



Pierre Fabre  
Dermo-Cosmétique  
*Recherche et Développement*



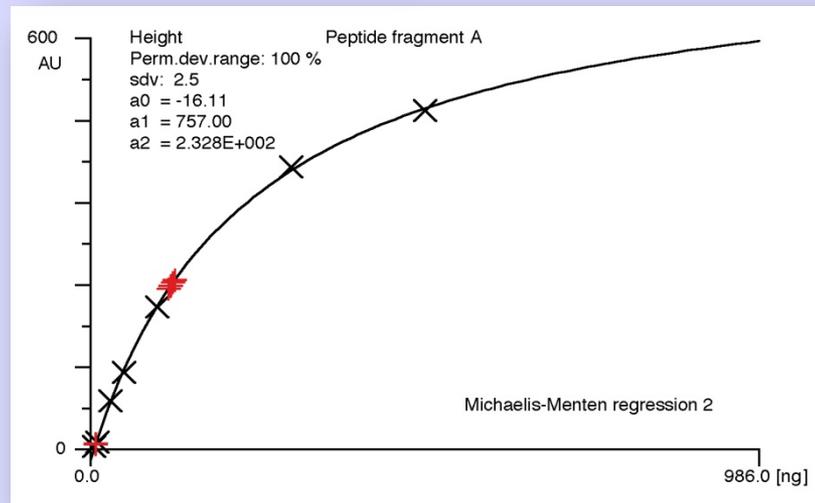
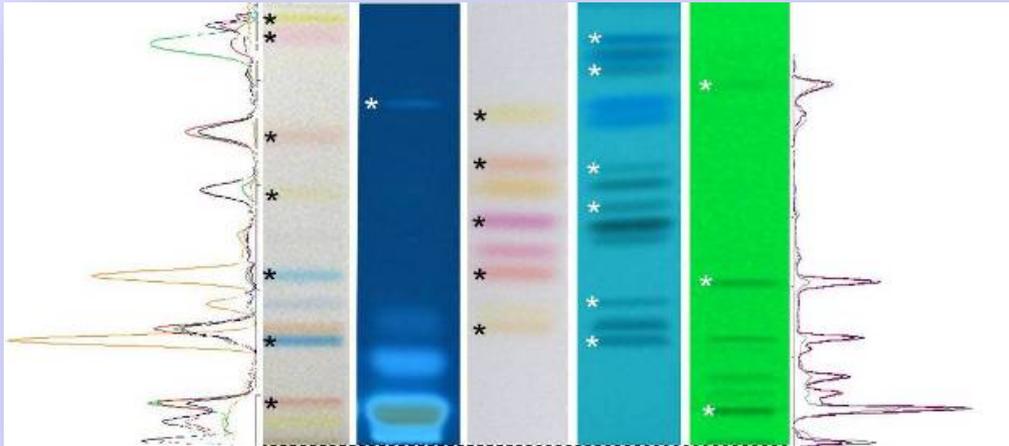
# Club de Chromatographie sur Couche Mince 18<sup>ème</sup> année \_ 30<sup>ème</sup> réunion

## détection et quantification les basiques

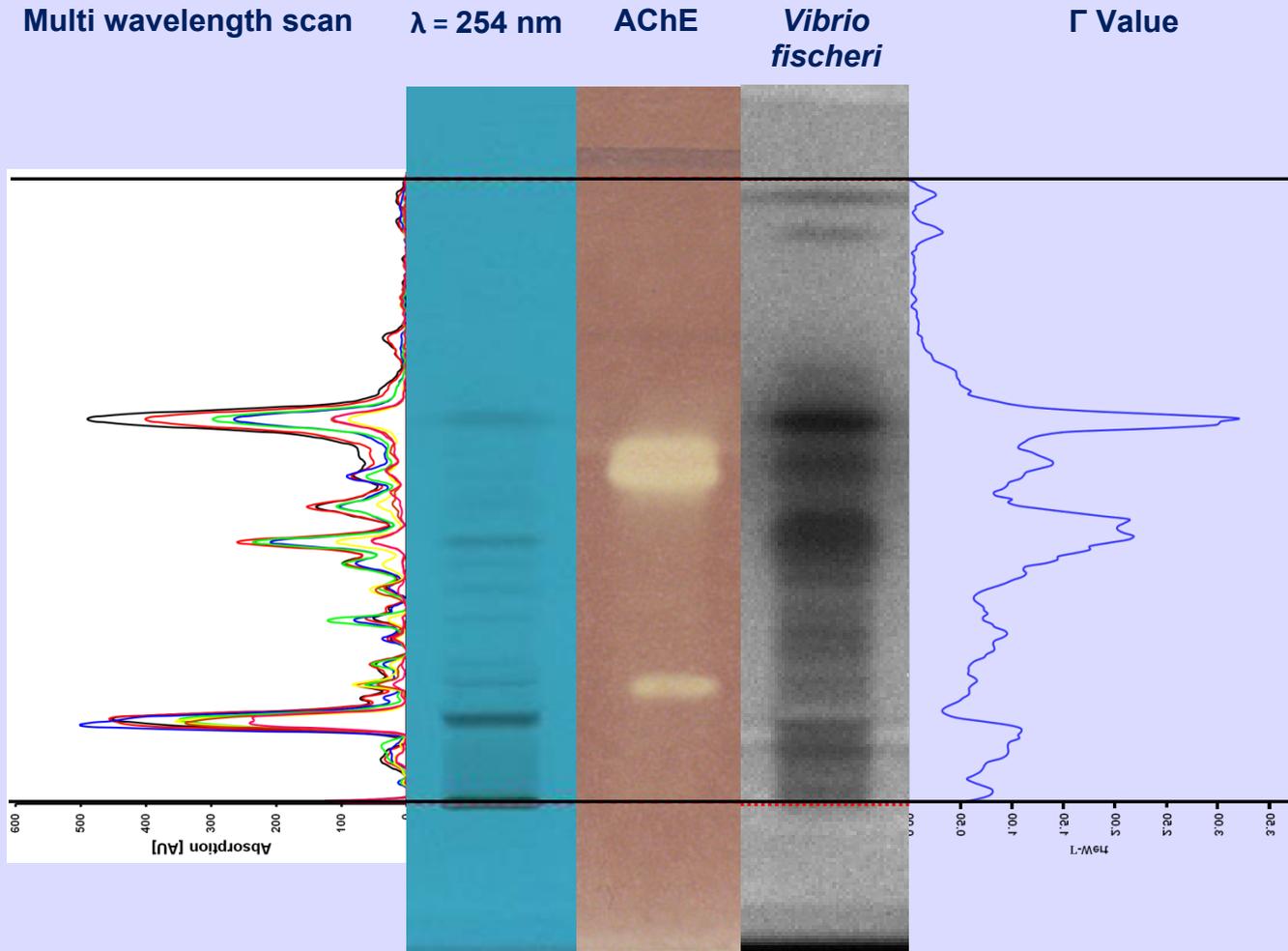
*Déjà vu en Juin 2001, Octobre 2008, et Décembre 2012 ...*

Pierre Bernard-Savary, Club de CCM, [info@hptlc.com](mailto:info@hptlc.com) +33 676 29 32 81

# Introduction

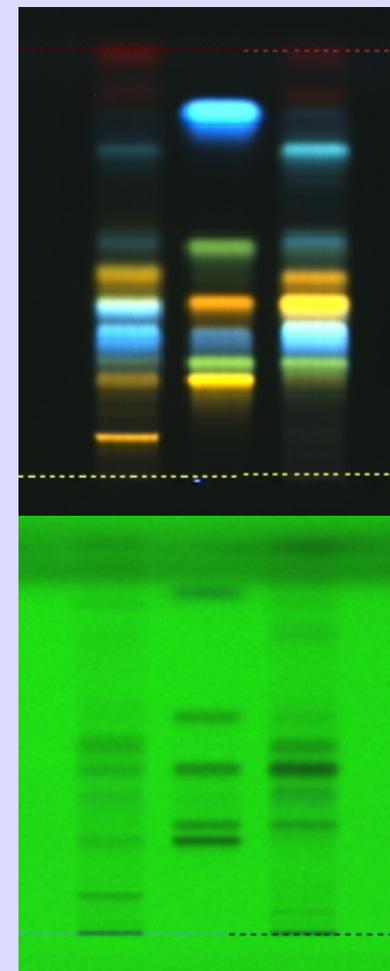
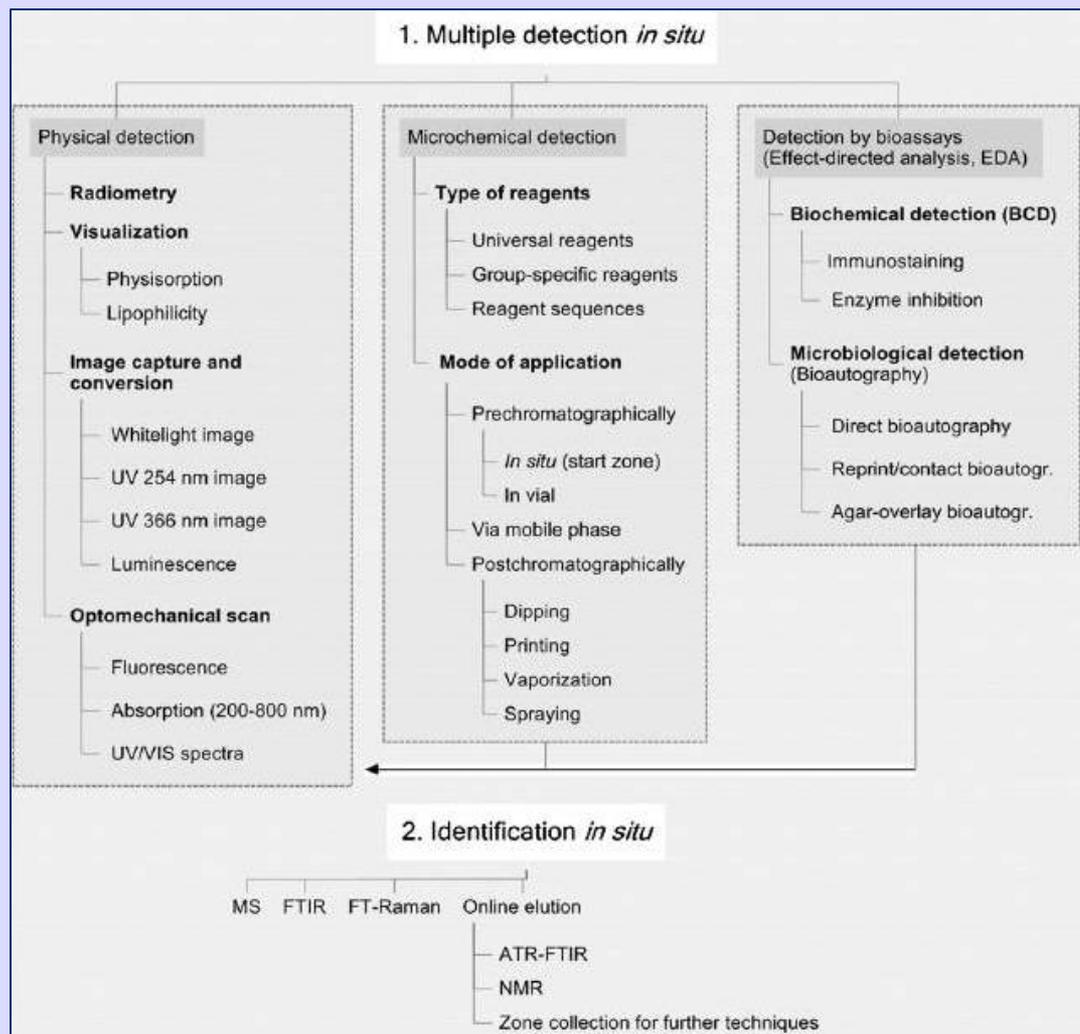


# Introduction





# Réaction (ou pas)/ Visualisation /...



# Introduction à la quantification



Déjà vu en Juin 2001 Octobre 2008 Décembre 2012 ...

Deux aspects liés :

- L'HPTLC est-elle une méthode quantitative ?
- Diffusion des compétences spécifiques

# Pré-requis à l'HPTLC quantitative



Choix de la plaque (HPTLC, indicateur 254nm) et pré-nettoyage.

Mode de détection **sélectif** avec ou sans révélation (limite de quantification) = attention au ratio **SIGNAL/BRUIT** (matrice et autres)

Qualité de réalisation ( finesse des pics avec retour ligne de base et bruit de fond limité)

# Choix de la plaque et nettoyage



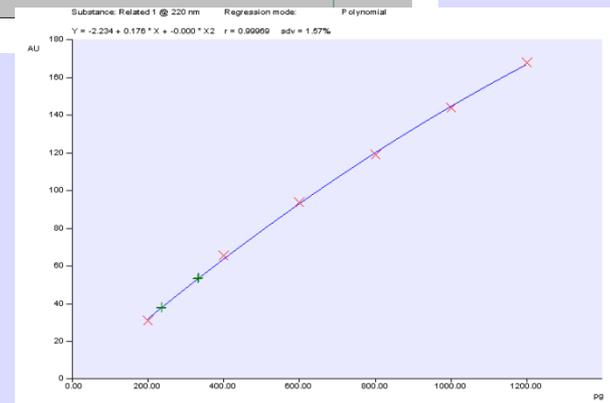
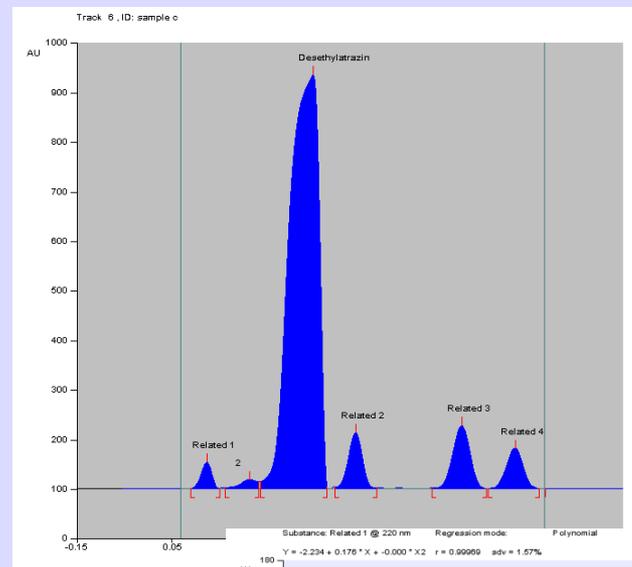
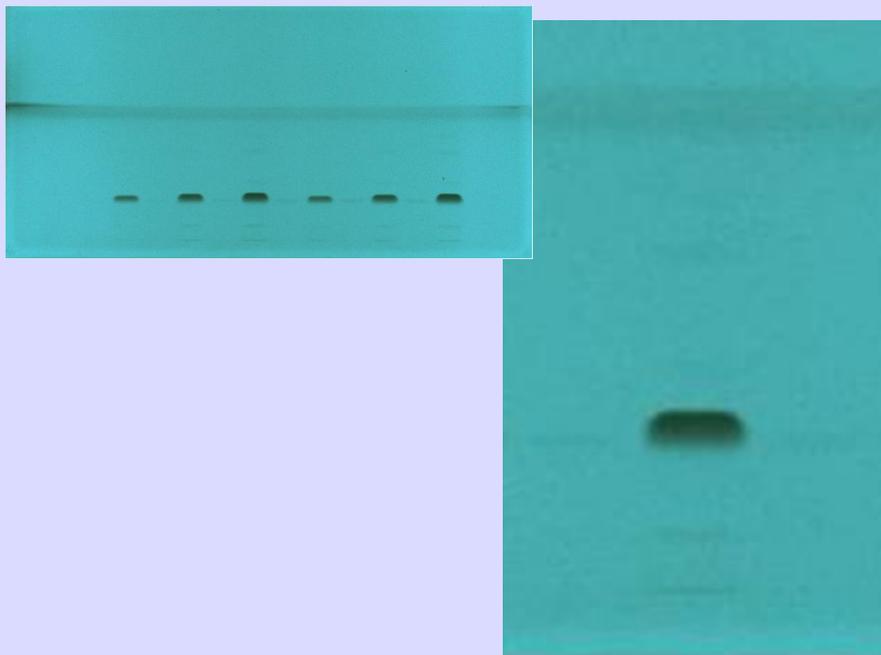
Indicateur indispensable en vidéo à 254nm  
mais pas en densitométrie

Nettoyage de la plaque peut s'avérer  
indispensable (AMD cf K.Burger, Lyon'03) selon  
le mode de détection et la sensibilité requise  
(sinon soustraction en dwl, avec éventuellement  
une ou plusieurs pistes de blanc)

Penser à souffler les poussières à 366nm  
(spikes sur chromatogramme)



# 254 nm et densitométrie



L'indicateur de fluorescence fait seulement perdre 5% de signal en densitométrie à 254nm

*Gamme 200 pg - 1.2 µg à 220 nm*



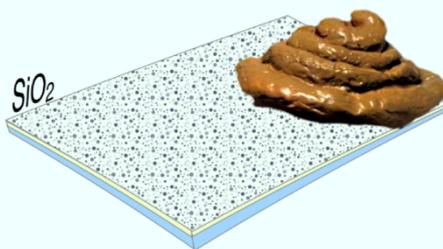
# Choix de la plaque HPTLC quantitative

thickness ( $\mu\text{m}$ )	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

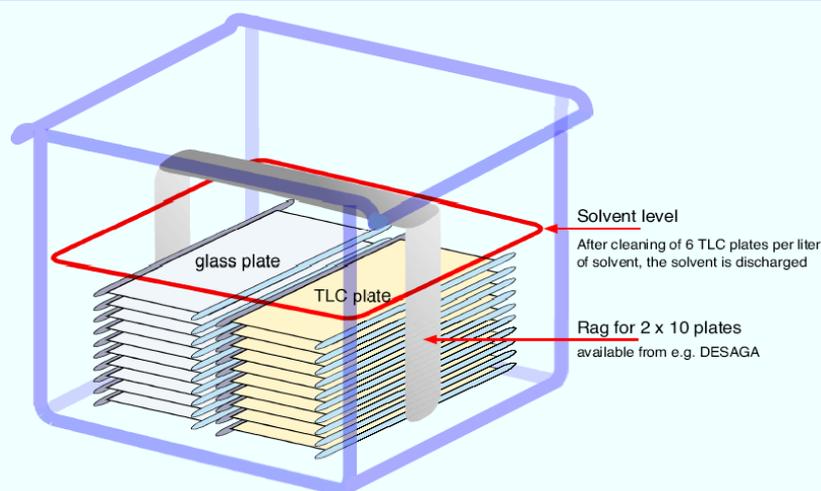
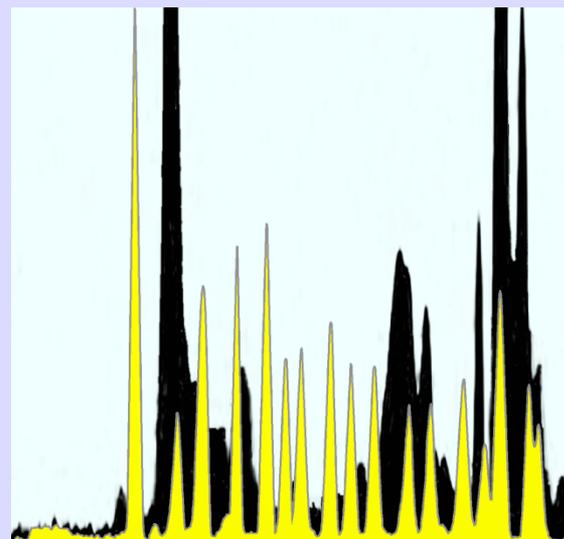
# Nettoyage...



A dog's muck ...



and how to prevent it!

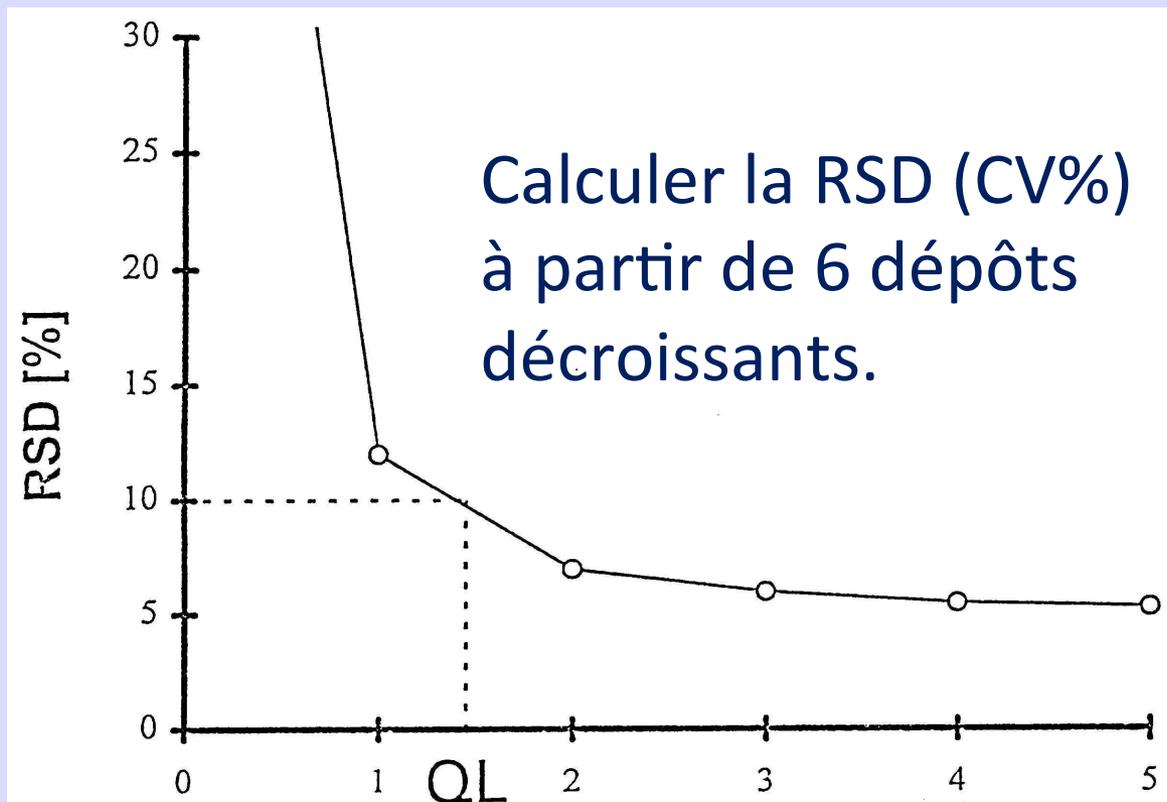


Simplement migrer dans l'isopropanol puis 20' à 120°C (refroidir au dessiccateur sans silicagel)

*From K.Burger, Lyon'03*



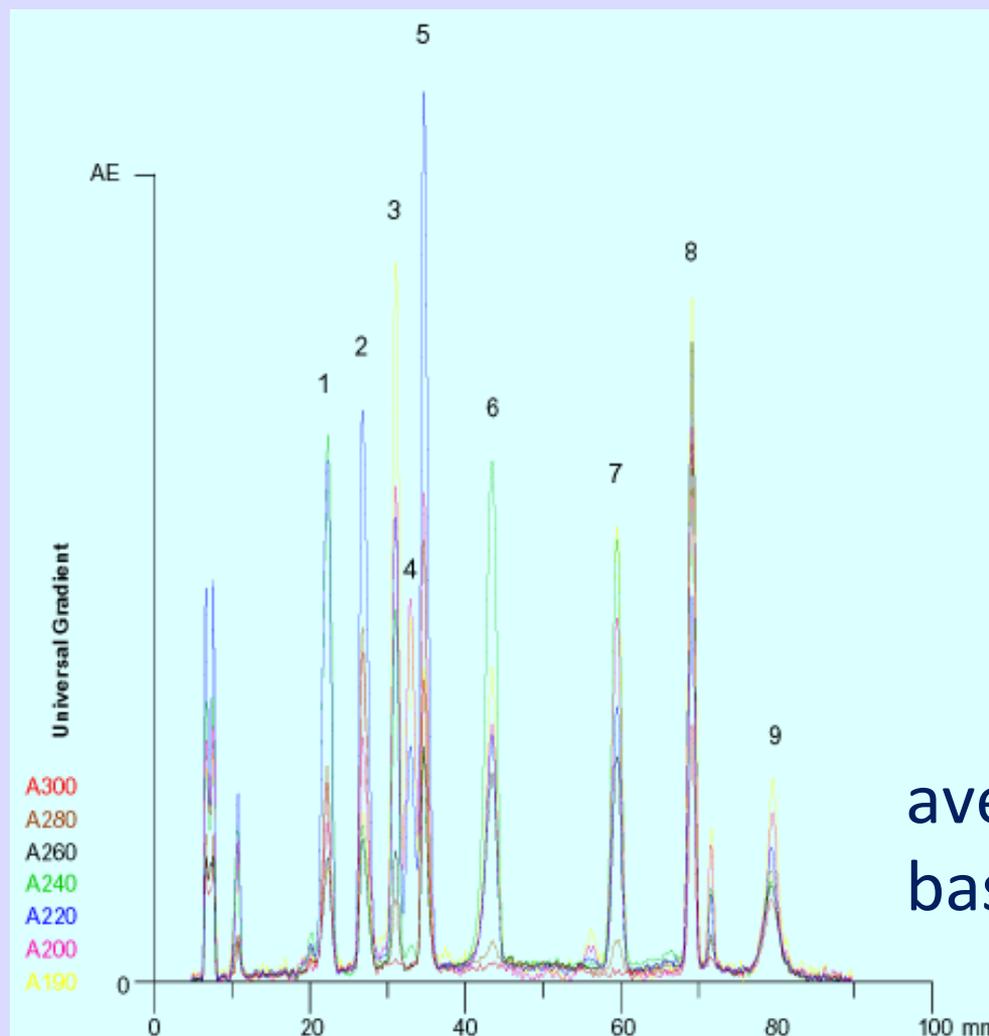
# Importante limite de quantification



d'après Eurachem et éviter 10x le bruit de fond,  
source d'erreurs.



# Qualité et finesse des pics



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

avec retour à la ligne de base et bruit de fond limité.

# Pré-requis à l'HPTLC quantitative



Choix de l'outil quand on a l'équipement:  
transformation d'une image informatique  
ou densitométrie multi longueur d'ondes  
(sinon à l'œil...)

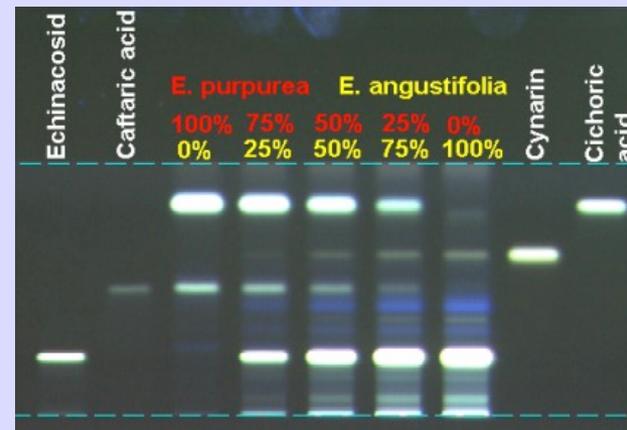
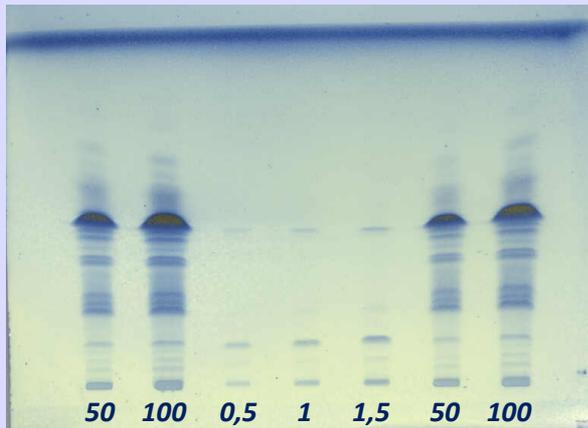
Utilisation d'une gamme de standard bien  
choisie

Utilisation optimale de la plaque (répartition  
dépôts)



# Choix de l'outil

Quand on a aucun équipement, l'évaluation à l'œil est possible mais est très loin des possibilités quantitatives instrumentales



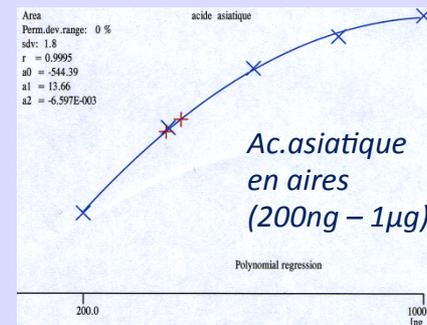
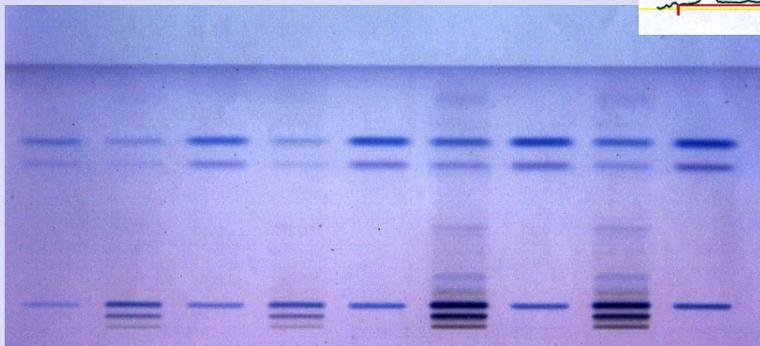
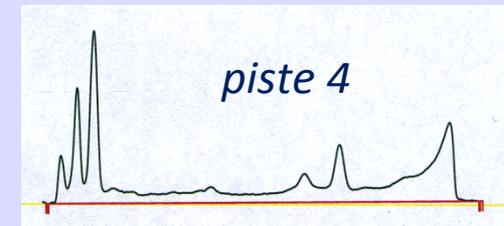
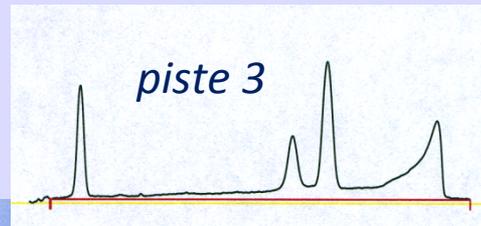
Dans ce cas le **choix de la gamme** de standard pour **encadrer les points** à mesurer est primordiale.

(comme si on mesure avec un appareil, règles identiques)



# Gamme de standard bien choisie

Il est nécessaire de fixer la gamme de calibration en fonction de la limite de quantification et de la gamme souhaitée.

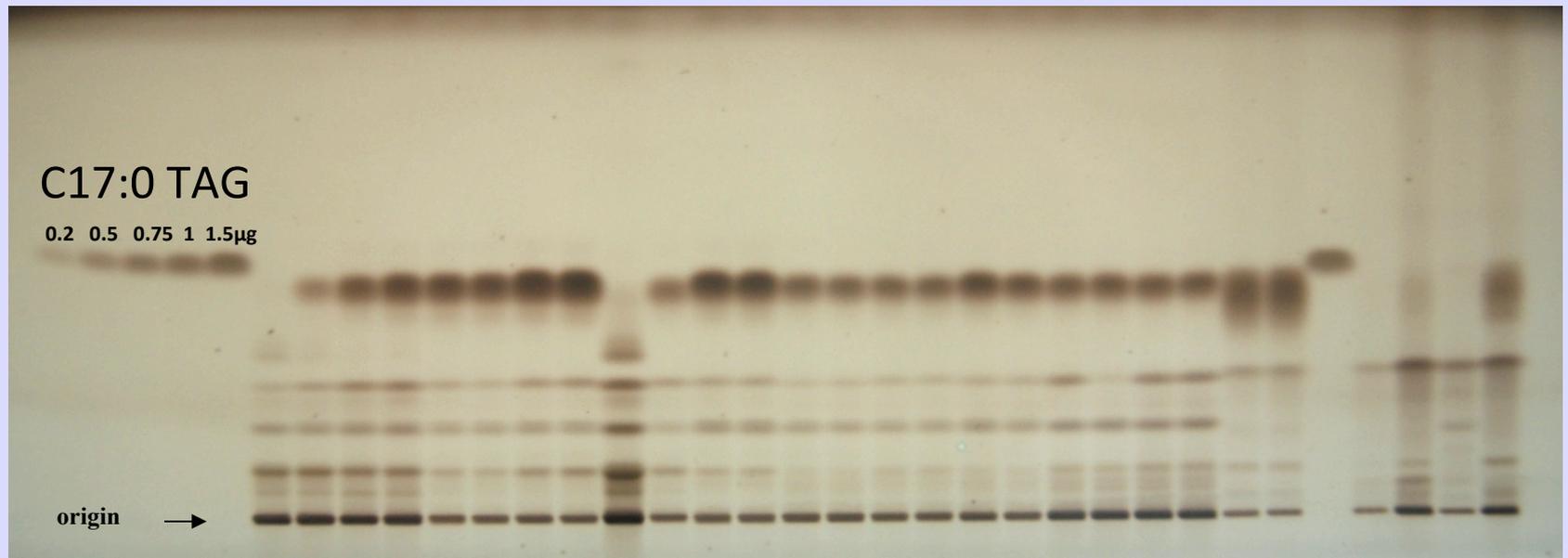


On dépose ensuite les échantillons (pas tous du même coté, et au moins en double) de manière à ce qu'ils se retrouvent dans la gamme.

# Utilisation optimale de la plaque(...)



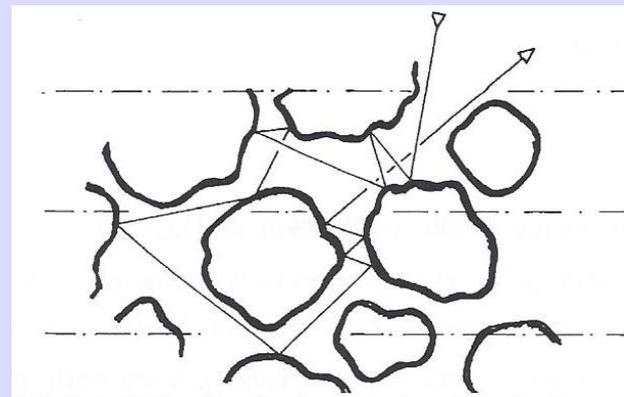
30 dépôts sur la plaque mais... les standards d'un coté ne permettront pas de tenir compte de l'homogénéité de la plaque (semi-quantitative HTS)





# Bases de la lecture quantitative

Le trajet optique d'un faisceau lumineux dans une couche de silice inhomogène donne lieu à une réflexion diffuse que l'on doit analyser si l'on veut mesurer l'absorbance des substances sur la plaque.



De ce fait en lecture densitométrique, les bases théoriques (S.Ebel) sont assez complexes. La loi de Boguer-Lambert-Beer qui décrit habituellement l'absorbance UV des substances ne peut s'appliquer et c'est l'équation hyperbolique dite de Kubelka-Munk qui peut décrire le phénomène si l'on considère une couche d'épaisseur infinie.

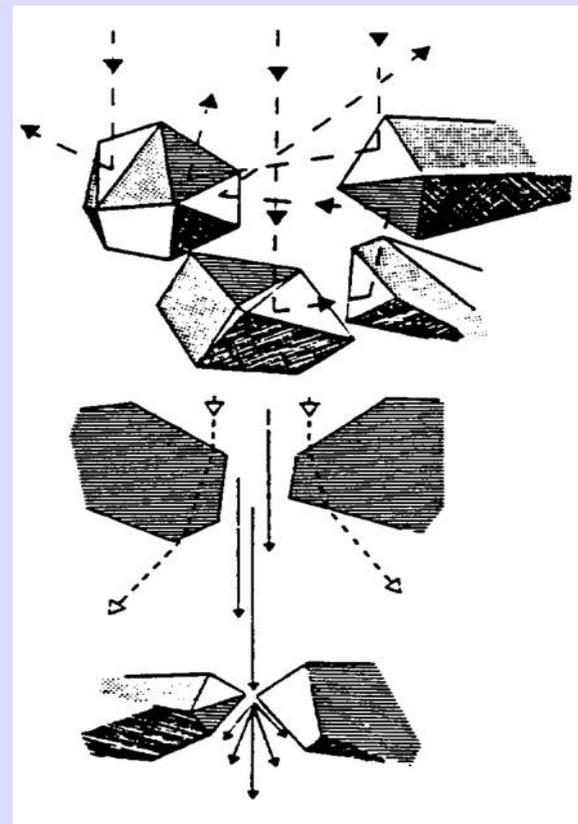


# Bases de la lecture quantitative

La simplification de cette équation dite linéarisation de Kubelka-Munk peut engendrer d'importantes erreurs dues à l'inhomogénéité des variances dans les calibrations multi-points (non corrélation à l'espace de données de départ).

C'est pourquoi cette approche est à proscrire.

Il faut préférer une calibration deux points si la réponse est linéaire ou que l'écart est inférieur aux variations aléatoires (random error).

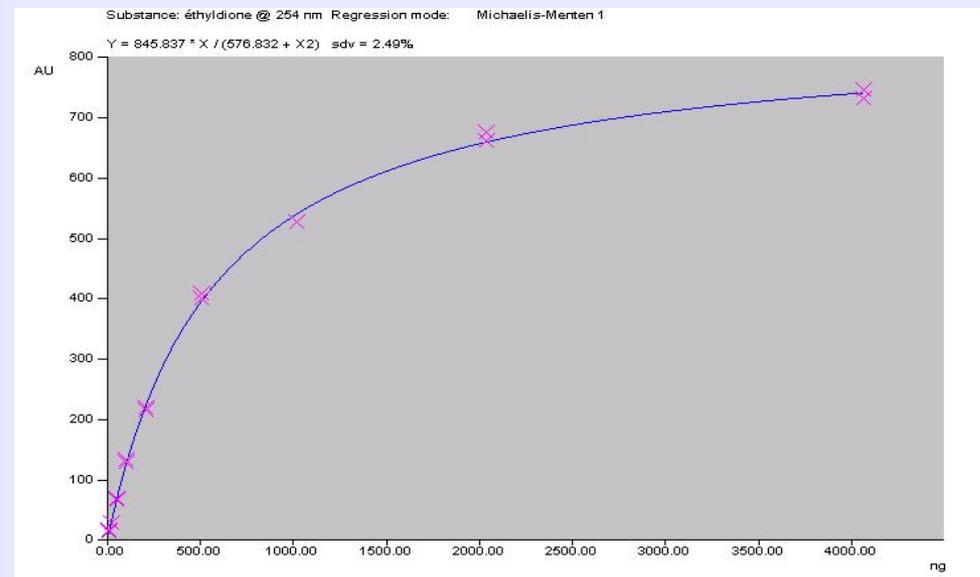




# Bases de la lecture quantitative

Comme bon nombre de phénomènes physico-chimiques la densitométrie répond à une fonction de saturation.

L'équation de Michaelis-Menten ( $y = ax / b+x$ ) a été reconnue dans plusieurs études comme étant la plus adaptée pour rendre compte de ce phénomène.





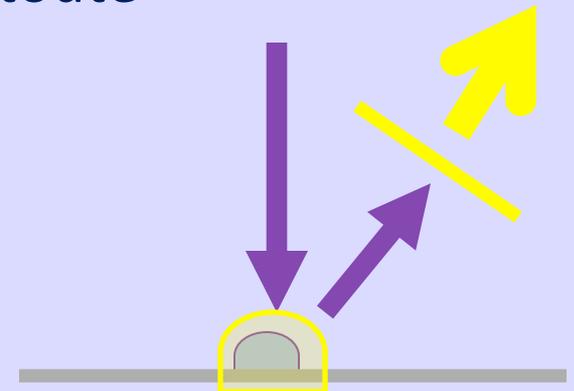
# Bases de la lecture quantitative

Conclusion :

En **absorbance**, il faut de préférence travailler aux limites de quantification pour s'éloigner autant que possible de la zone de saturation. Calibrer au moins sur deux points si l'on se trouve dans une zone linéaire pour borner le domaine de travail

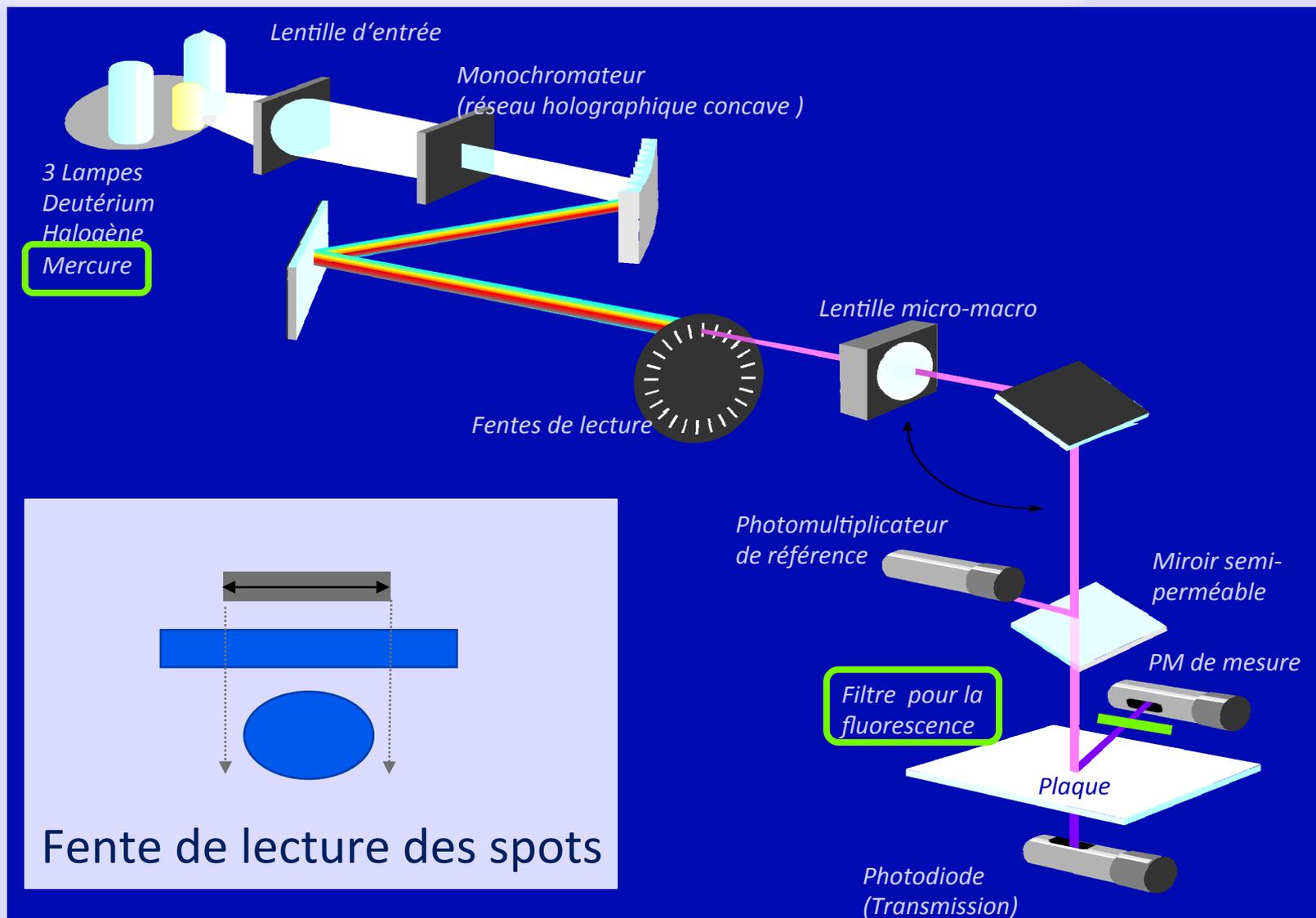
Ce domaine doit toujours être étudié avant toute analyse quantitative.

En **fluorescence** on est pas confrontés au phénomène de saturation, et on peut plus facilement obtenir une réponse linéaire



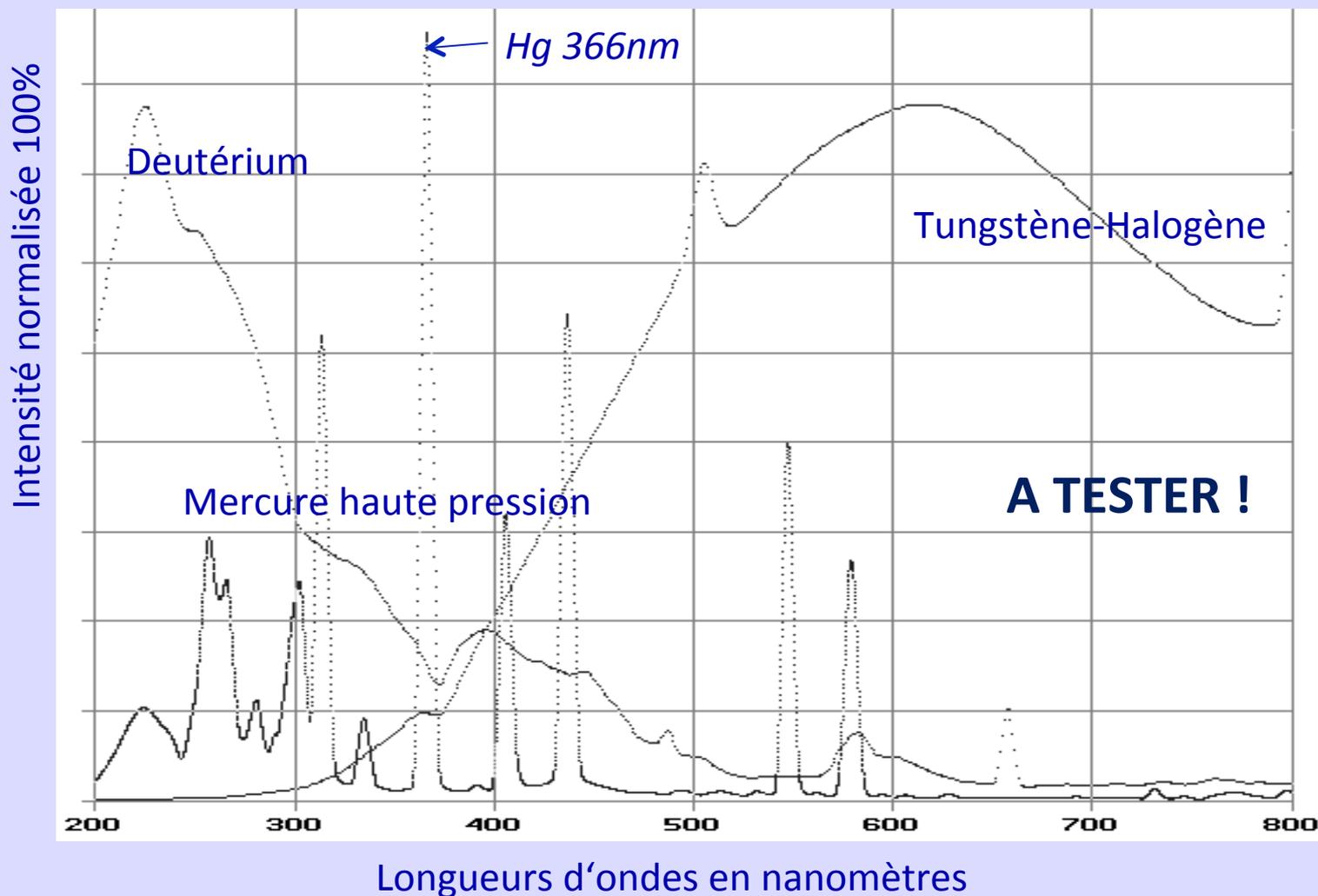


# Lecture en densitométrie (schéma)

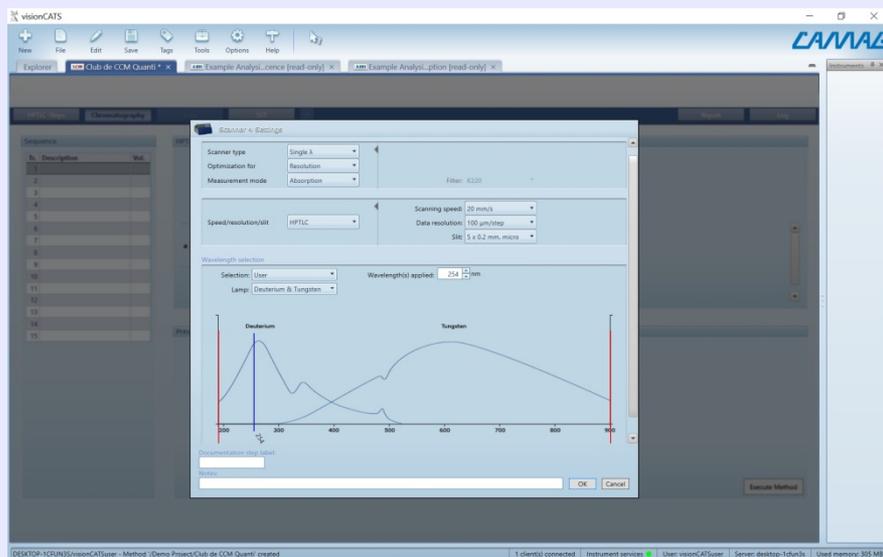




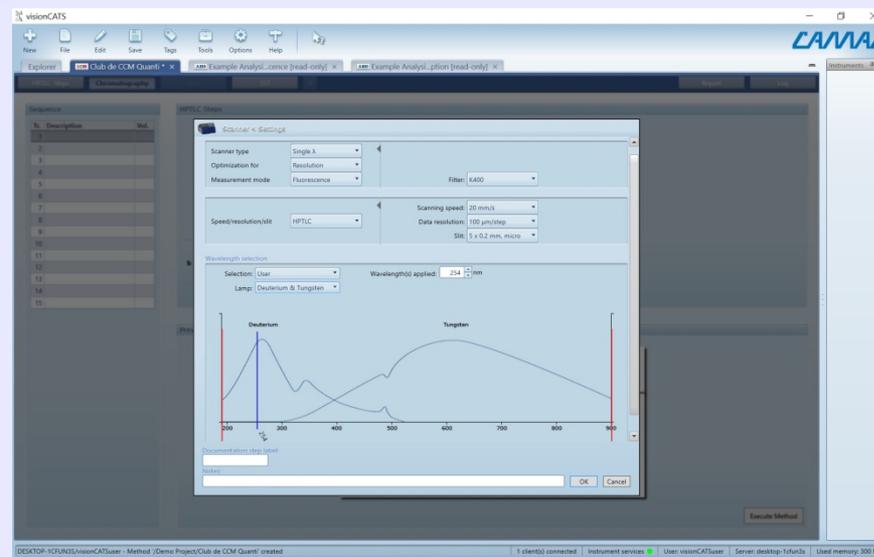
# Spectres des lampes



# Paramétrage abs et fluo



Mesure en absorbance



Mesure en fluorescence



# Paramétrage abs et fluo

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 0 adjust	5.0 mm
Track # for 0 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 0 adjust	K400
Track # for 0 adjust	K540
Track start for quick scan	U1:
Track end for quick scan	U2:
Track # for quick scan	U3: Automatic
Analog offset	10 %
Sensitivity	Automatic

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

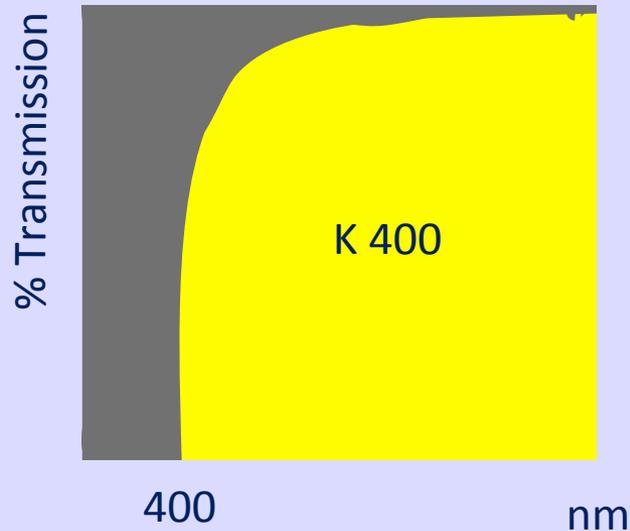
Detection Analysis ready 00:00:00

Mesure en fluorescence

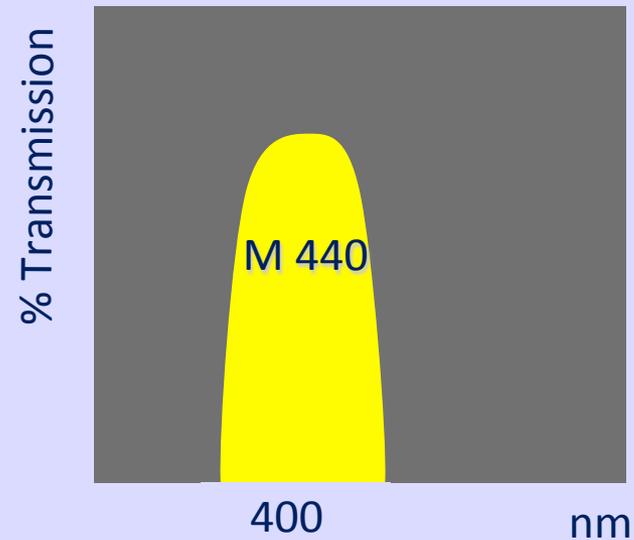


# Filtres en fluorescence

Filtre coupe-bas



Filtre à bande étroite



Types de filtres

Choix filtres:

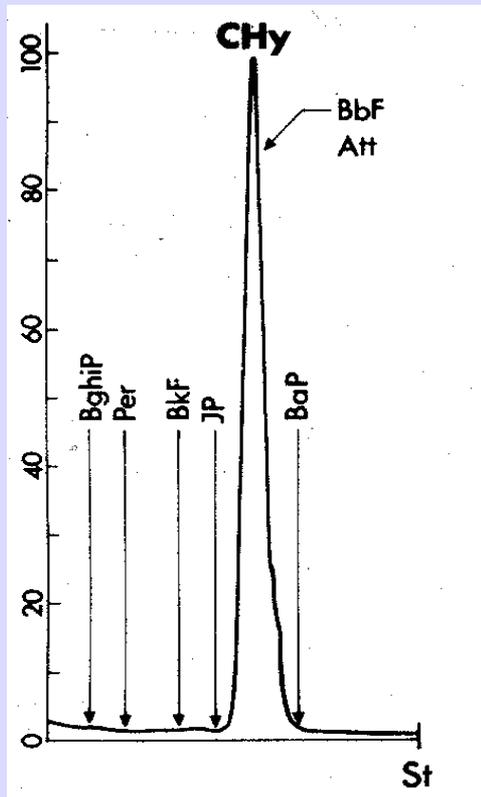
K 320 nm
K 340 nm
K 400 nm
K 460 nm
K 500 nm
K 540 nm
K 560 nm
M 590 nm
M 360 nm
M 440 nm

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

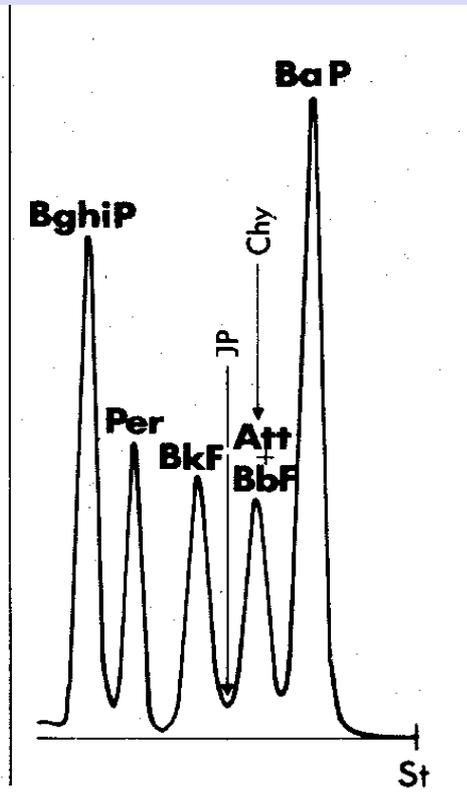


# Application au dosage des HPA

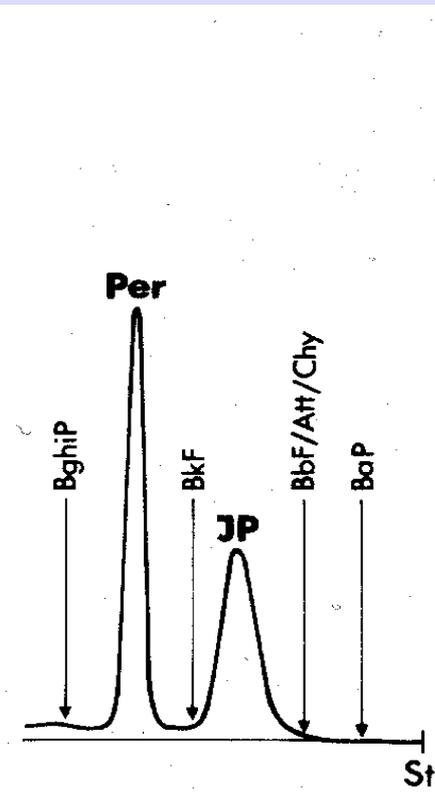
266/M365 nm



365/M436 nm



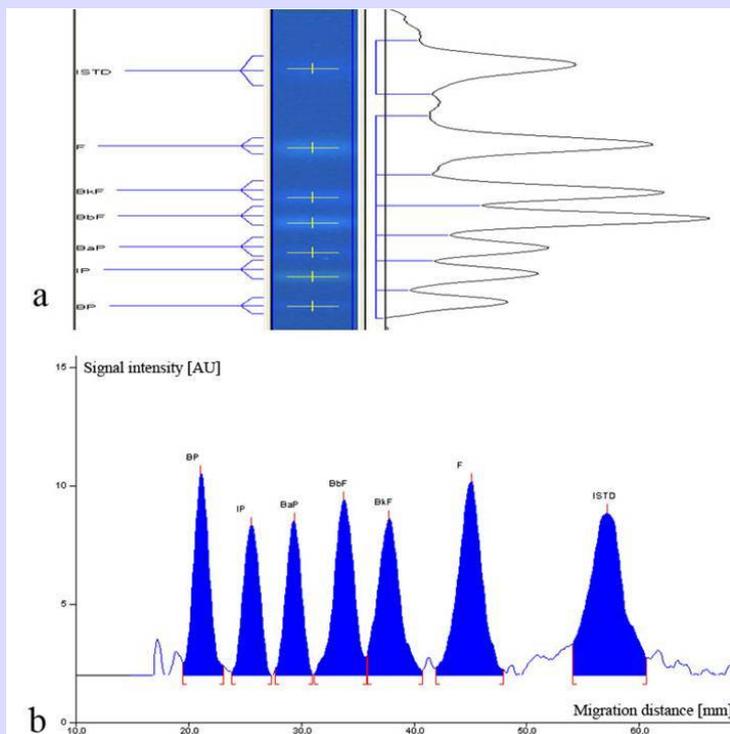
436/M578 nm



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



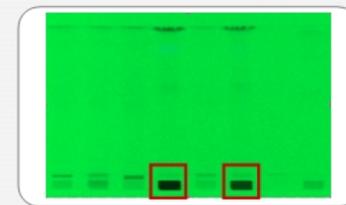
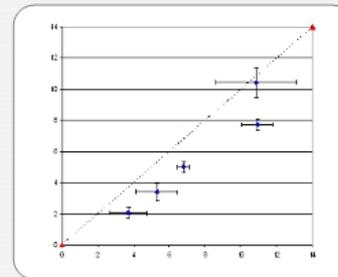
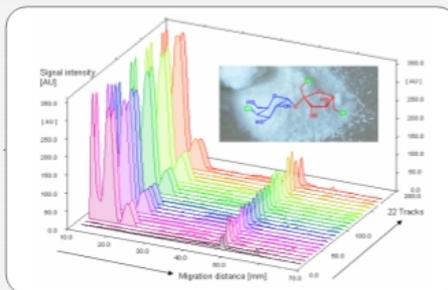
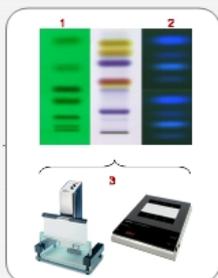
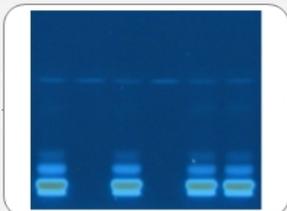
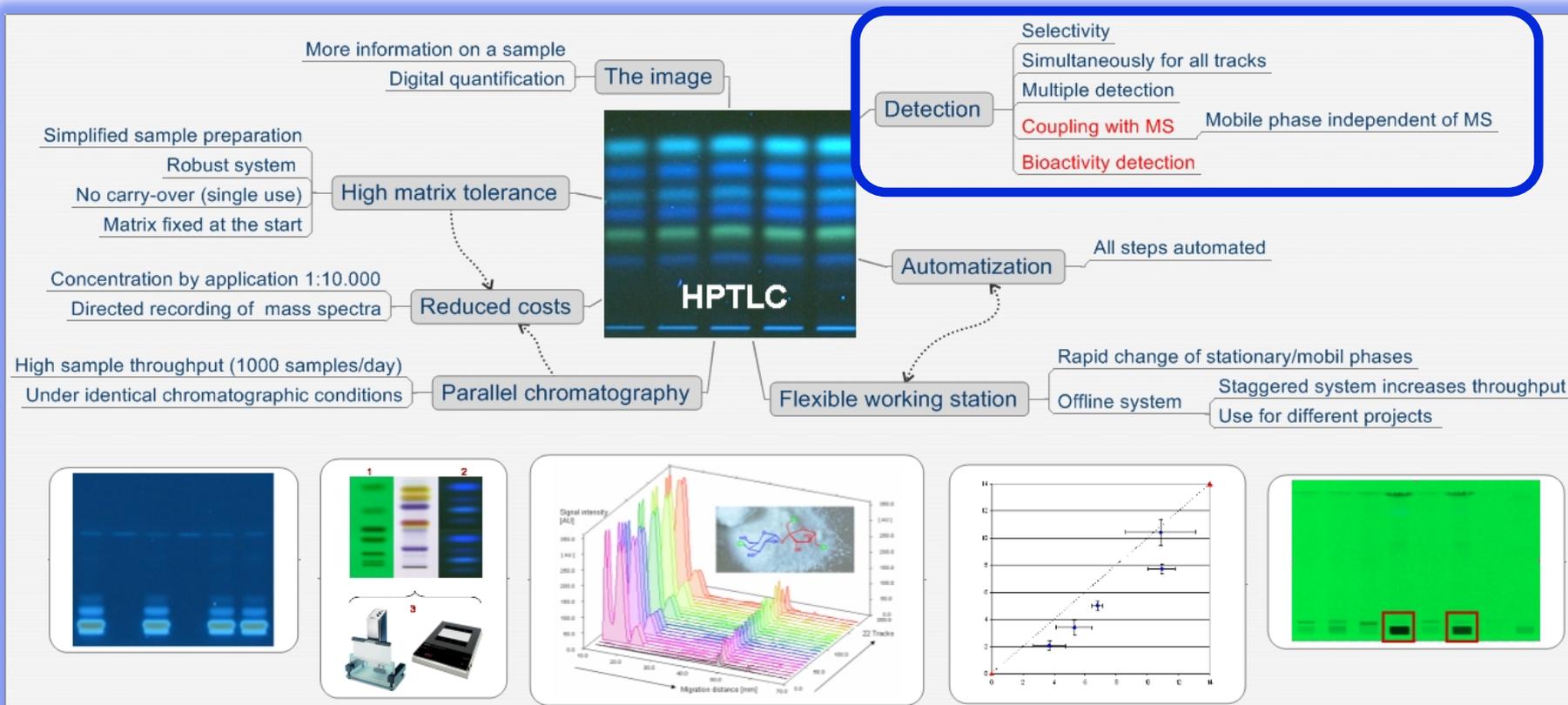
# Standards HPA en limite de quanti



PAH	Calibration range (pg/band)	Linearity* obtained by			
		TLC Scanner 3		DigiStore 2/VideoScan	
		Equation	%RSD	Equation	%RSD
FLT	290 - 870	$y = 0.025 x + 1.608$	3.3	$y = 1.84 x + 184$	3.5
BkF	95 - 285	$y = 0.083 x - 1.031$	2.8	$y = 6.13 x + 159$	2.4
BbF	108 - 324	$y = 0.092 x - 1.937$	3.0	$y = 6.91 x + 125$	2.0
BaP	51 - 153	$y = 0.163 x - 0.891$	3.5	$y = 7.64 x + 27$	3.1
IcP	110 - 330	$y = 0.068 x - 1.18$	6.3	$y = 2.00 x + 190$	3.0
BgP	200 - 600	$y = 0.046 x - 0.896$	4.8	$y = 1.72 x + 46$	2.5

Comparaison densitométrie (en bas) et quantification d'image (en haut) en fluorescence à 366 nm

# HPTLC is an attractive method



G.Morlock, Analytica 2008 *“Separations in a 3/8 time (3/8 min) with 300  $\mu$ L as dancing partner or 1000 runs per day”*

# Conclusion



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 à l'objectif) :

- recherche de la **sélectivité** en tenant compte des échantillons (très nombreuses possibilités, en particulier en fluorescence). Ne pas négliger les « biodétections ».
- étude du **seuil de quantification** (Eurachem\_sdv%) et de la **gamme de linéarité**,
- **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 réaliser quelques **tests de validité de la méthode**, même si l'on est pas astreint réglementairement à une validation formelle.



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

