


Groupes de sélectivité



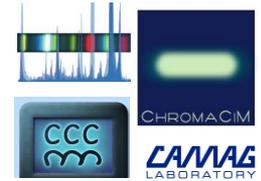
- I Ethers aliphatiques, triakylamines
- II Alcools aliphatiques
- III Pyridine, THF, DMSO, DMF, Diéthylène glycol
- IV Alcool benzylique, Ethylène glycol, acide acétique, formamide
- V CH_2Cl_2 , Dichloréthane
- VI Cétones, Esters, Dioxane, Nitriles
- VII Hydrocarbures aromatiques (halogénés), Composés nitrés
- VIII Ethers aliphatiques, triakylamines, trialkylphosphates

Tableau des groupes sur Silice



| Group | Solvent | Solvent strength |
|------------|----------------------|------------------|
| Decreasing | n-Hexane | 0 |
| I | n-Butyl ether | 2,1 |
| | Isopropyl ether | 2,4 |
| | Methyl-t-butyl ether | 2,7 |
| | Diethyl ether* | 2,8 |
| II | n-Butanol | 3,9 |
| | 2-Propanol* | 3,9 |
| | 1-Propanol | 4,0 |
| | Ethanol* | 4,3 |
| | Methanol | 5,1 |
| III | Tetrahydrofuran* | 4,0 |
| | Pyridin | 5,3 |
| | Methoxyethanol | 5,5 |
| | Dimethyl formamid | 6,4 |

Tableau des groupes sur Silice



| ... | Solvent | Solvent strength |
|------|--------------------|------------------|
| IV | Acidic acid* | 6,0 |
| | Formamide | 9,6 |
| V | Dichloromethan | 3,1 |
| | 1,2-Dichloroethan | 3,5 |
| VI | Ethylacetate* | 4,4 |
| | Methyl ethyl keton | 4,7 |
| | Dioxane* | 4,8 |
| | Acetone | 5,1 |
| | Acetonitrile | 5,8 |
| VII | Toluene* | 2,4 |
| | Nitrobenzene | 4,4 |
| VIII | Chloroform* | 4,1 |
| | Nitromethan | 6,0 |
| | Water | 10,2 |

Optimisation en Phase Inverse RP

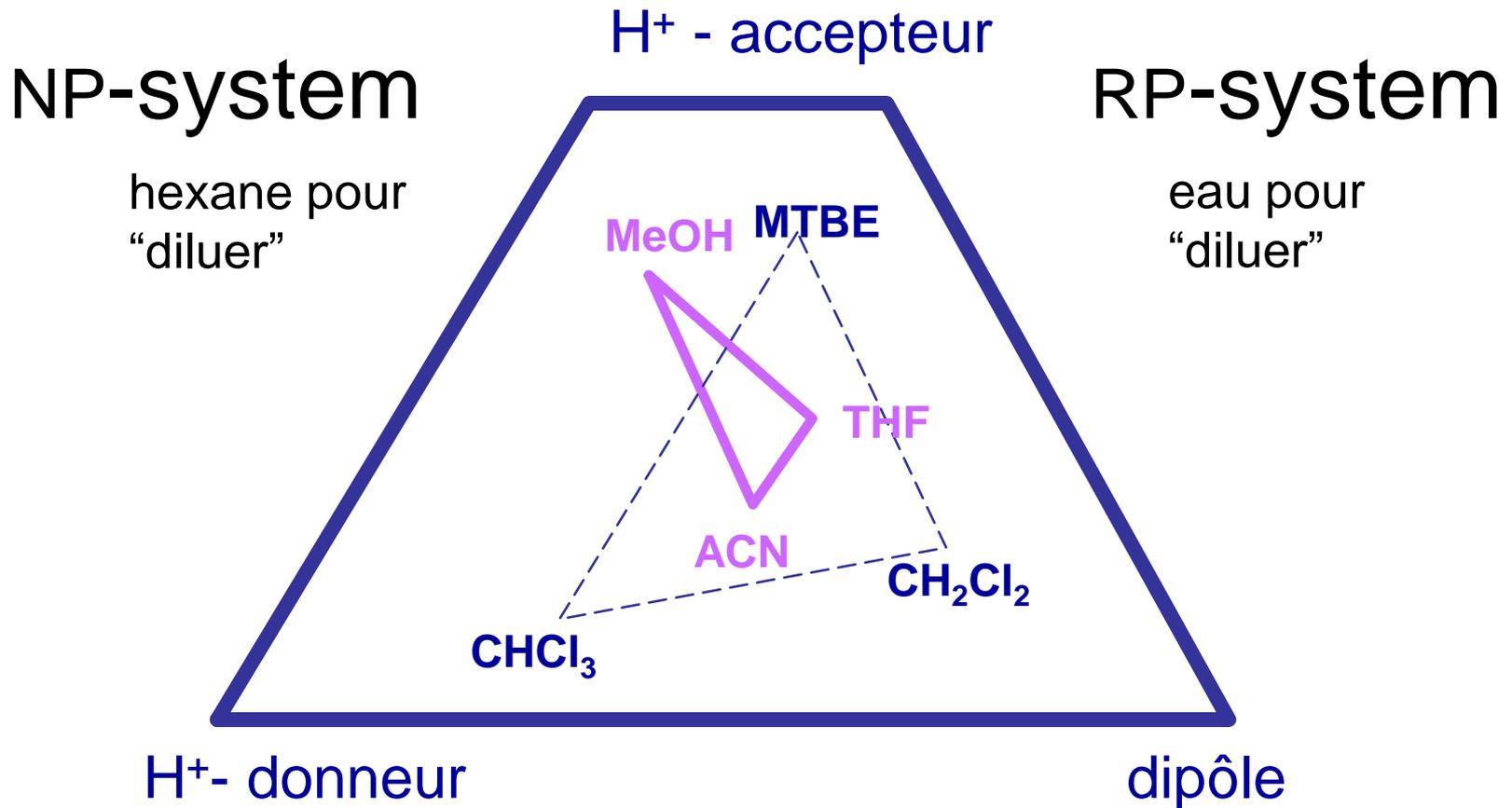
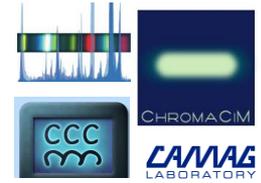
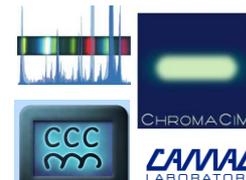
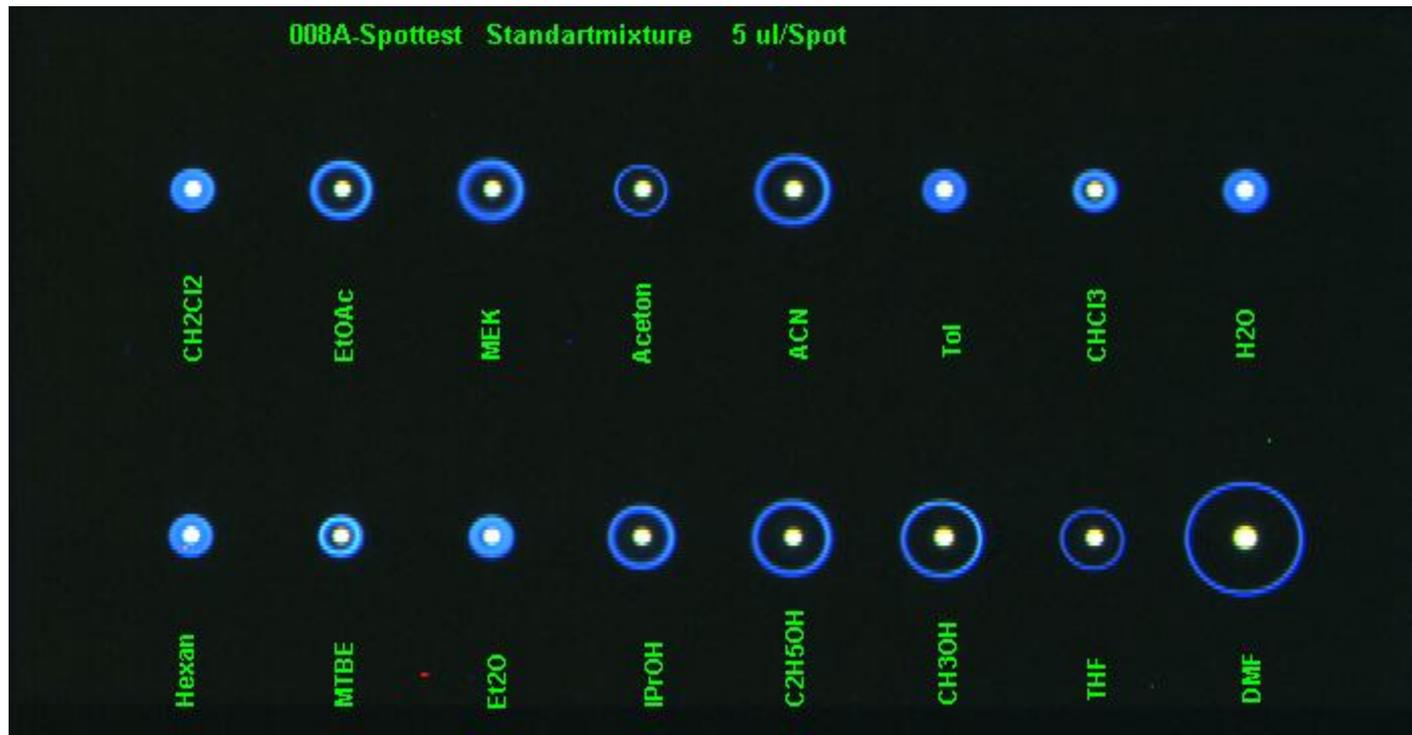
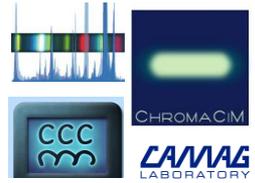


Tableau des groupes sur phase inverse

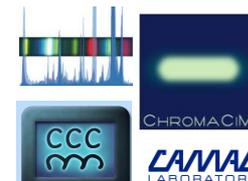


| Group | Solvent | Solvent strength |
|------------|-----------------|------------------|
| Decreasing | Wasser | 0 |
| II | Methanol* | 2,6 |
| | Ethanol | 3,9 |
| | 2-Propanol | 4,2 |
| III | Tetrahydrofuran | 4,5 |
| VI | Acetonitrile* | 3,2 |

Méthode par les dépôts en point

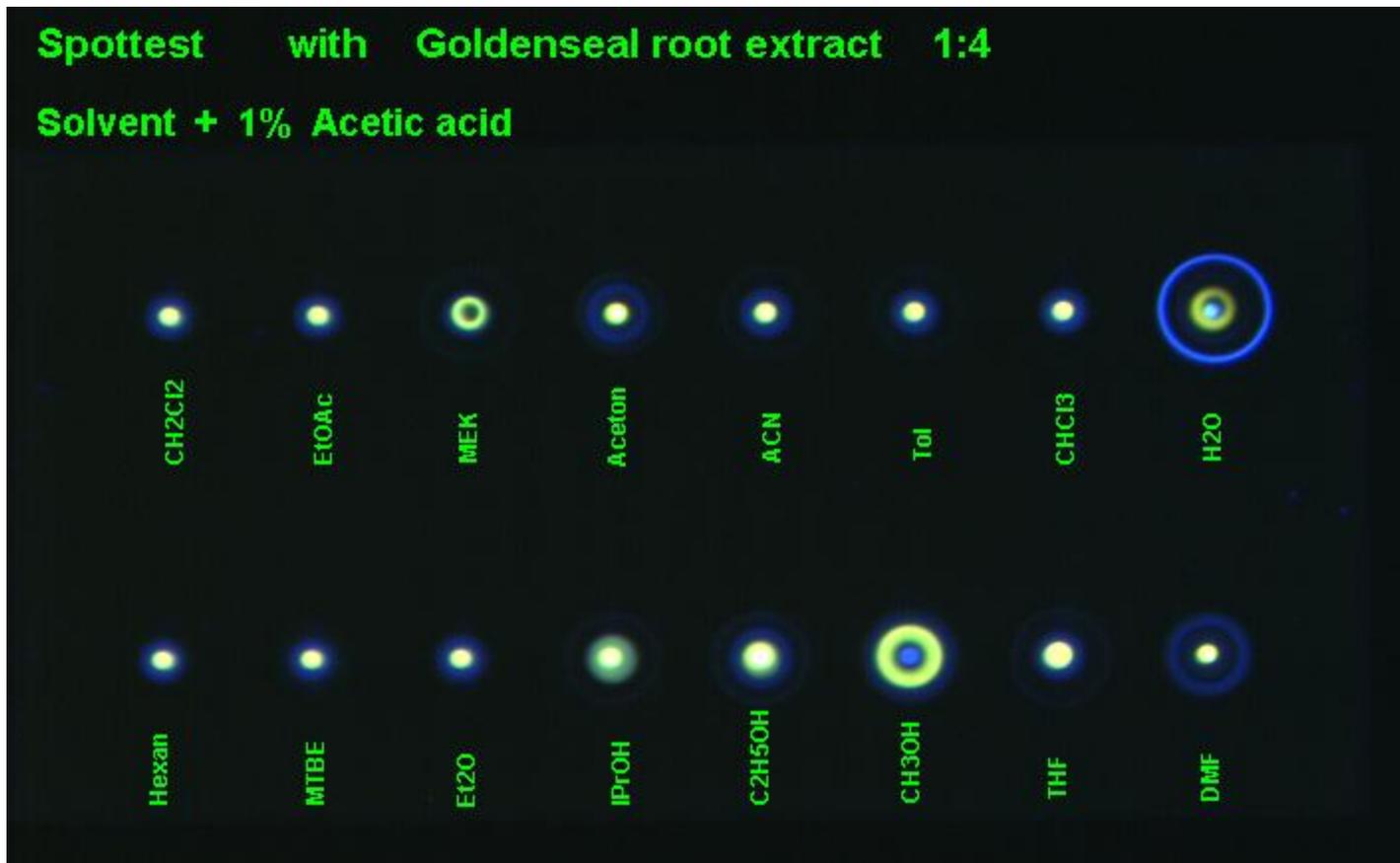


Méthode par les dépôts en point

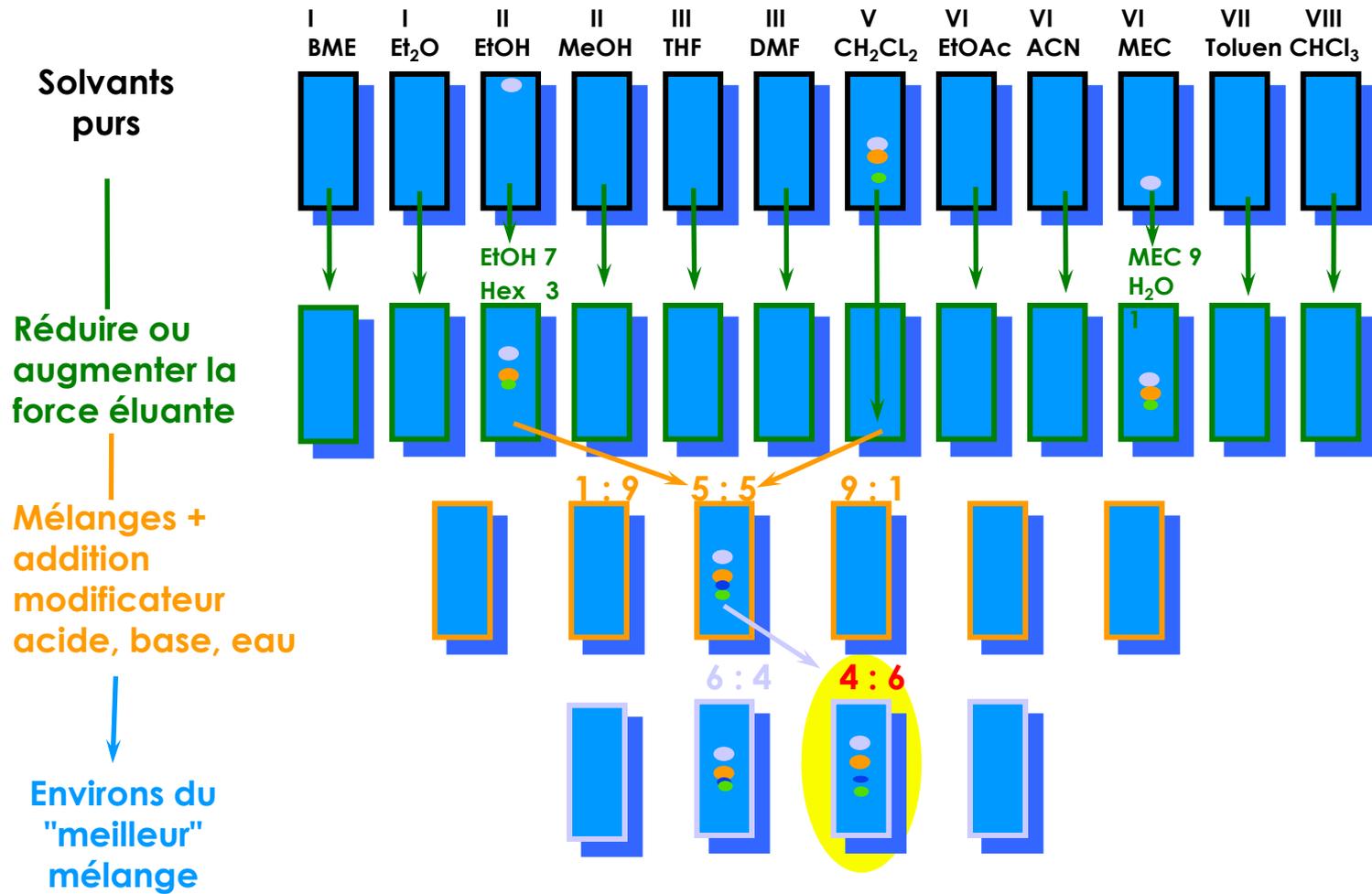
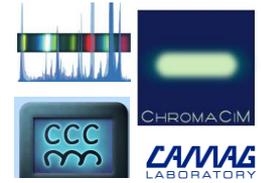


Spottest with Goldenseal root extract 1:4

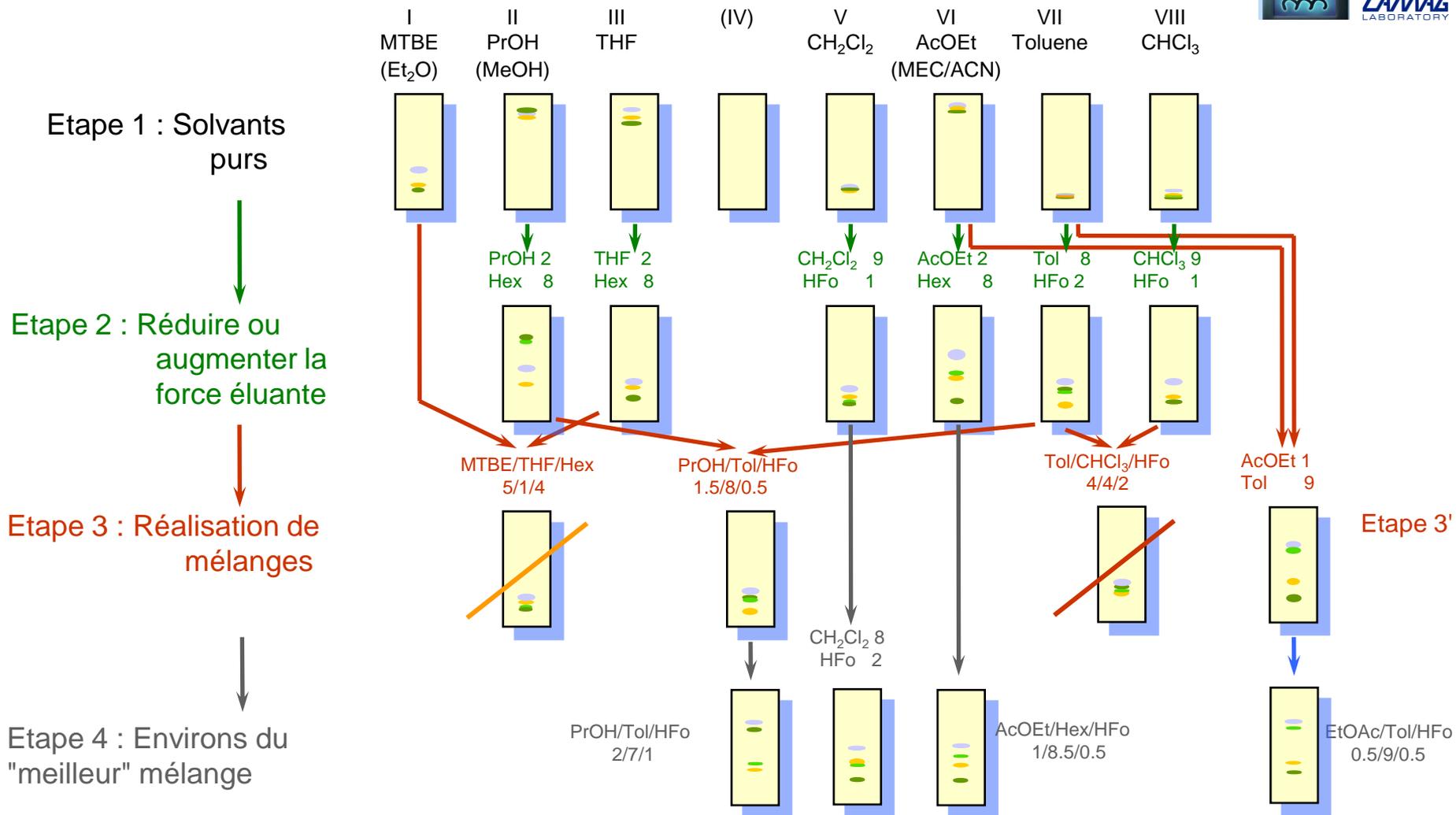
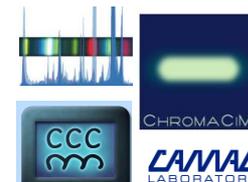
Solvent + 1% Acetic acid



Méthode d'optimisation CAMAG



Méthode d'optimisation CAMAG



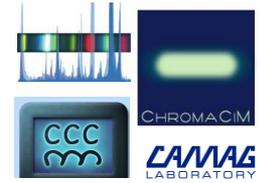
HFo = Acide Formique ; PrOH = Propanol ; Hex = Hexane ; AcOEt = Acétate d'Ethyle ; Tol = Toluène

Aide pour la méthode de mise au point

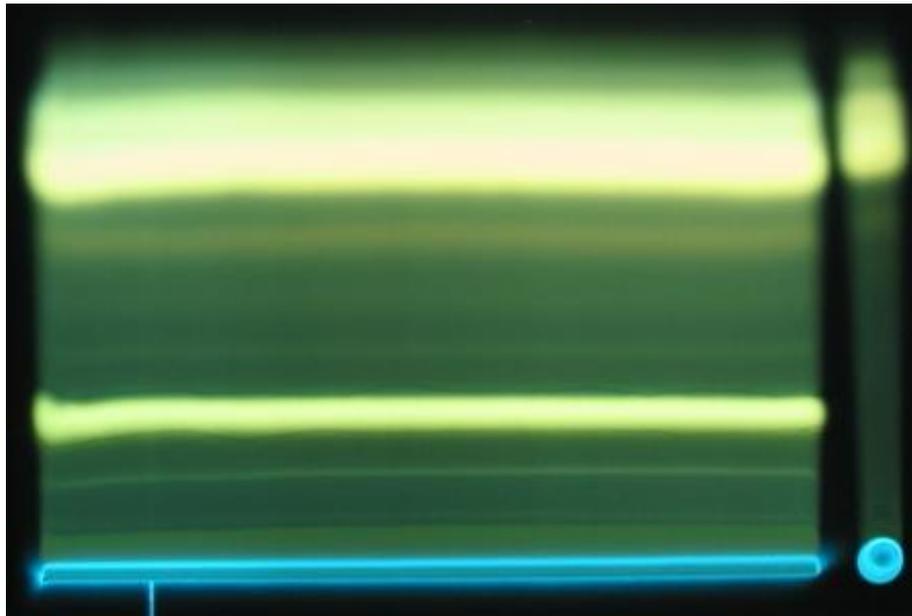
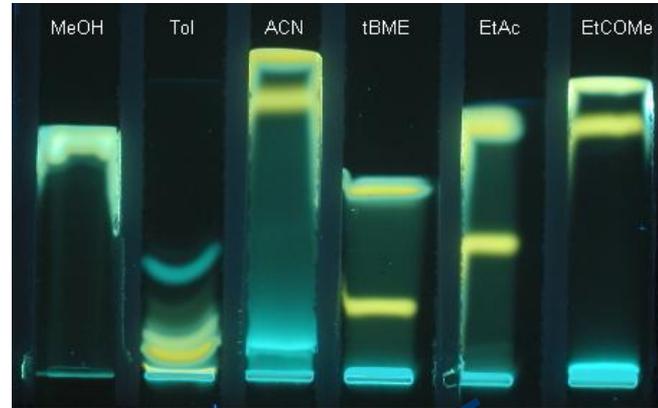


- Utilisation de la cuve Vario HPTLC
 - 1 solvant de migration et 6 solvants pour le pré conditionnement
 - 6 solvants de migration et 1 seul type de pré conditionnement
 - (6 solvants et 6 pré conditionnements différents)
 - Équivalent de 6 plaque en une.
- Permet de tester aisément l'influence de la force éluante, de la sélectivité et de l'humidité relative.

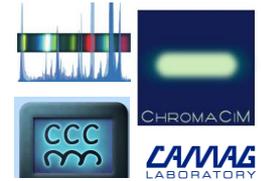
...une aide aussi à la transposition



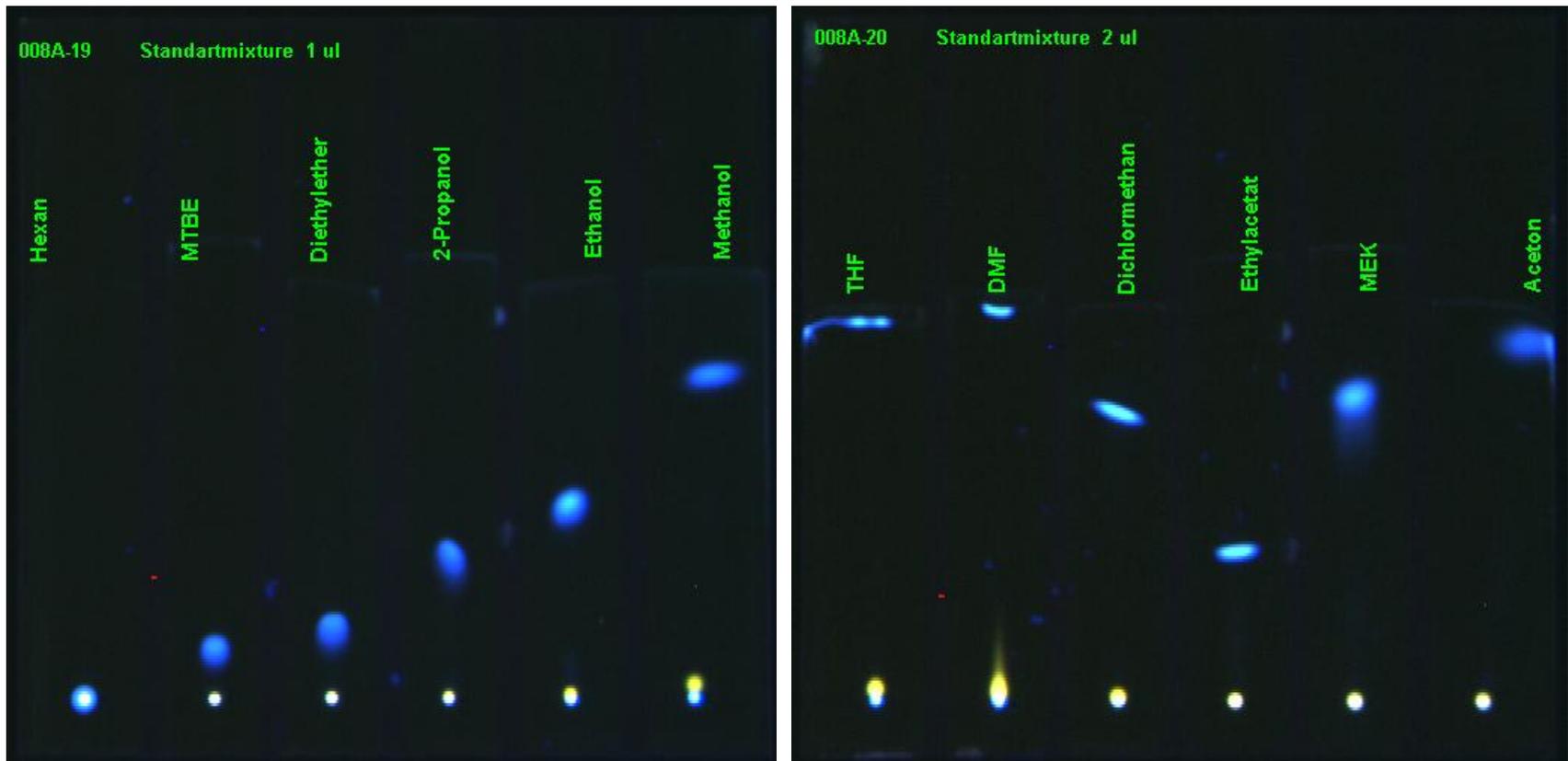
- Transposition analytique-préparative



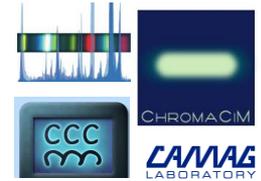
Méthode d'optimisation CAMAG



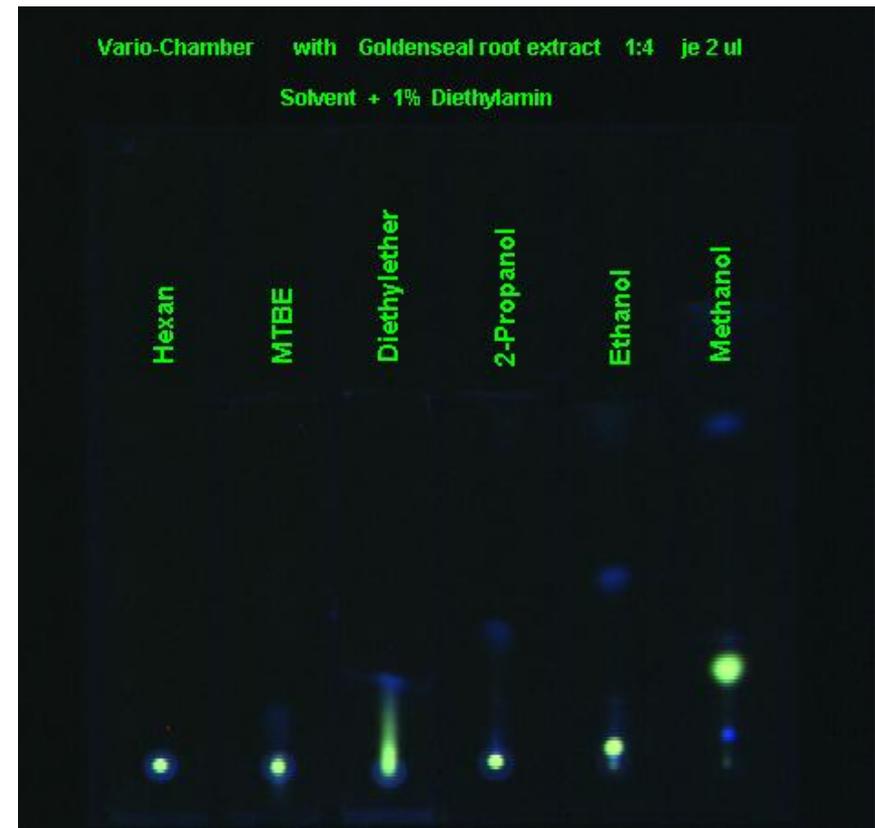
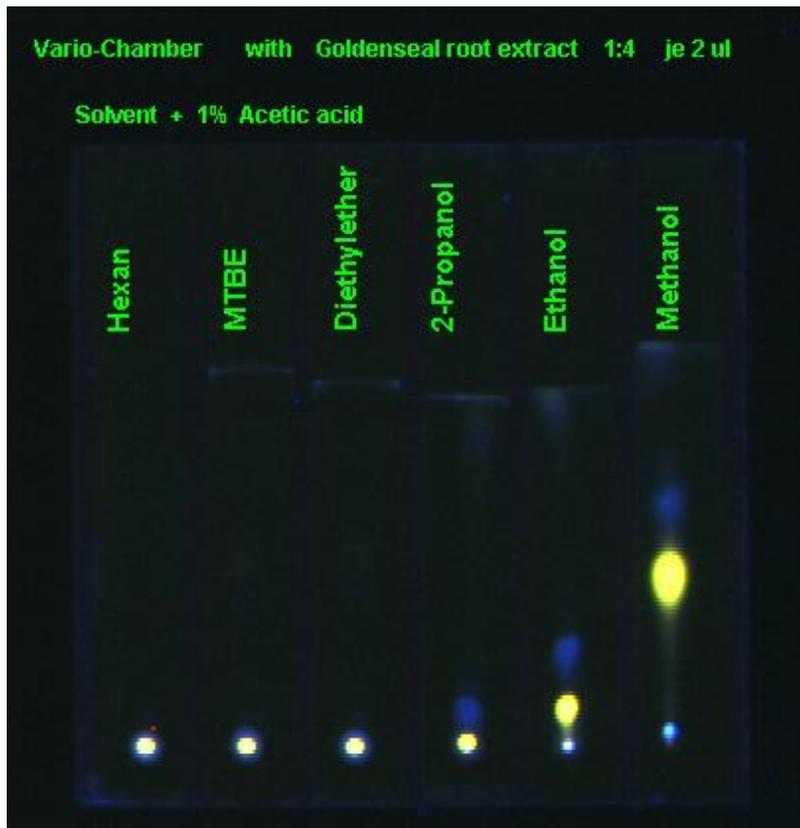
- Essai sur Hydrastis n° 1



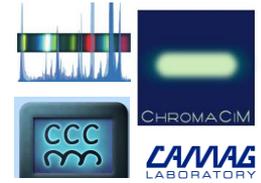
Méthode d'optimisation CAMAG



■ Essai sur Hydrastis n°2



Méthode d'optimisation CAMAG



- Essai sur Hydrastis n° 3

Hydrastis

Ethylacetate/Methanol/Acetic acid 50:10:6 saturated chamber(15 min)

1 ul 3 ul 5 ul 7 ul



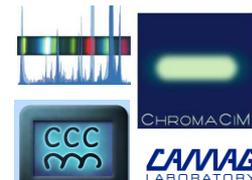
Hydrastis

Ethylacetate/Methanol/Acetic acid/Water 50:10:6:3 saturated chamber(15 min)

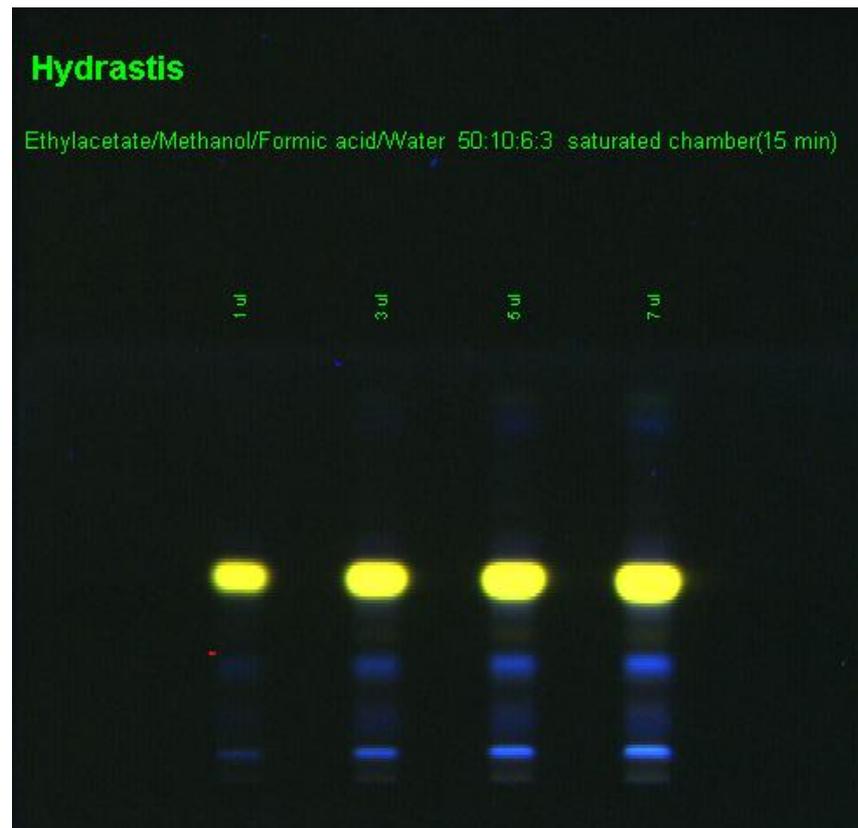
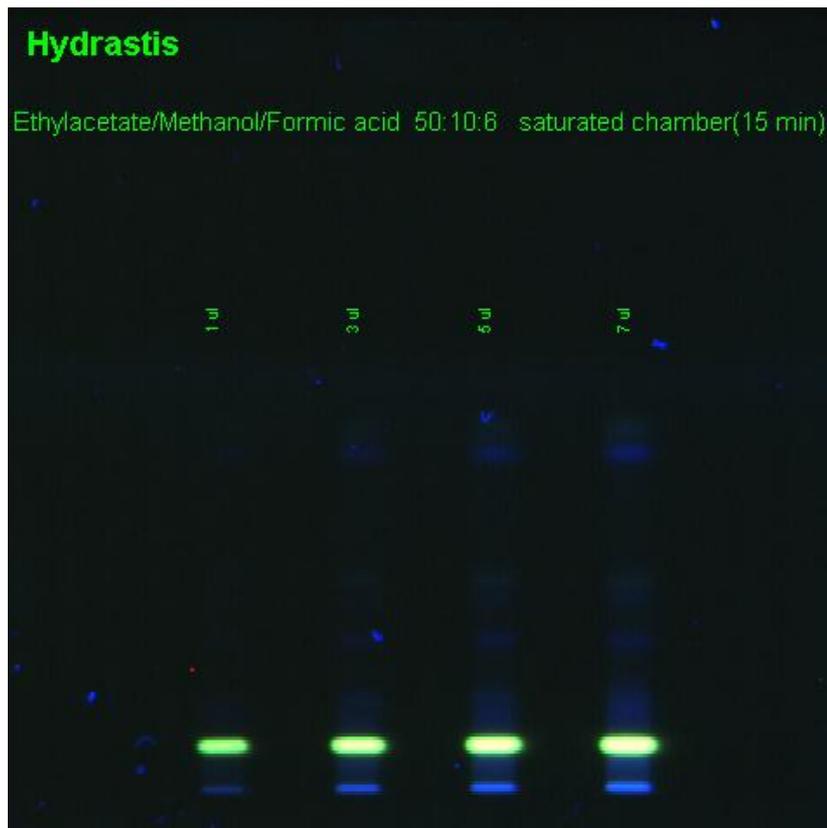
1 ul 3 ul 5 ul 7 ul



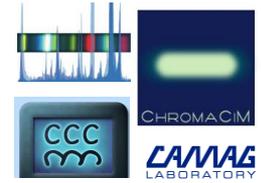
Méthode d'optimisation CAMAG



- Essai sur Hydrastis n° 4

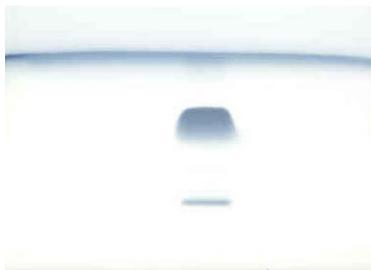


Exemple d'application

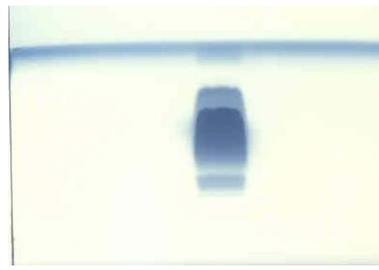


- But : il s'agit de mettre au point une méthode unique pour le suivi analytique par CCM de 2 réactions consécutives de protection et d'oxydation (3 composés à séparer en comptant le produit de départ).
- Le composé organique de départ contient 2 fonctions hydroxyle, une qu'il faut acétyler pour protéger, l'autre qu'il faut oxyder. La fonction protégée n'est pas stable en milieu acide donc la silice n'est pas souhaitée.
- Quelques essais rapides :
 - - sur plaques pré-découpées 5 x 5 cm
 - - simple migration avec EtOH sur 3 cm
 - - dépôt du mélange des 3 composés (Pdt départ, après protection, après oxydation)
- nous ont permis de sélectionner la phase greffée NH₂ : on observe une traînée avec les autres phases stationnaires testées.

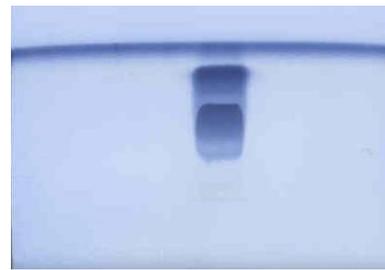
Silice



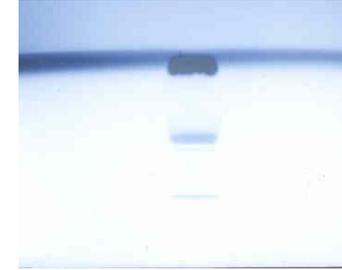
CN



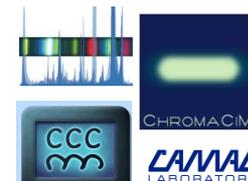
DIOL



NH₂

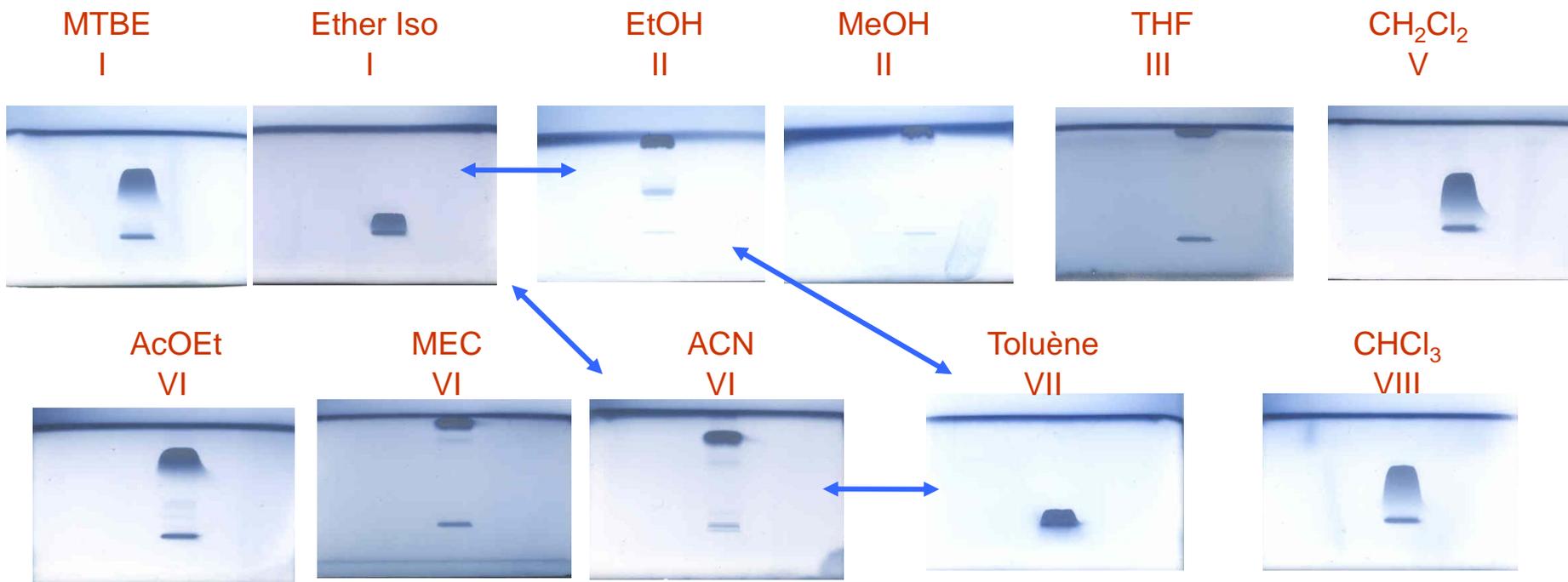


Exemple d'application



- Plaques : HPTLC NH₂ coupées en 4 plaques de 5 x 5 cm
- Dépôt : Mélange des 3 composés
- Migration : 3 cm en cuve TTC 10 x 5 cm
- Révélation : Réactif Phosphomolybdique

Elimine : MTBE, CH₂Cl₂, AcOEt et CHCl₃ : traînées des spots
Dilue : THF, ACN et MEC
Augmente : Ether Iso et Toluène
Essaye : des mélanges

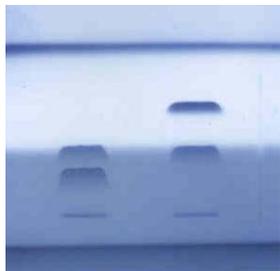


Exemple d'application

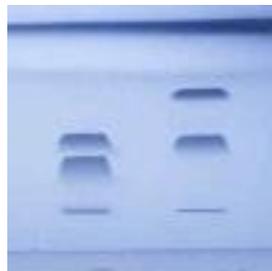


Etape 1

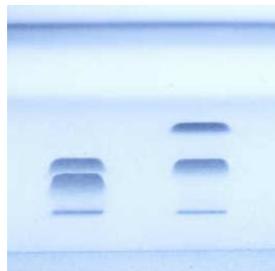
THF/Cyclo
40/60



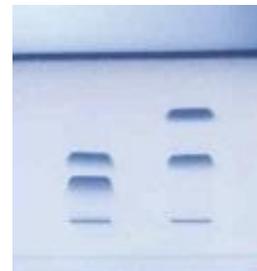
MEC/Cyclo
30/70



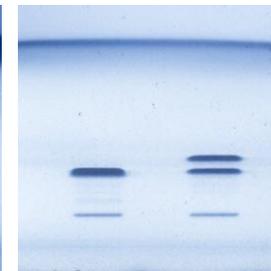
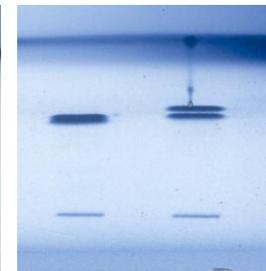
ACN/Cyclo
30/70



Ether Iso/EtOH
90/10

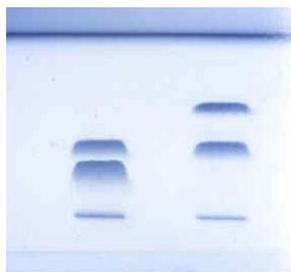


Toluène/EtOH
90/10 95/5



Etape 3 et 3'

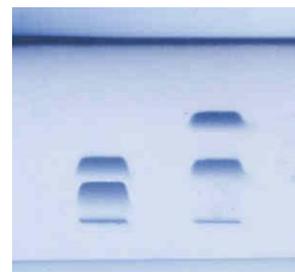
Toluène/ACN
80/20



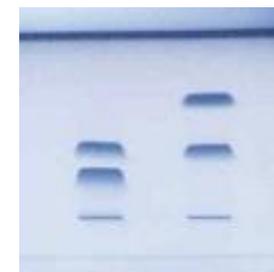
Toluène/ACN/EtOH
90/8/2



Ether Iso/ACN
90/10

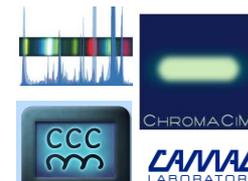


Ether Iso/ACN/EtOH
92/5/3

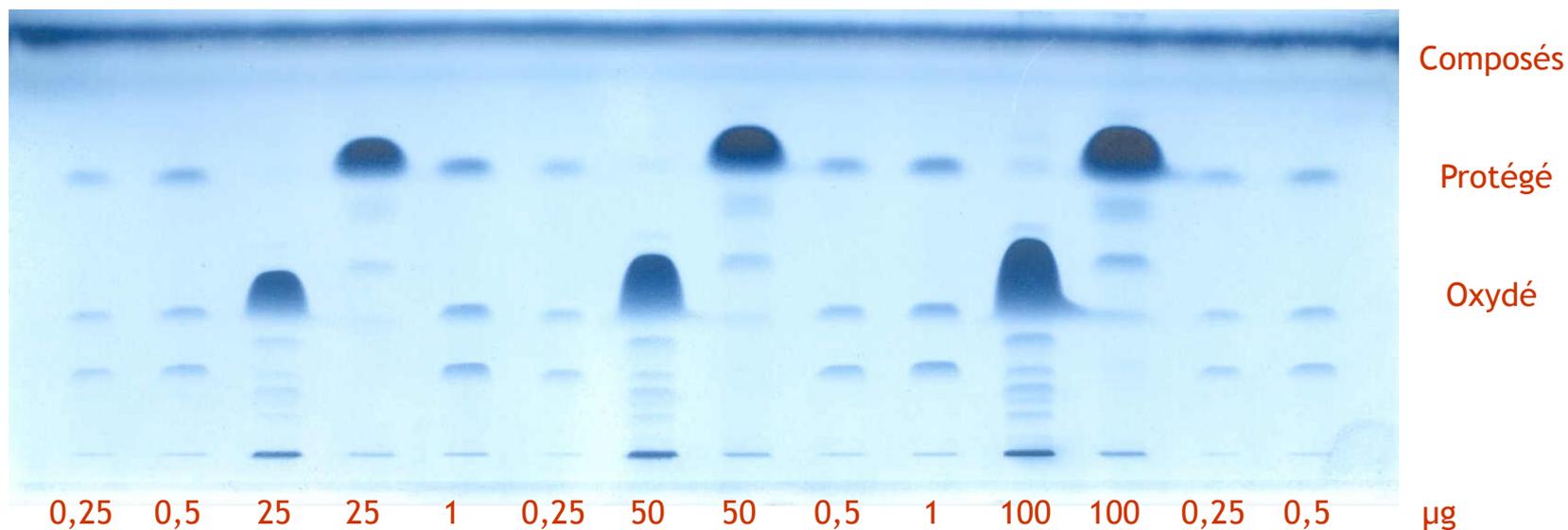


Le mélange Ether Iso / EtOH semble le meilleur : les spots sont les plus fins pour une séparation satisfaisante. Il reste à peaufiner les conditions.

Exemple 1 : résultat



Etape 4



Mode opératoire retenu pour la séparation :

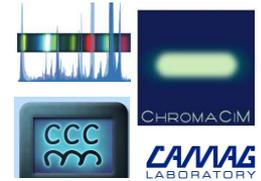
Plaque : Gel de silice greffé NH_2 HPTLC 20 x 20 cm

Dépôts : Standards à 0,25 - 0,5 et 1 µg, Composés à 25 - 50 et 100 µg

Eluant : Ether isopropylique/Ethanol : 94/6

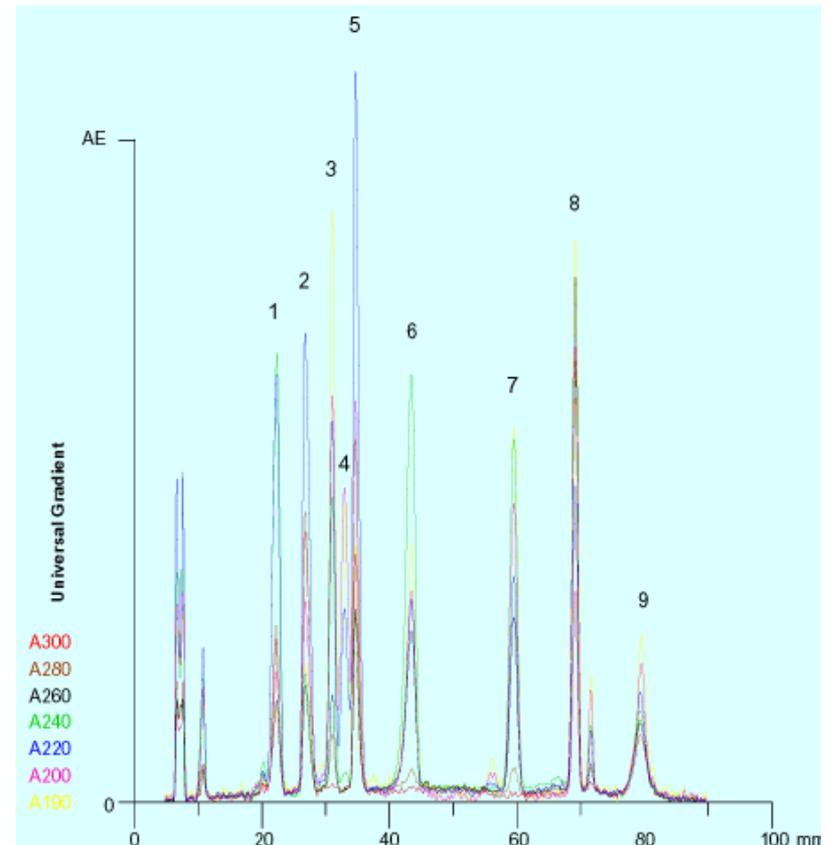
Distance migration : 7 cm du bas de la plaque en cuve ADC

Résultats du gradient universel



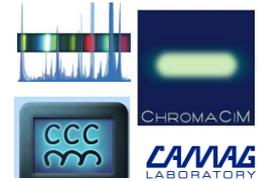
- Exemple montrant les capacités universelles de séparation du gradient AMD sur un mélange test contenant :

- *Ac.naphtalène tri-sulfonique*
- *Ac.naphtalène di-sulfonique*
- *Ac. Benzoïque*
- *Nitrate inorganique*
- *Ac.naphtalène mono-sulfonique*
- *Thiourée*
- *Acétanilide*
- *Benzanilide*
- *soufre*

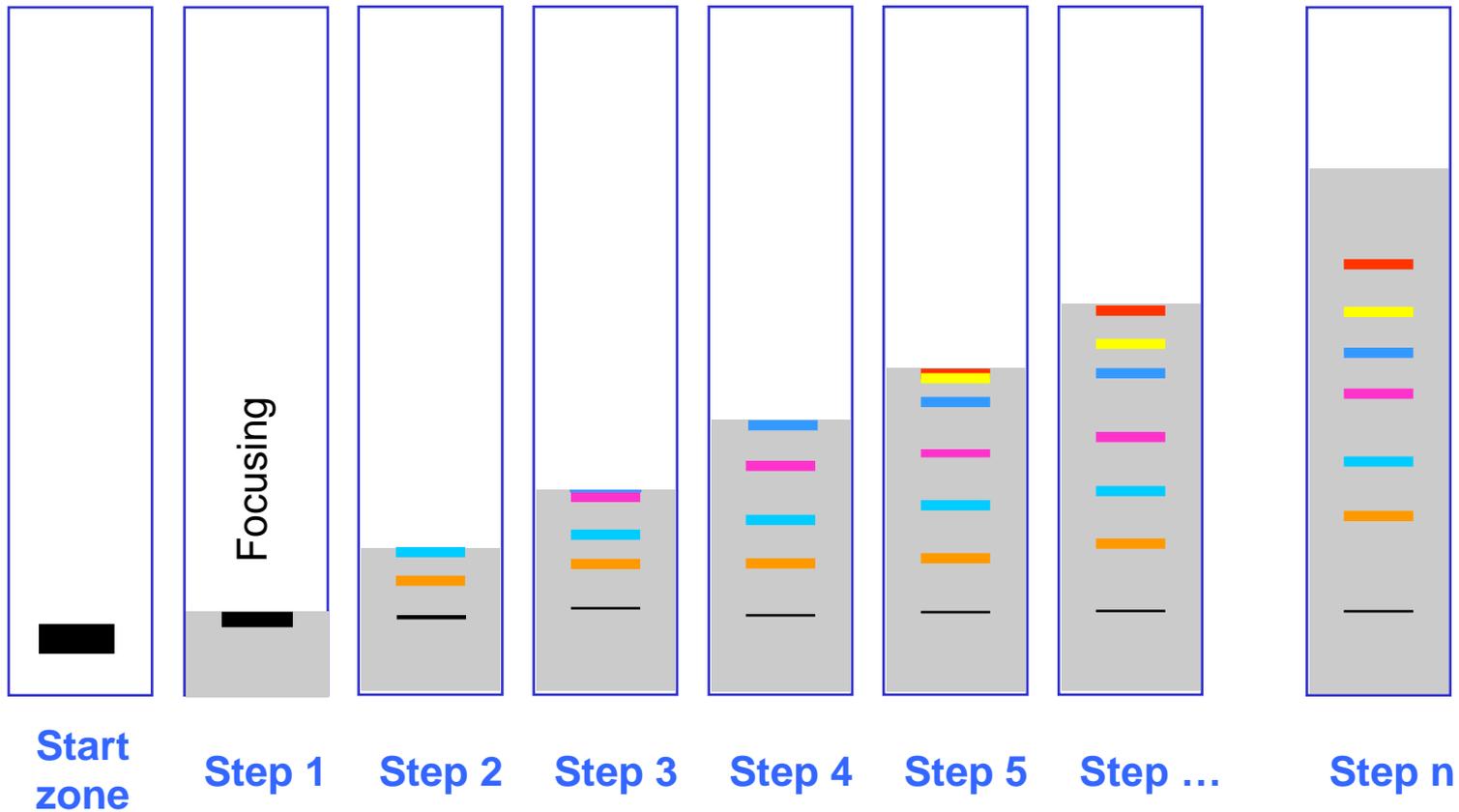


- 100 ng de chaque constituant

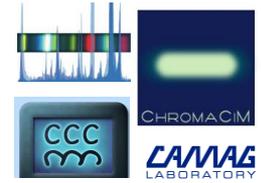
L'AMD



- Définition et principe de fonctionnement

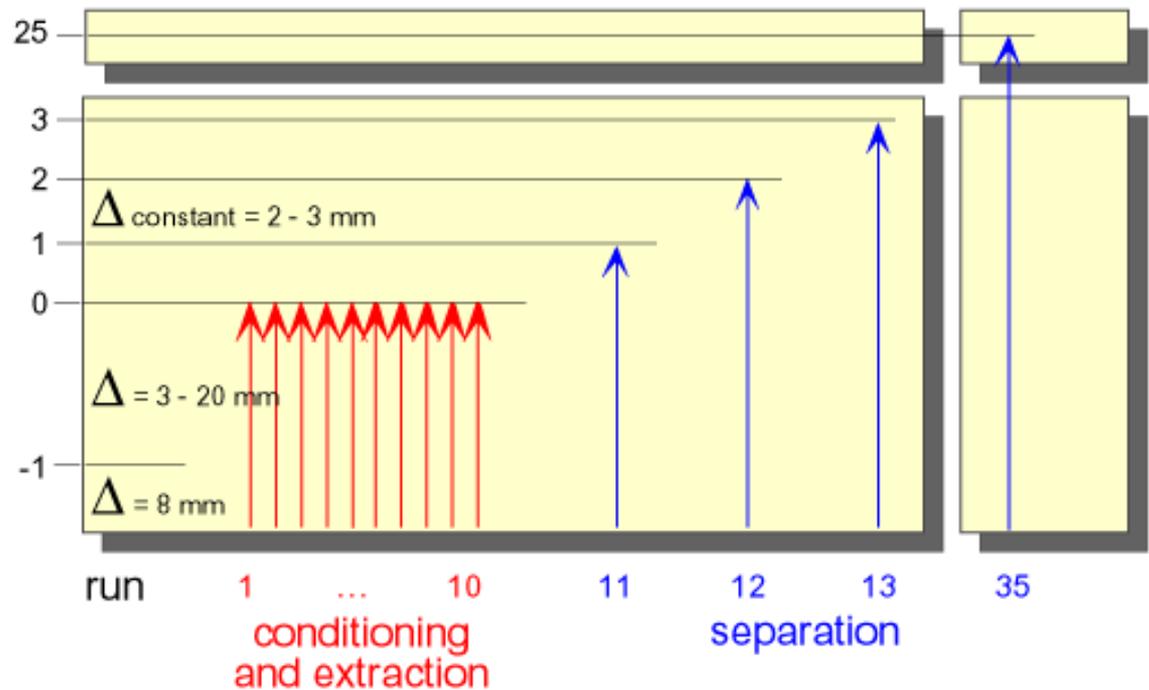


L'AMD

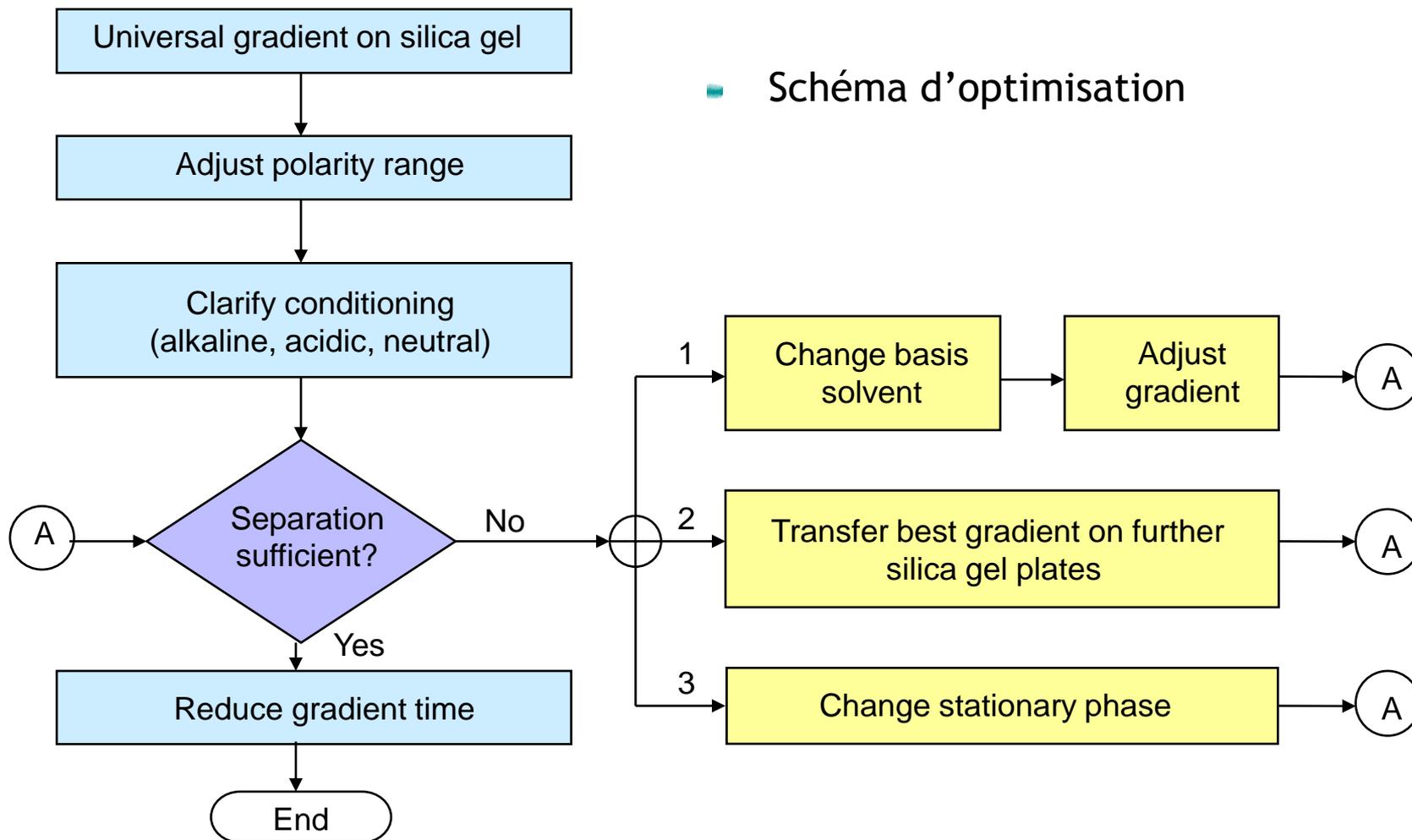
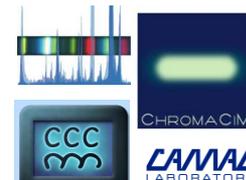


- Définition et principe de fonctionnement
- Automated Multiple Development = Gradient multi étapes automatisé

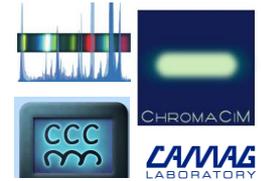
- Migrations successives
- Distance de migration linéairement croissante de 1, 2, ou 3 mm
- Nombre d'étapes de 5 à 35



L'AMD

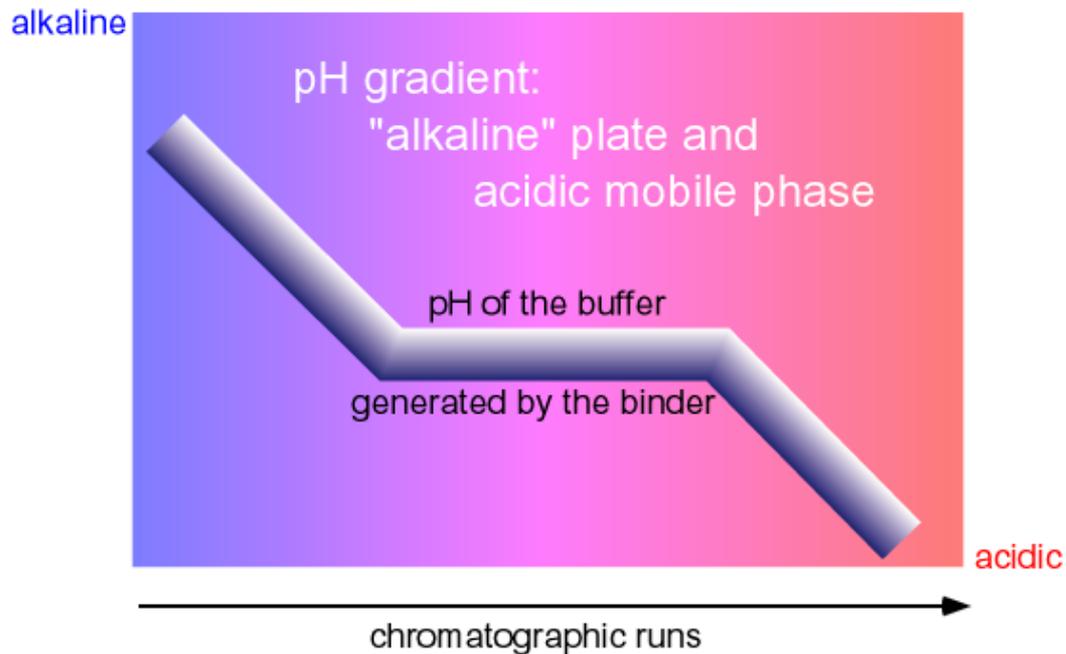


L'AMD

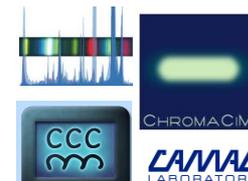


■ L'optimisation

- *En fonction de la plaque utilisée et des différentes des molécules à séparer, on peut par le pré conditionnement ou mieux en ajoutant un acide ou une base dans la phase mobile, améliorer sensiblement la séparation. C'est un gradient de pH qui s'effectue automatiquement sur la plaque.*



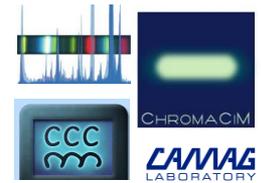
La plaque



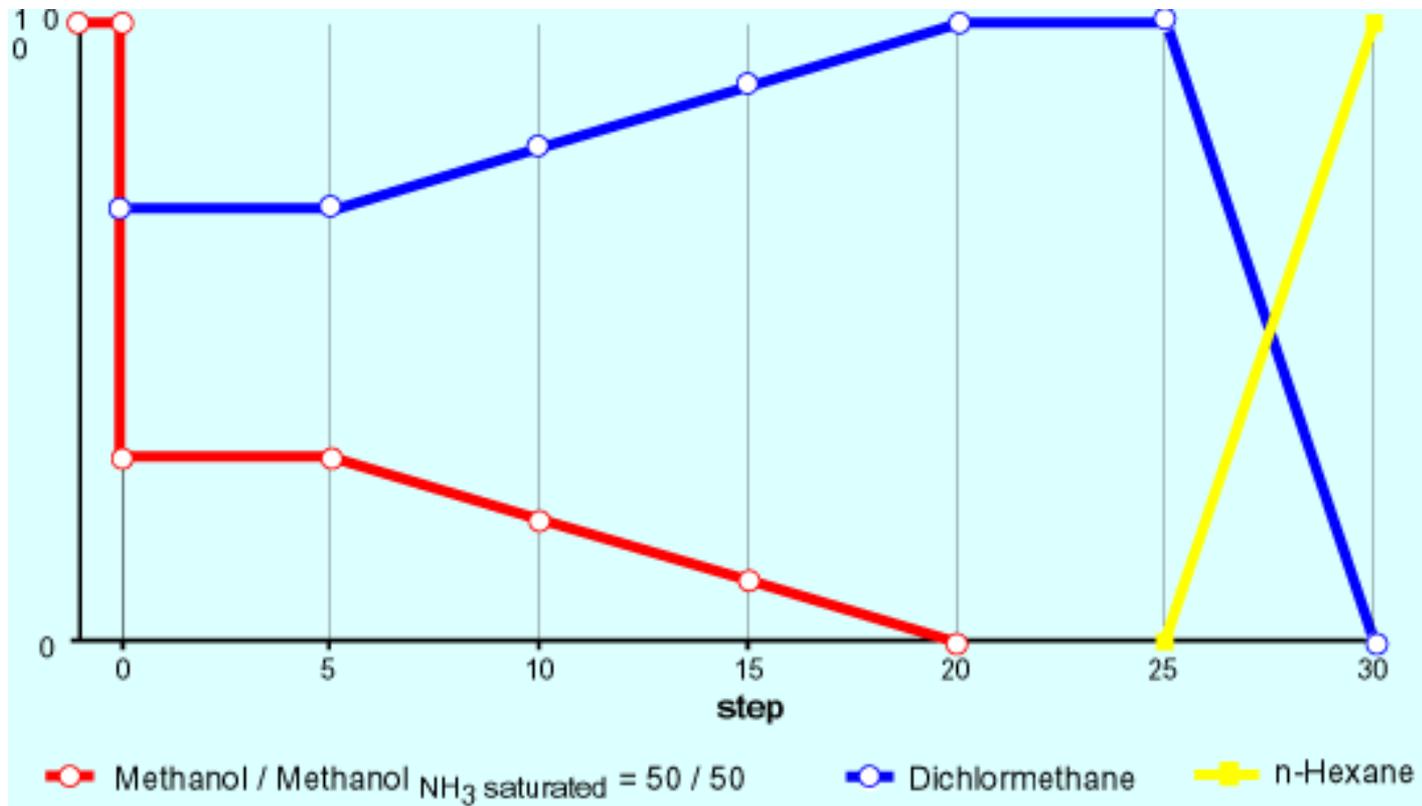
■ Données expérimentales comparatives (Klaus BURGER)

| thickness (µm) | pH of layer | fluorescence indikator | Productnumber | typical use |
|-----------------------|-------------|------------------------|---------------|---------------------------------------|
| <i>HPTLC Standard</i> | | broken material | | |
| 100 | "alkaline" | + | 11764 | pH-Gradient, pesticides |
| 200 | "alkaline" | - | 5641 | pH-Gradient, pesticides |
| 200 | "alkaline" | + | 5642 | pH-Gradient, pesticides |
| <i>Plaques WR</i> | | | | |
| 100 | "acidic" | - | (110556) | acidic and alkaline separations |
| 100 | "acidic" | + | 12363 | universal gradient |
| 200 | "acidic" | + | 15552 | for acids and bases |
| <i>Lichrospher</i> | | spheric material | | |
| 200 | "acidic" | + | 15445 | best separations and detection limits |

L'AMD



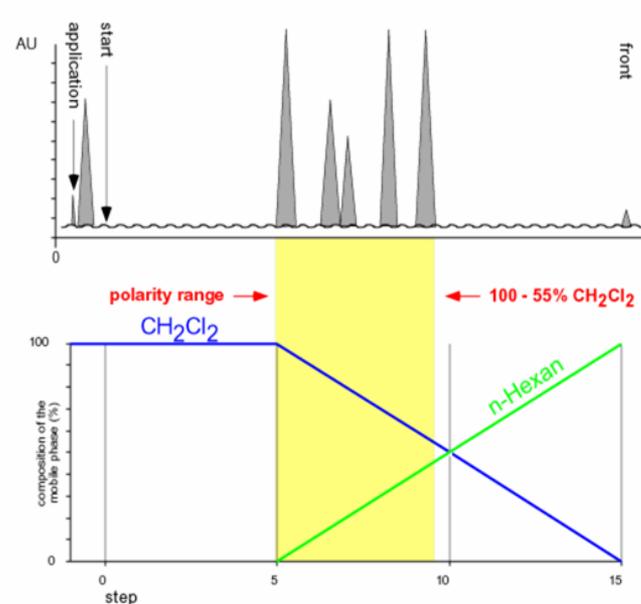
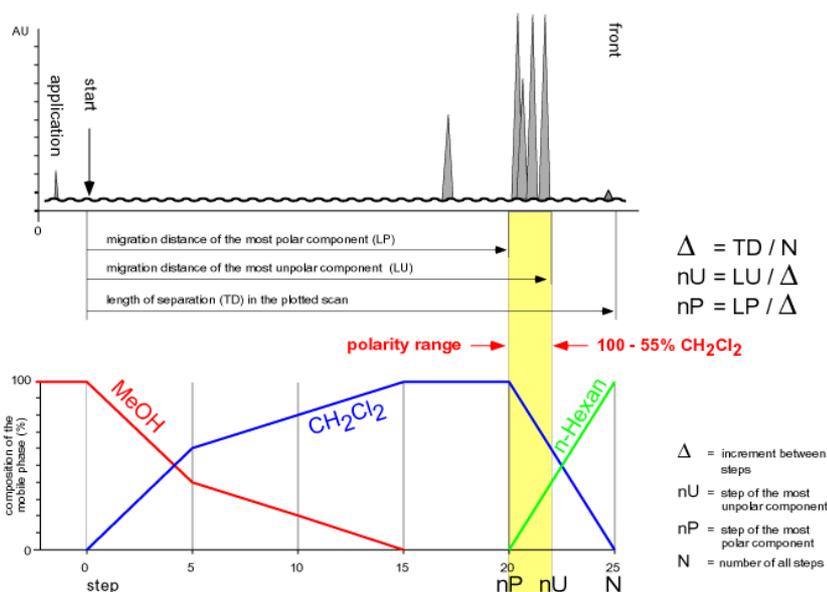
Le gradient universel



L'AMD



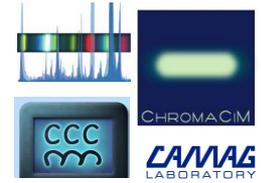
L'optimisation



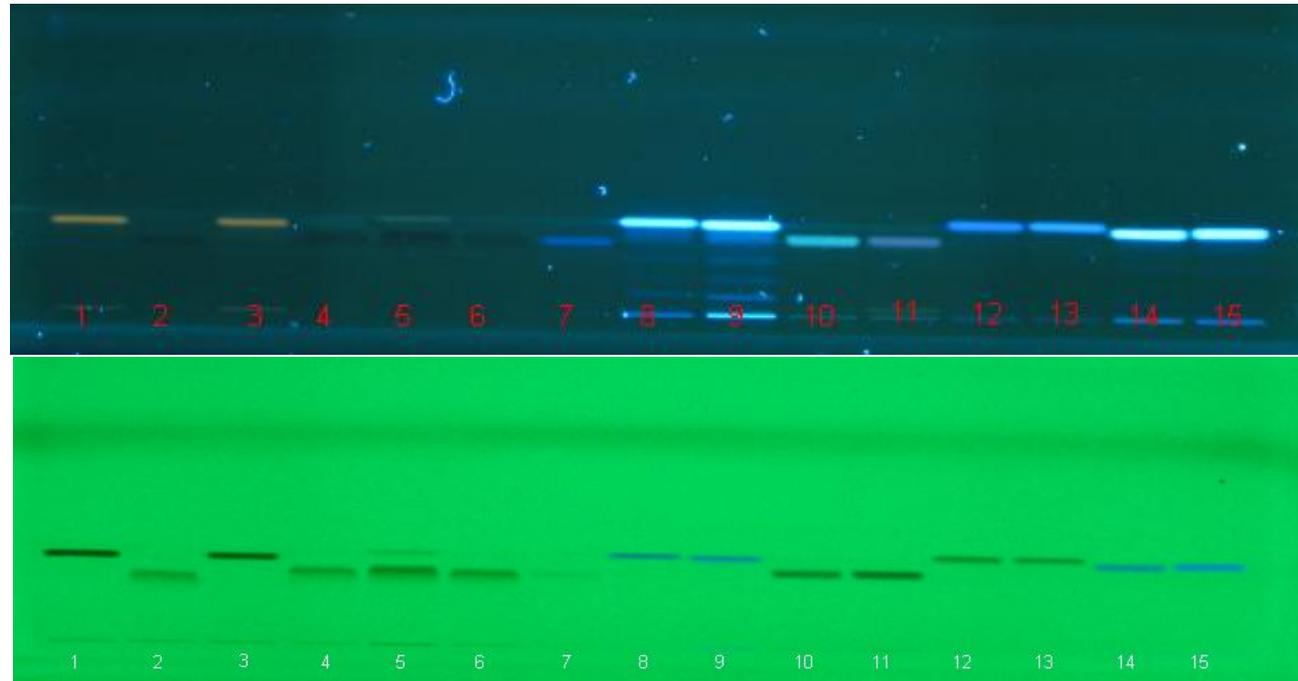
1. définition de la zone d'intérêt

2. étalement du gradient correspondant

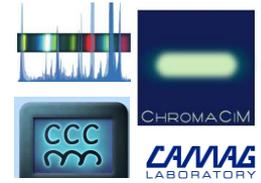
L'AMD



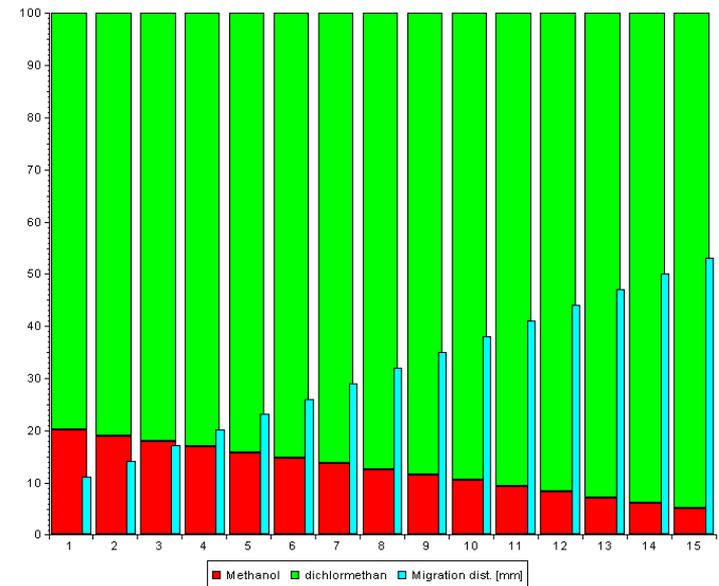
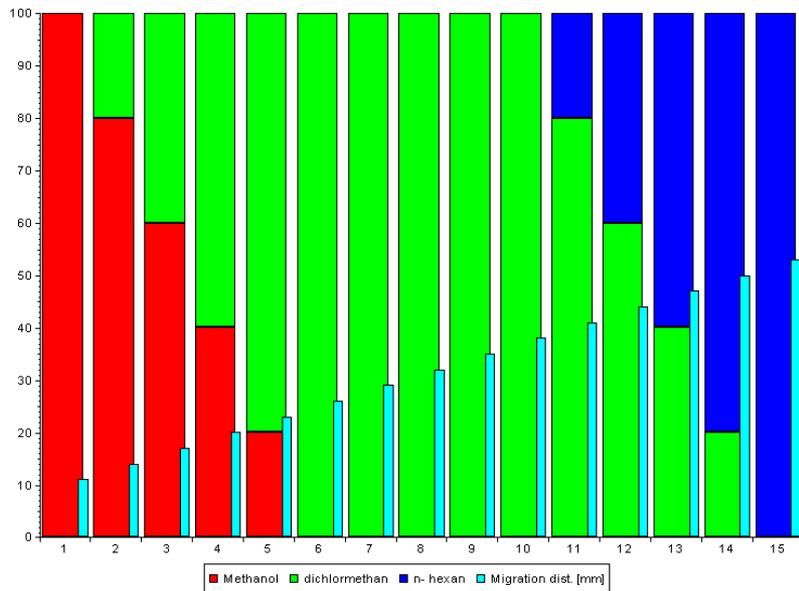
- Exemple de mise au point à partir du gradient universel (15 amines)



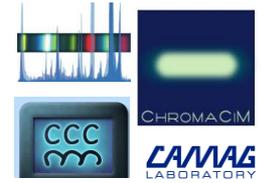
L'AMD



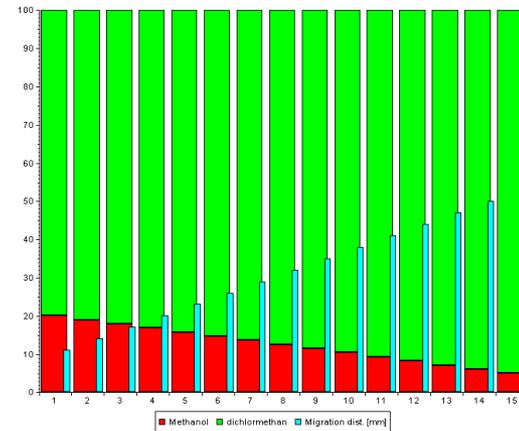
- Etalement du gradient après élimination des zones inintéressantes, afin d'ajuster la gamme de polarité.



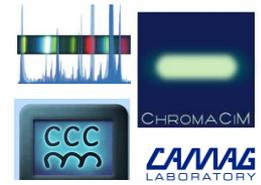
L'AMD



- Résultat de l'étalement du gradient après élimination des zones inintéressantes, afin d'ajuster la gamme de polarité.



L'AMD



basique

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

neutre

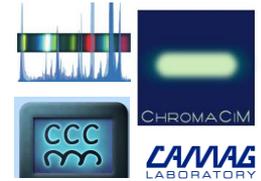
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

acide

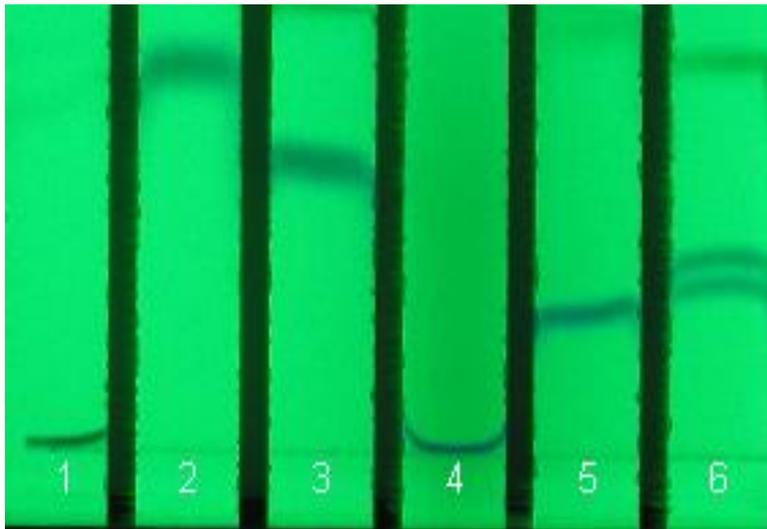
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Ajustement
du pH

L'AMD

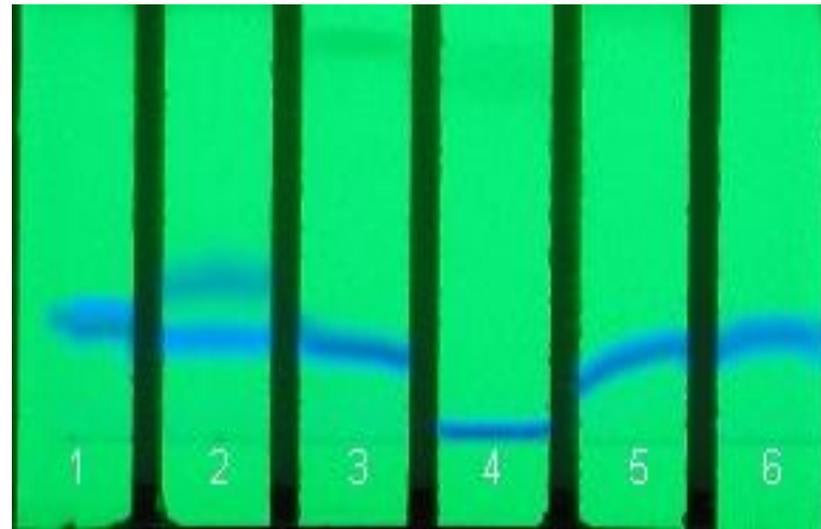


- Recherche d'une meilleure sélectivité



Critical pairs 12, 13

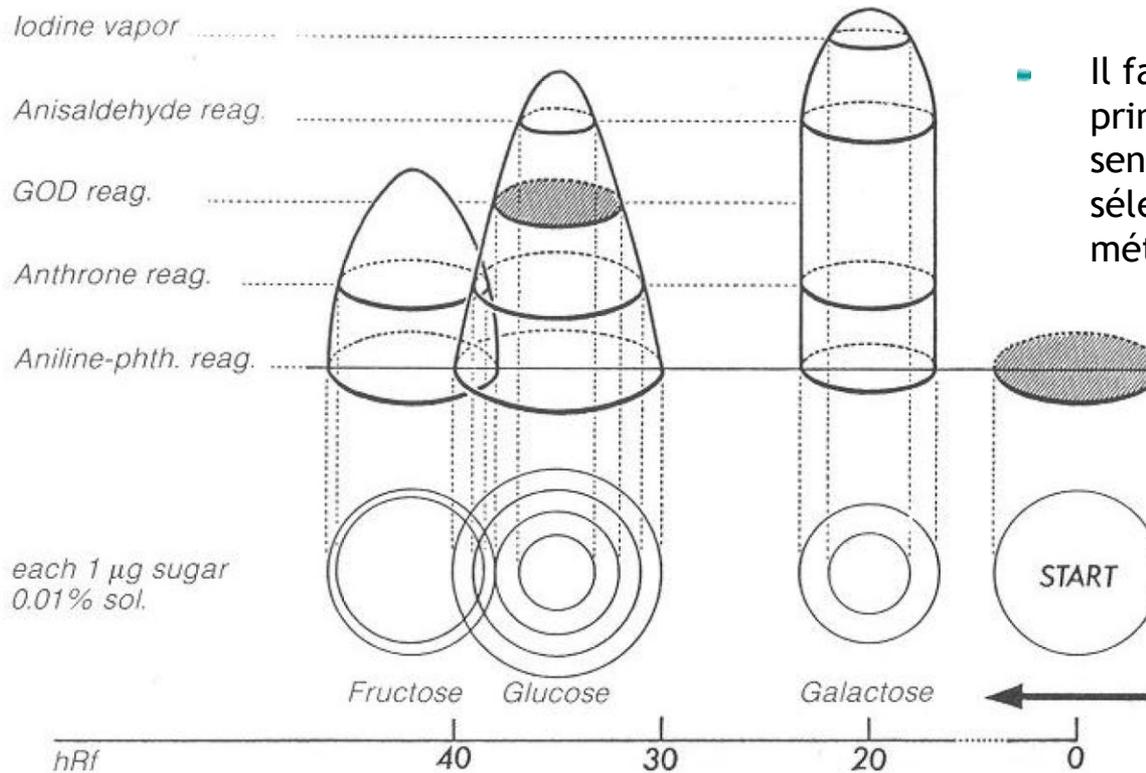
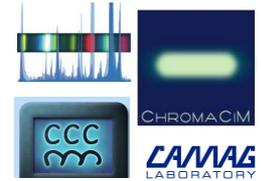
(1) Dichloromethane; (2) Acetonitrile;
(3) Ethyl acetate; (4) Toluene;
(5) THF - n-Hexane 1:1; (6) Diethyl ether



Critical pairs 8, 15

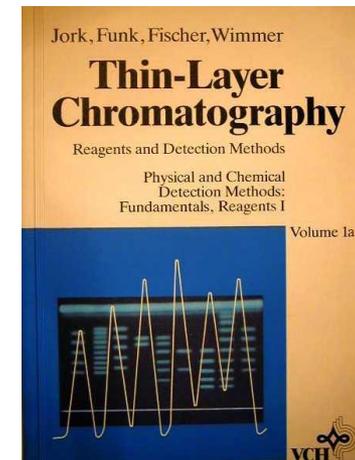
(1) t-Butyl methyl ether; (2) Acetonitrile;
(3) Ethyl acetate ; (4) Diisopropyl ether;
(5) THF - n-Hexane (1:1); (6) Diethyl ether

Sensibilité et choix du réactif

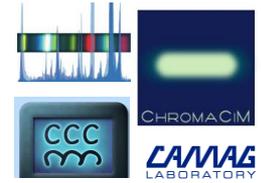


- Il faut tenir compte principalement de la sensibilité et de la sélectivité de la méthode.

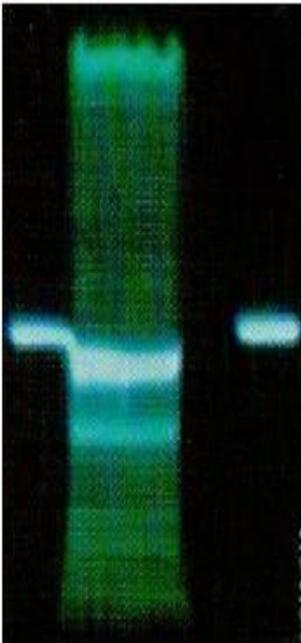
- Un nombre incalculable de réactifs existent pour la révélation chimique des plaques. Reportez vous à la bibliographie.



Confirmation de l'identité

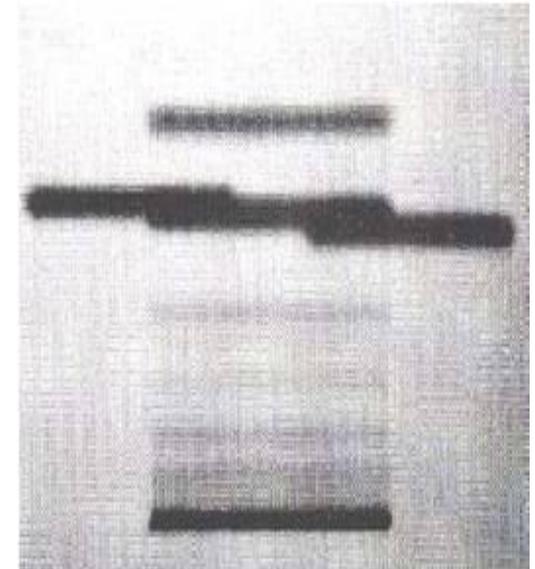


- Dépôt superposé à utiliser en cas d'échantillon complexe et d'effet matrice

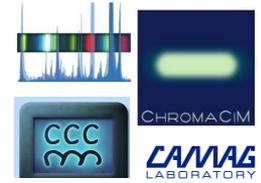


Substances
identiques

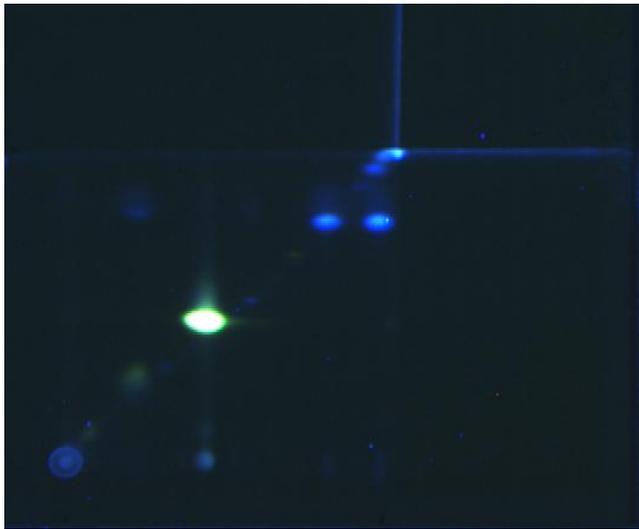
Substances différentes



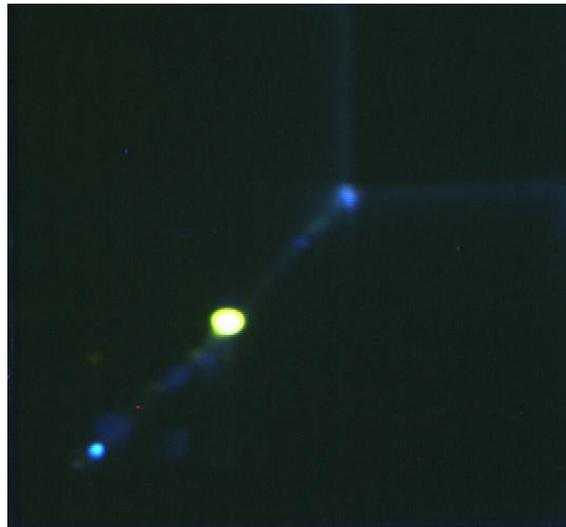
Chromatographie bidimensionnelle



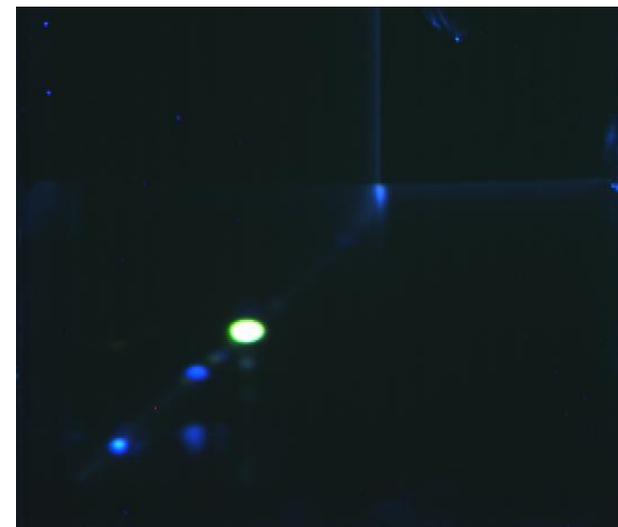
- Comparaison de 3 méthodes pour l'Hydrastis, dont deux monographies de Pharmacopées



Pharmacopée Chinoise



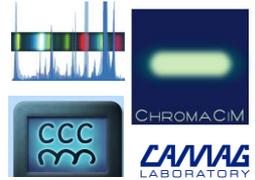
Méthode CAMAG



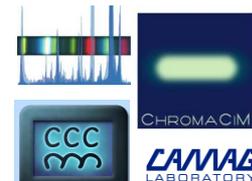
Pharmacopée US



Conclusion :



- réflexion > définition de l'objectif > stratégie
- nécessite une formation adéquate, des outils bibliographiques (révélateurs)
- faire jouer réseaux et connaissances sans oublier les possibilités du Laboratoire CAMAG, et de nos partenaires (Gerda, Vicente, Colin, ...) en fonction du sujet
- penser au gain de temps (instrumentation)



MERCI (s)

et maintenant...

A horizontal blue brushstroke graphic is located at the bottom of the slide, extending across most of the width.

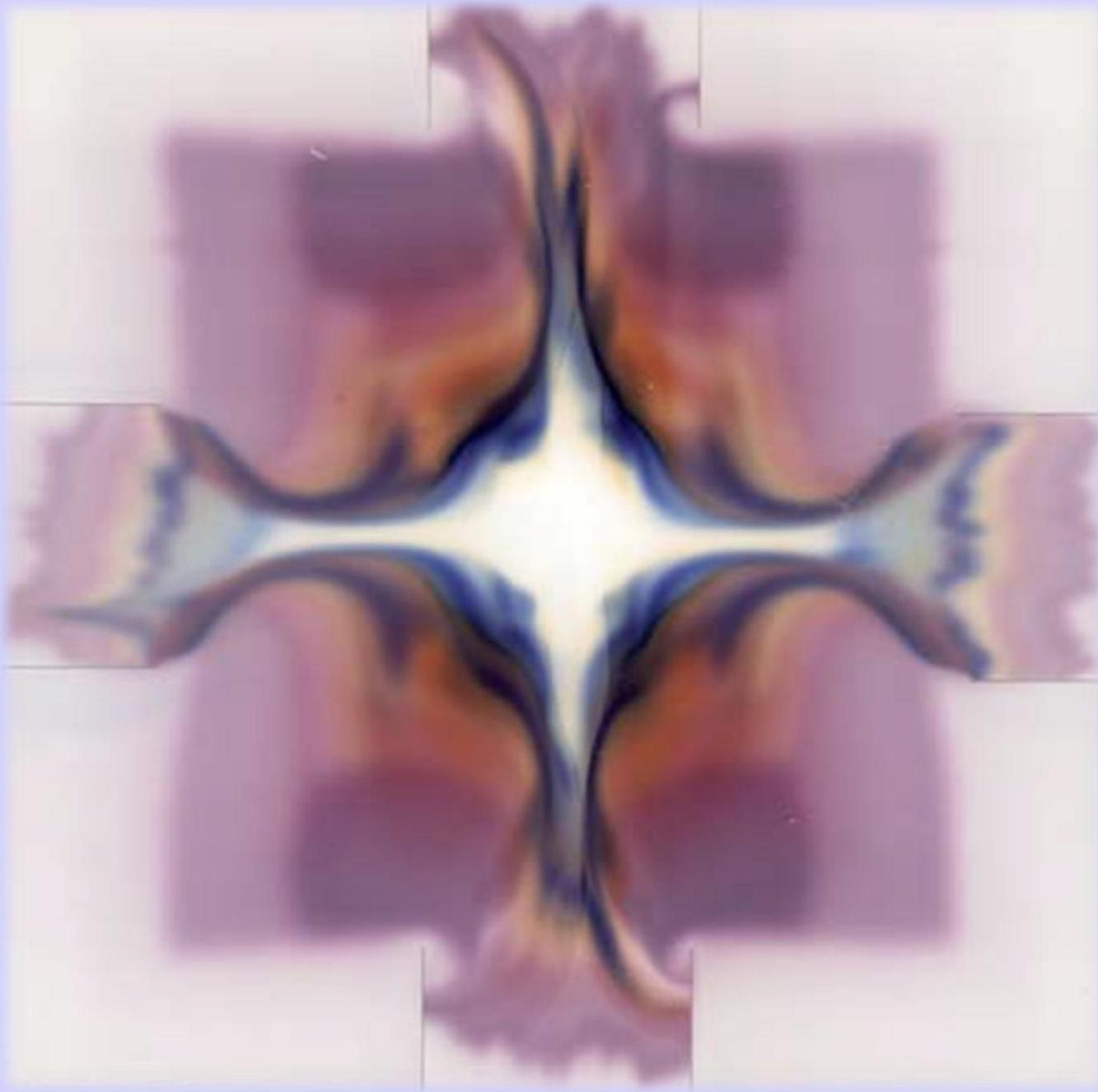
Questions diverses...



Dernières nouvelles...

Bilans et AG du Club

Candidats à des stages ou des emplois...



*“Chromart” by
Herbert Halpaap
in 1986-1987*