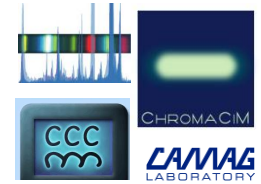
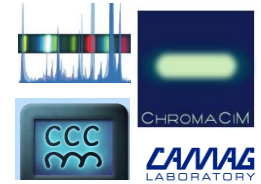


Pierre Bernard-Savary



Les Plaques CCM, HPTLC, et Prep

Introduction



CAMAG

Chemierzeugnisse Adsorptionstechnik Muttenz A G (1958)
www.camag.com

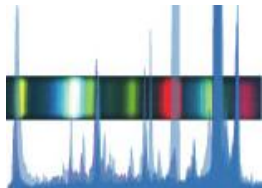


Club de Chromatographie sur Couche Mince (1998)
www.clubdeccm.com



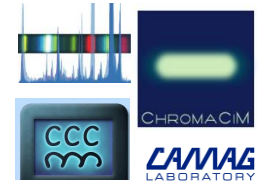
Chromacim SAS (2002)
www.chromacim.com

bm@chromacim.com (devis)
jd@chromacim.com
pdv@chromacim.com (sav)
pbs@chromacim.com



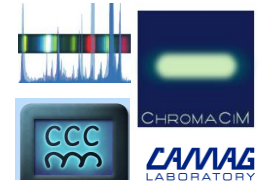
International Symposium for HPTLC,
Lyon (2003), Berlin (2006), Helsinki
(2008), et Bâle du 6 au 8 Juillet 2011
www.hptlc.com

Historique

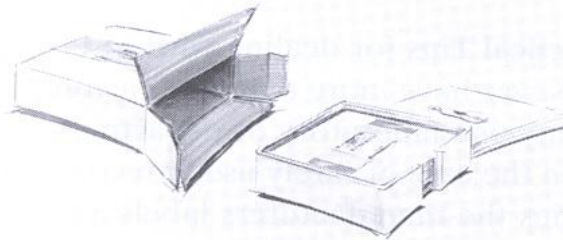
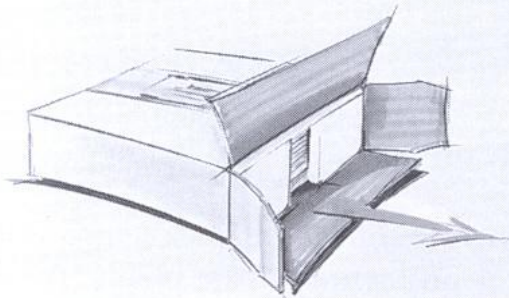


- 1903 : M.S.Tswett
- 1938 : N.A.Ismailov et M.S.Shraiber
- 1951 : J.G. Kirchner
- 1962 : E.Stahl
- 1975 : plaques HPTLC
- 1994 : Plaques HPTLC ultra-fines 100µm
- 2000 : Plaques Lichrospher
- 2002 : Plaques UTLC

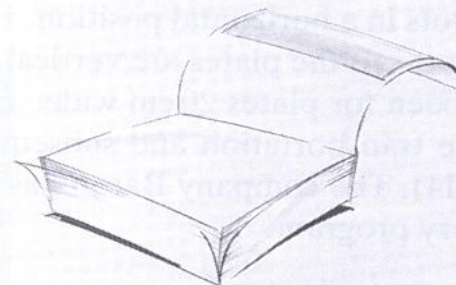
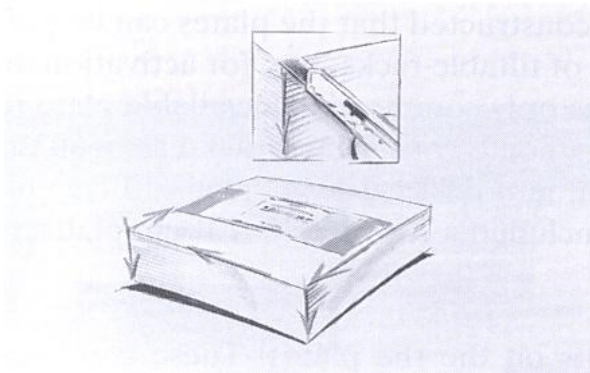
Précautions pour manipuler les plaques



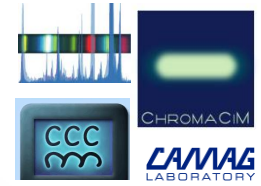
Attention: vous allez manipuler à l'air libre un support de séparation chromatographique analytique, avec lequel il serait préférable de prendre des précautions,...



ex: mode
d'ouverture
des boîtes



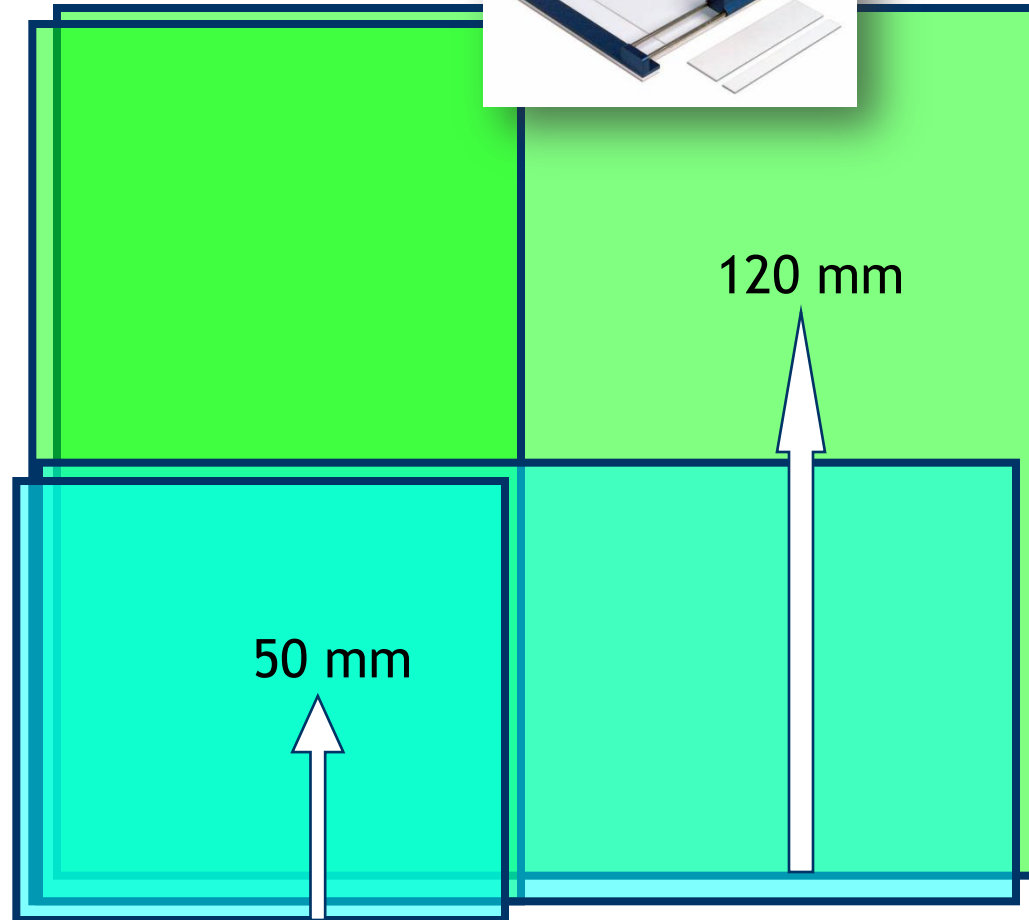
Dimensions des plaques



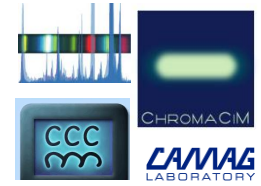
Et si la taille ne vous plaît pas: smartCUT



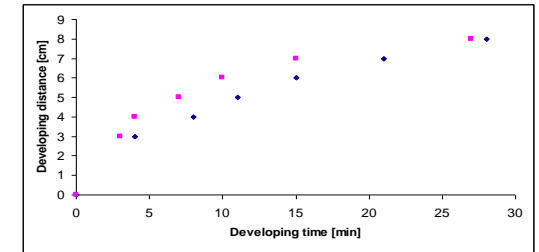
- **CCM :**
20x20, 10x20, ou 5x20 cm
Migration sur 120 à 150 mm
Existe aussi en petites dimensions (5x7.5)
- **HPTLC :**
Taille 10x10 ou 20x10 cm
Migration sur 50 mm
Existe également en 5x5 cm
- **CCM :**
Taille 20x20 cm
Migration sur 120 à 150 mm



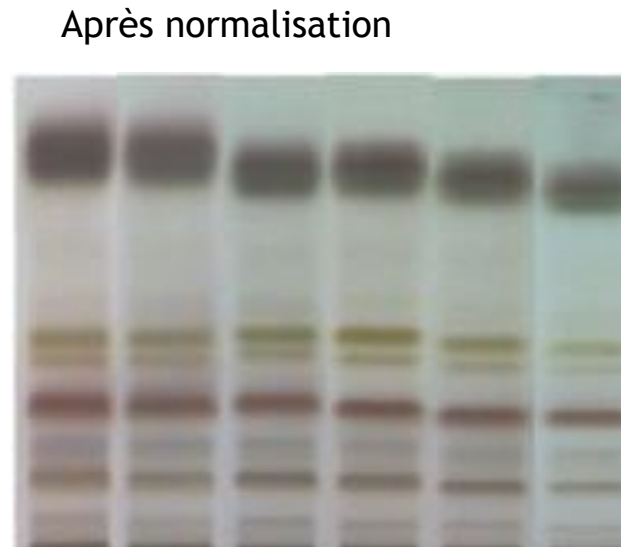
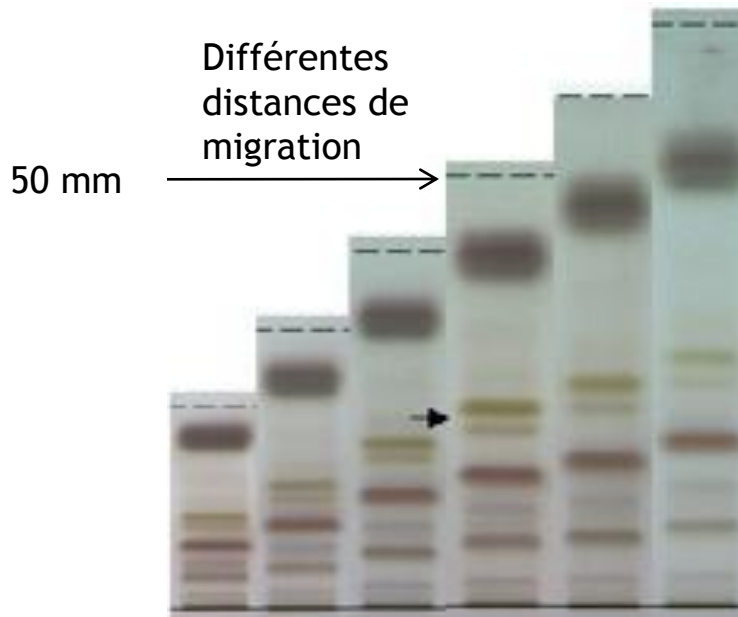
Distance de migration optimale



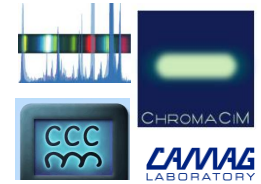
- Plus on fait migrer loin plus on augmente la diffusion
- Il faut trouver un optimum, et il est toujours préférable de faire migrer moins loin : **sensibilité et gain de temps**
- Primordial si la plaque est vraiment analytique (HPTLC), ou si l'on veut optimiser les possibilités de purification



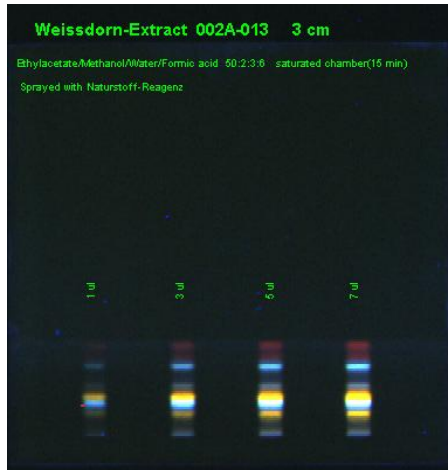
Distance et temps de migration



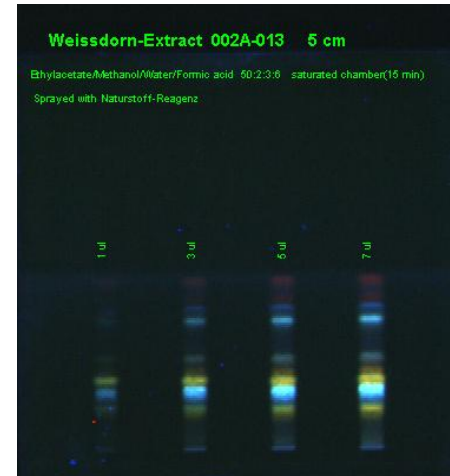
Exemple sur séparations d'extraits végétaux



30 mm



70 mm



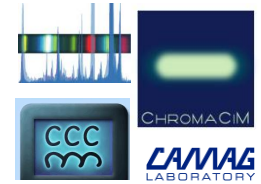
50 mm



90 mm

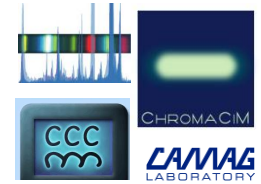


Conclusion sur les distances de migration



- C'est un paramètre important, qu'il est possible d'optimiser, en fonction de l'objectif
- La pharmacopée européenne (2.2.27) recommande les deux tiers de la plaque
- Il est également impératif de noter la distance à partir du bas de la plaque et à partir du dépôt, pour lever toute ambiguïté
- Le R_f (HR_f) est censé rester invariable vis-à-vis de la distance de migration
- Attention de ne pas confondre une plaque CCM 10x20 et une plaque HPTLC 20x10

L'épaisseur de gel sur les plaques



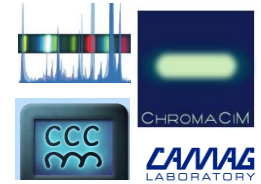
CARACTERISTIQUES :

- Les plaques de CCM sont de 250 μm d'épaisseur , sur verre, ou de 200 μm sur aluminium .
- Les HPTLC sont soit de 200 μm soit de 100 μm dans le cas des plaques ultra-fines
- Les plaques préparatives sont de 0.5, 1 ou 2 mm
- Les UTLC sont de l'ordre de 5 μm d'épaisseur

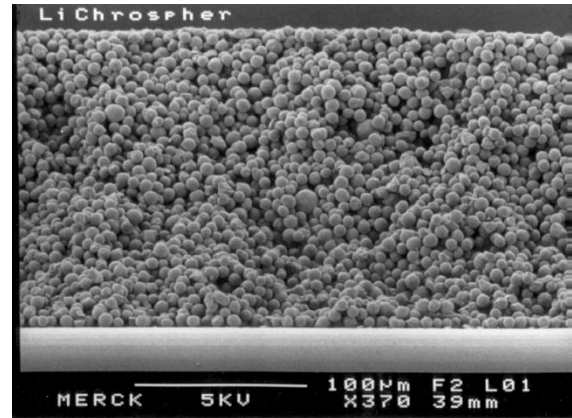
CONSEQUENCES PRATIQUES:

- L'épaisseur du gel est directement lié à la sensibilité sur la plaque : plus le gel est fin, plus la plaque est sensible. (l'autre paramètre est la focalisation des spots).
- Avec des plaques 100 μm on peut descendre au ppt, et avec des plaques Lichrospher on est encore plus sensible
- Si l'on utilise des plaques préparatives, il faudra donc faire attention de ne pas prendre des plaques trop épaisses au risque de ne plus "voir" le produit

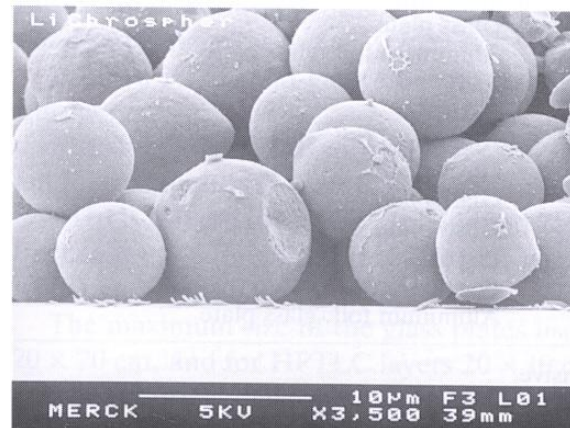
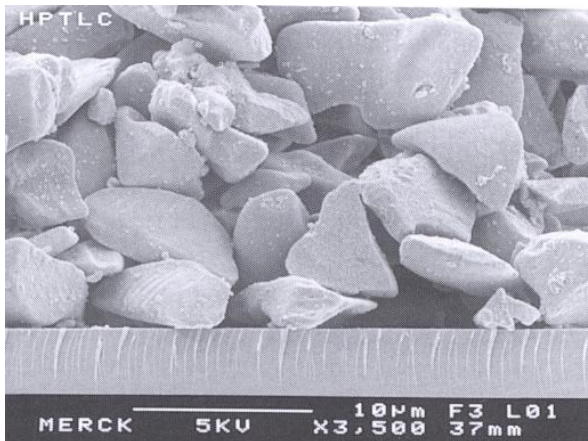
Le gel de silice 60



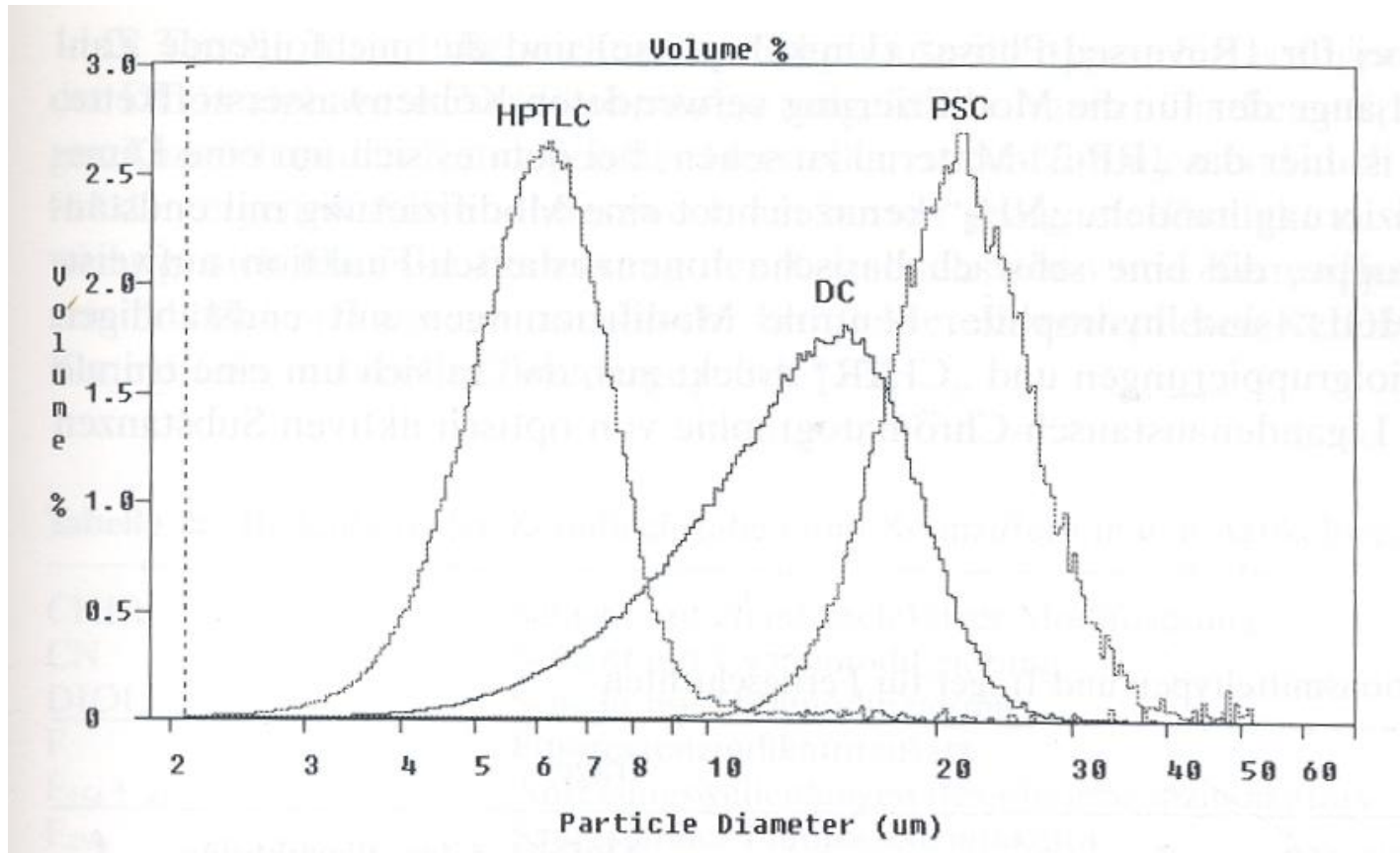
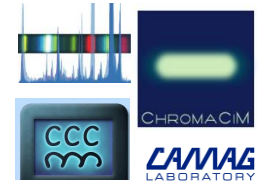
(Lichrosorb)



- Irrégulier (Lichrosorb)
ou sphérique (Lichrospher)
- Porosité de 60 Å :
permet la
transposition au
regard des autorités



Répartition granulométrique



Cas particulier de la silice monolithique

■ UTLC

Dimension 60x36 mm

Support verre

Épaisseur 10 μm

Pas de liant

Macropores : 1 à 2
microns

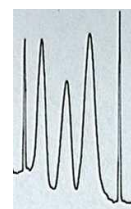
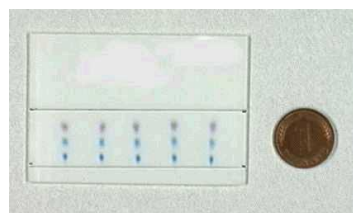
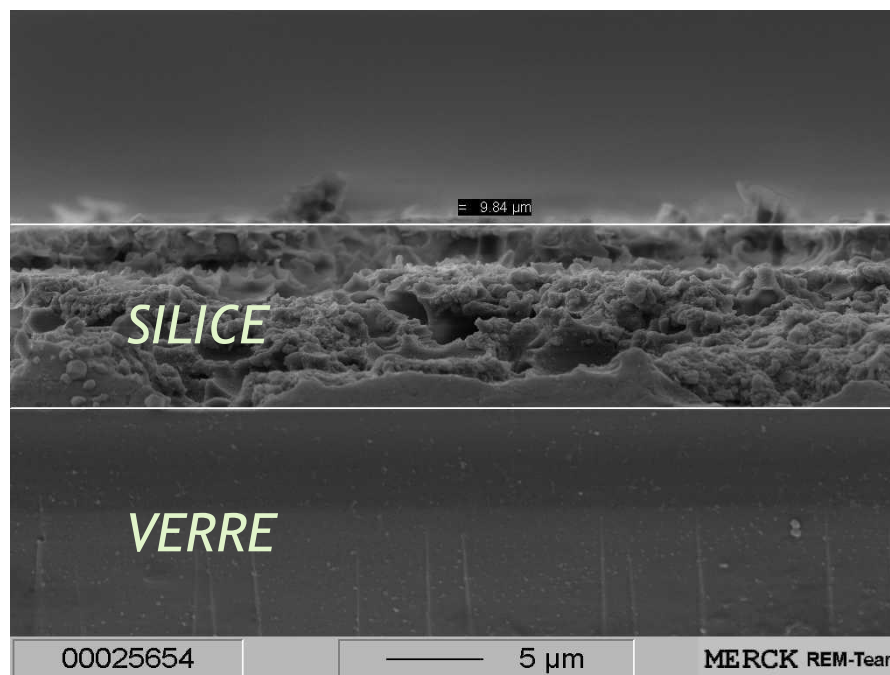
Mésopores 30 à 40 Å

Surface Spécifique :

~ 350 m^2/g

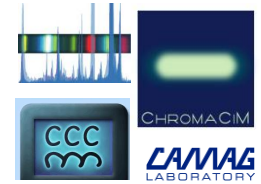
Volume spécifique :

~ 0,3 ml/g

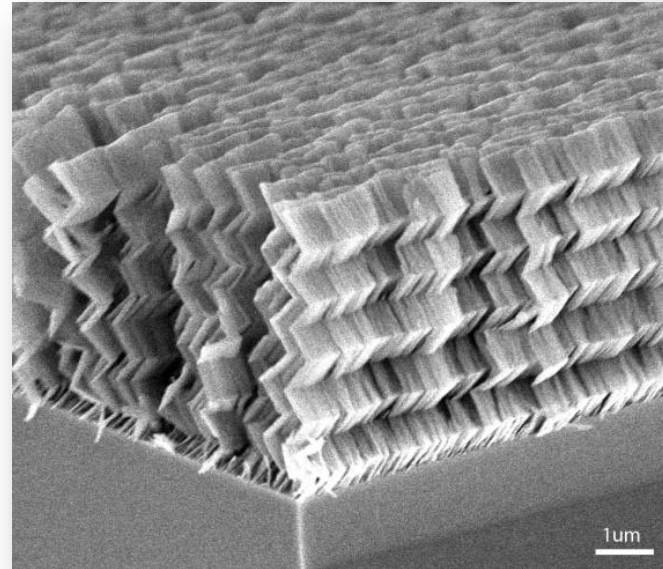


10 nL; 1,5 cm;
165 secondes;
pour 3 colorants
dans le toluène

Développements actuels

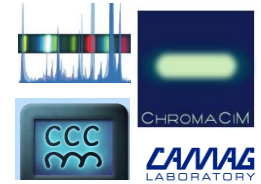


- Plaques obtenues par GLAD (glancing angle deposition) dépôt d'un film nanostructuré de 5 μm
- Pas de liant
- Contrôle de la forme de la structure (hélicoïdale,...)

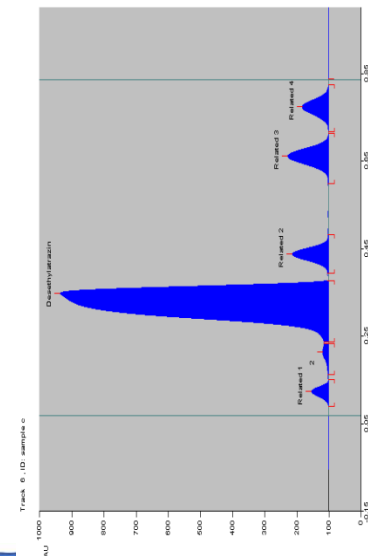
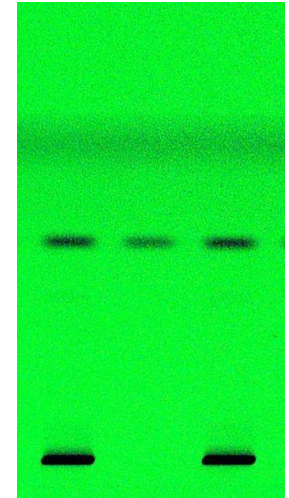


*D'après Intl Symposium HPTLC, Helsinki 2008: Ultrathin layer chromatography on plates with engineered nanostructure
Louis Bezuidenhout, University of Alberta, Edmonton, Canada*

Additifs dans les plaques : l'indicateur

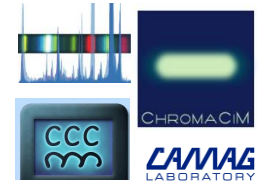


- L'indicateur de fluorescence permet de visualiser les substances qui absorbent dans l'UV à 254nm et apparaissent en sombre sur un fond fluorescent
- lorsqu'il est présent peut être de deux sortes :
 - F254 de couleur verte, dérivé de Zinc
 - F254S de couleur bleue, dérivé de Molybdène, donc Stable aux acides



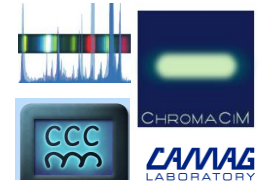
Même piste,
densitogramme
à 220 nm

Additifs dans les plaques : le liant



- Le liant : permet de maintenir la silice sur la plaque. Les plaques sans liant (dites « H ») sont très fragiles voire inutilisables.
- Il peut être de différents types, par exemple du plâtre. C'est le cas des plaques dites « G », pour « gypsum »
- Les fabricants actuels utilisent un dérivé de PEG
- La qualité du liant et sa teneur dans la plaque sont des garanties de performance et varie d'un fabricant à l'autre
- Seules les plaques monolithiques n'ont pas de liant

Cas particuliers

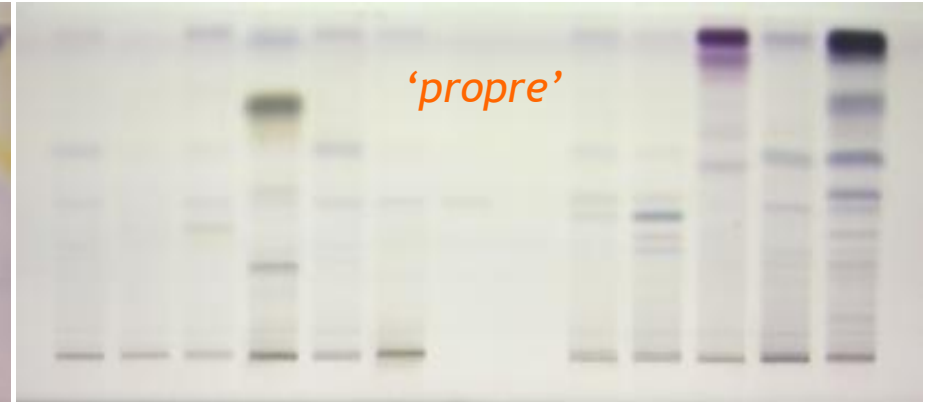
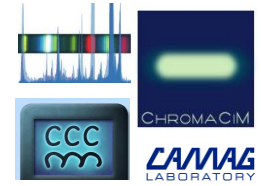


- **Lux** :plaque avec plus d'indicateur de fluorescence
- **Purity** : emballée dans un emballage étanche aux gaz (aluminium plastifié)
- **W** (“wetable”) plaque mouillable et résistante à l'eau
- **R** (“reinst”) plaque prénettoyée

CONSEQUENCES PRATIQUES :

- Les plaques Lux ne permettent pas d'augmenter la sensibilité de détection sur la plaque (l'indicateur limite de 5% la sensibilité du densitomètre à 254 nm)
- Il est important de noter que les plaques se chargent spontanément d'impuretés
- D'où l'intérêt des plaques WR qui sont nettoyées et emballées dans un emballage étanche au gaz.

Nettoyage des plaques



- Deux solutions: par migration ou par immersion

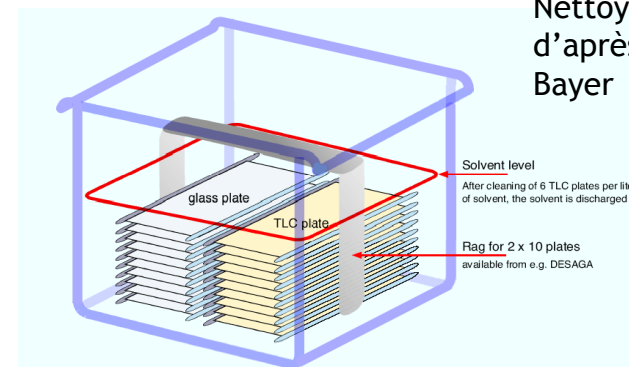
MIGRATION

- Isopropanol
- 20mn à 120° C
- Dessicateur (sans silicagel)

- solvant différents : attention au séchage + impact sur la séparation

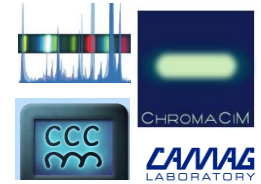
IMMERSION

- Automatisable



Nettoyage des plaques d'après K.Burger, Bayer

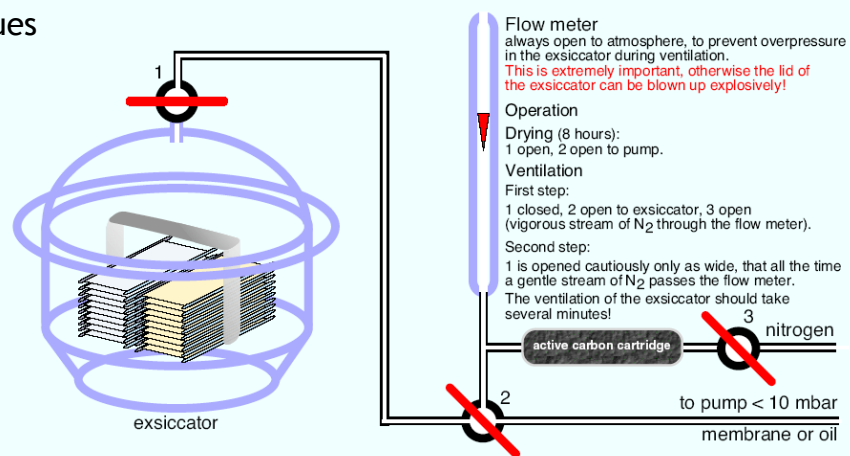
Conséquence du nettoyage des plaques



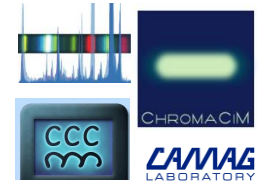
- **migration** : les impuretés montent au front : attention au sens de migration lors de l'utilisation
- **Immersion**: le fond de la plaque est uniforme mais parfois moins bien nettoyé et nécessite une installation particulière
- choix du **solvant de nettoyage** : le solvant de nettoyage s'il est trop polaire sera difficile à sécher et à éliminer. Peut nécessiter une installation sous vide.
- attention à la **modification de l'activité de la Silice** qui peut s'apparenter à un conditionnement de la plaque de Silice qui passe de la chromatographie strictement d'absorption à une chromatographie de partage; mais cela peut permettre d'augmenter la reproductibilité de la séparation

Séchage des plaques
d'après K.Burger,
Bayer

Le nettoyage devient indispensable à partir d'un certain niveau de performance

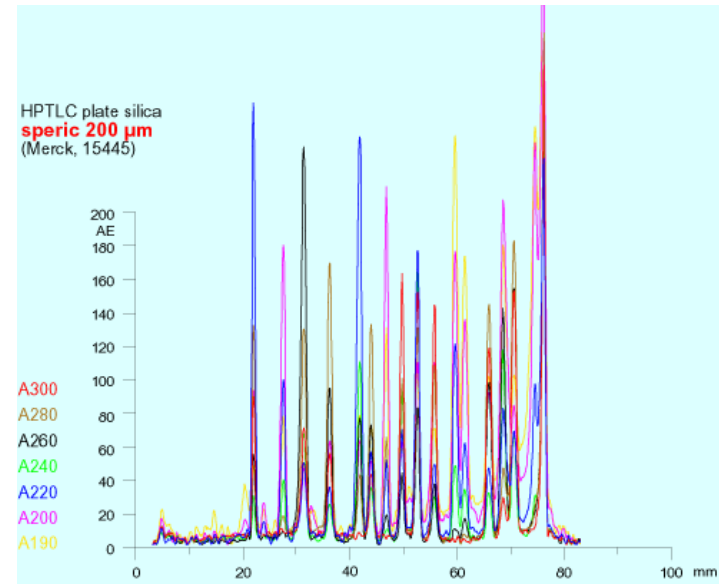
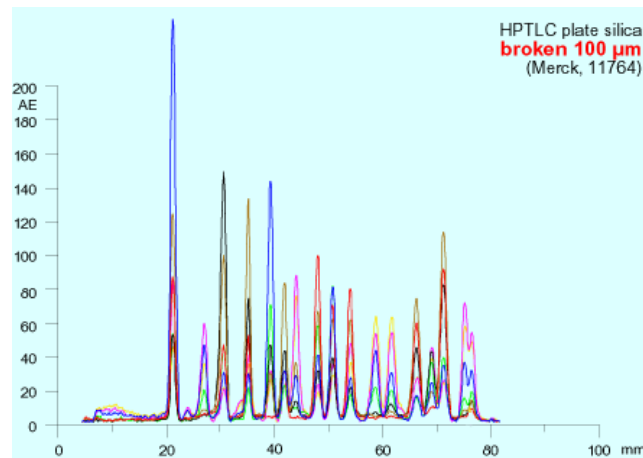


Qui dit performance dit ...



- ...AMD, ultra thin, WR, et Lichrospher

Séparation de pesticides (100ng)

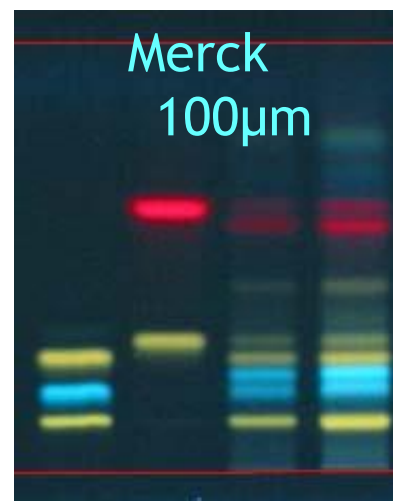
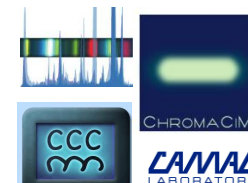


- Ultra-thin (100 µm)

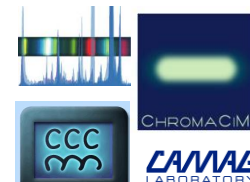
- Lichrospher

- ...puis lecture au densitomètre multi longueur d'ondes (190nm>)

Et le choix du bon fournisseur...



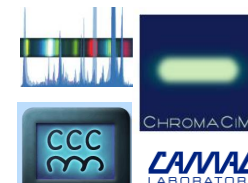
Performance et données expérimentales



■ 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

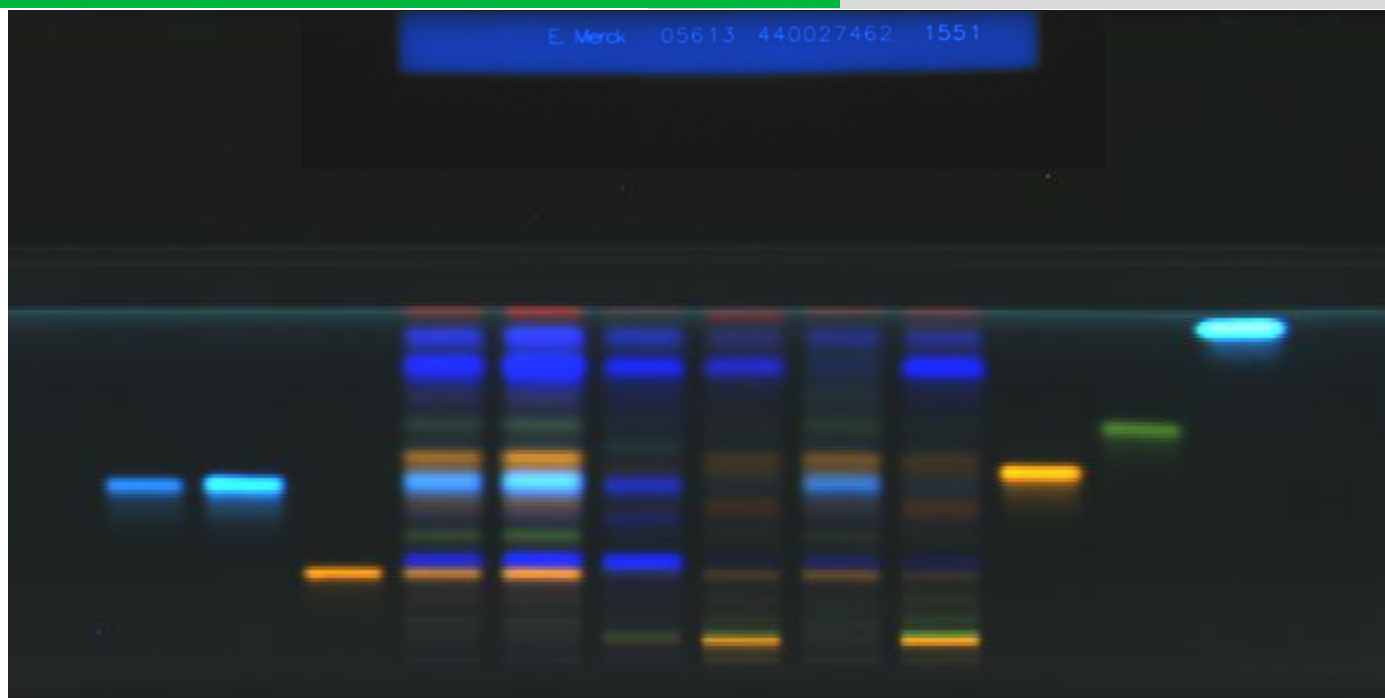
Archivage BPL et BPF



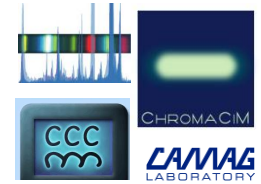
E. Merck 05613 440027462 1551

E. Merck 05613 440027462 1551

E. Merck 05613 440027462 1551




C'est sur l'étiquette



100 Plaques HPTLC 5 x 5 cm Gel de silice 60 F ₂₅₄ prédécoupées de 10 x 10 cm	1.05635. 100 HPTLC-Platten 5 x 5 cm Kieselgel 60 F₂₅₄ aus 10 x 10 cm vorgeritzt 100 HPTLC plates 5 x 5 cm Silica gel 60 F₂₅₄ ex 10 x 10 cm pre-scored MERCK
100 Lastre HPTLC 5 x 5 cm Gel di silice 60 F ₂₅₄ ex 10 x 10 cm preincise	
100 Cromatoplas HPTLC 5 x 5 cm Silica gel 60 F ₂₅₄ precortado de 10 x 10 cm	
100 Cromatoplas HPTLC 5 x 5 cm Silicagel 60 F ₂₅₄ picotado de 10 x 10 cm	
040427935	

25 Plaques CCM 20 x 20 cm Gel de silice 60 F ₂₅₄	1.05715. 840277097 25 DC-Platten 20 x 20 cm Kieselgel 60 F₂₅₄ 25 TLC plates 20 x 20 cm Silica gel 60 F₂₅₄ MERCK
25 Lastre TLC 20 x 20 cm Gel di silice 60 F ₂₅₄	
25 Cromatoplas TLC 20 x 20 cm Silica gel 60 F ₂₅₄	
25 Cromatoplas TLC 20 x 20 cm Silicagel 60 F ₂₅₄	
<small>7.91057.1591/06-61005851</small>	

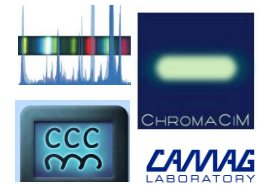
- CCM, HPTLC
- Silice 60
- support
- F254, S
- Lux
- Purity
- WR

25 Plaques HPTLC 20 x 10 cm LiChrospher® Si 60 F _{254s}	1.15445. 25 HPTLC-Platten 20 x 10 cm LiChrospher® Si 60 F_{254s} 25 HPTLC plates 20 x 10 cm LiChrospher® Si 60 F_{254s} MERCK	Vor Feuchtigkeit und Labordämpfen schützen.
25 Lastre HPTLC 20 x 10 cm LiChrospher® Si 60 F _{254s}		Protect from moisture and laboratory vapours.
25 Cromatoplas HPTLC 20 x 10 cm LiChrospher® Si 60 F _{254s}		Protegere de l'humidità et des vapeurs chimiques.
25 Cromatoplas HPTLC 20 x 10 cm LiChrospher® Si 60 F _{254s}		Proteggere dall'umidità e dai vapori chimici.
940338384		Proteger de la humedad y de los vapores químicos.
<small>7.91154.4591/01-6.1482324</small>		Proteger da humidade e dos vapores químicos.
		
		Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany Tel. (061 51) 7 20
		<small>(11-962860-1)</small>

et, au besoin, le greffage (que nous allons voir maintenant)

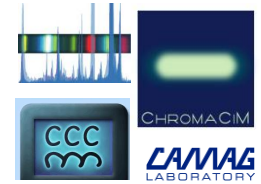


Les plaques de silice greffée



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

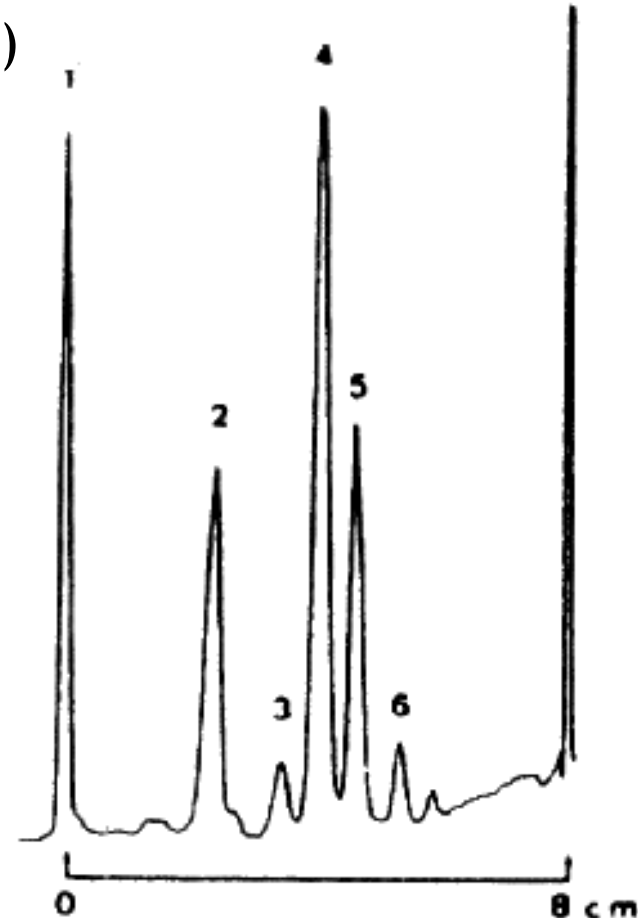
Les plaques de silice greffée



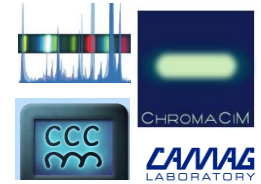
- Diol (silice greffée propyl-diol)

*Ethyl acetate/NH₄OH à 25%
: 100/1*

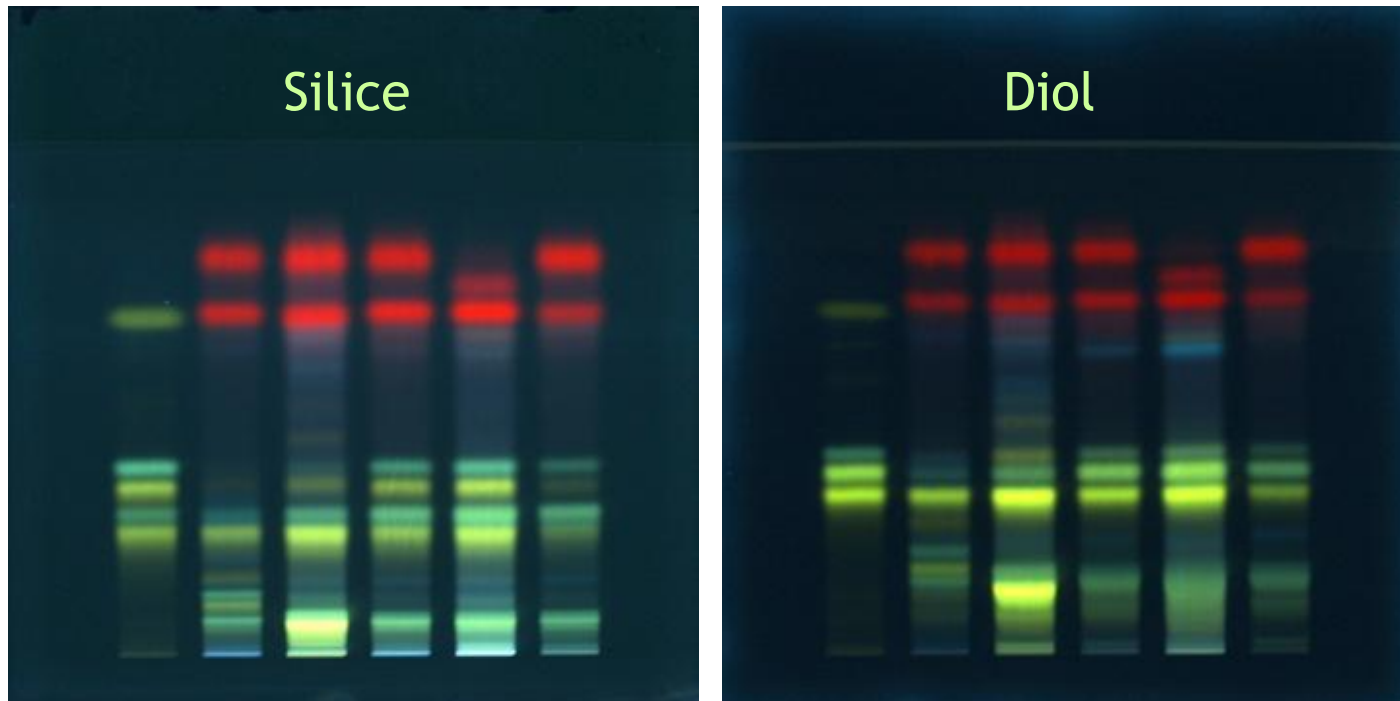
1. Lanatoside C
2. Digoxine
3. Digitoxine
4. Digoxigénine
5. α -Acetyldigoxine
6. Digitoxigénine



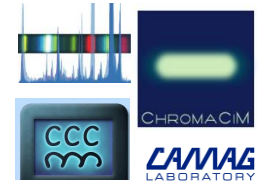
Les plaques de silice greffée



- Diol (silice greffée propyl-diol)



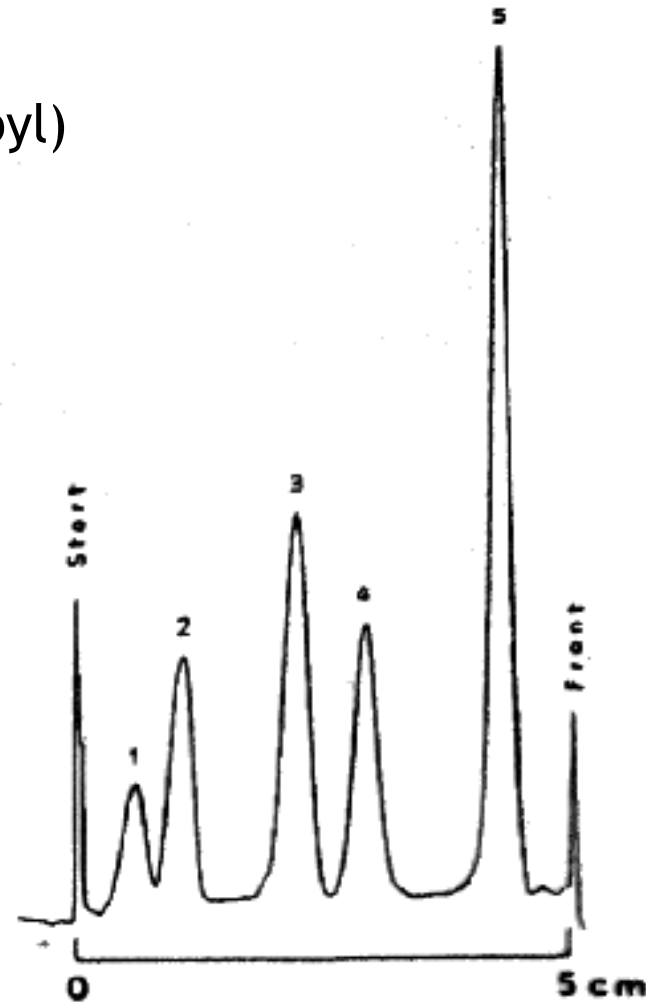
Les plaques de silice greffée



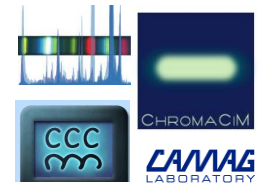
- NH2 (silice greffée amino-propyl)

ACN/H₂O:30/70
UV254nm

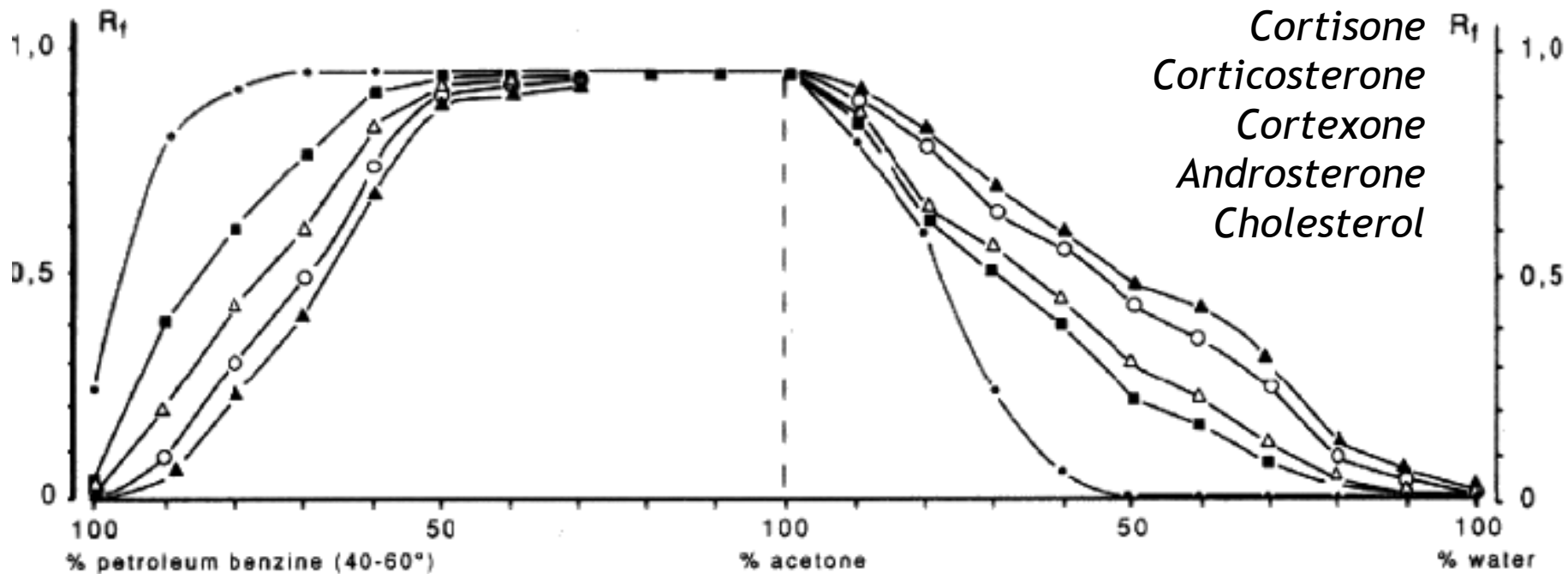
1. UTP
2. UDP
3. UMP
4. UDP-Glucose
5. Uridine



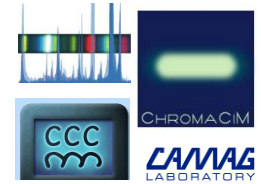
Les plaques de silice greffée



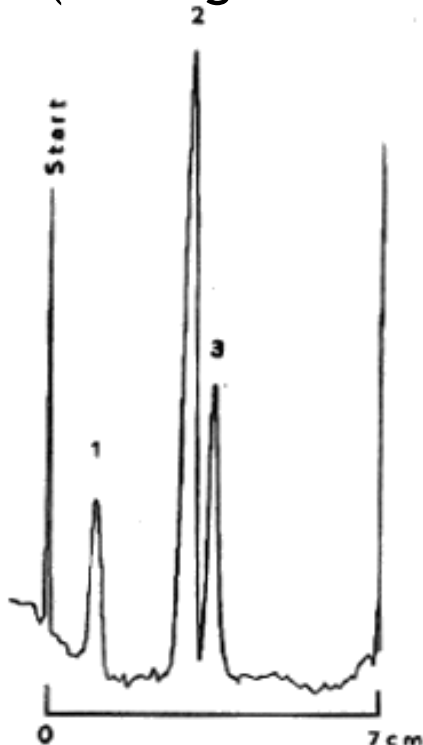
- CN (silice greffée cyano-propyl)



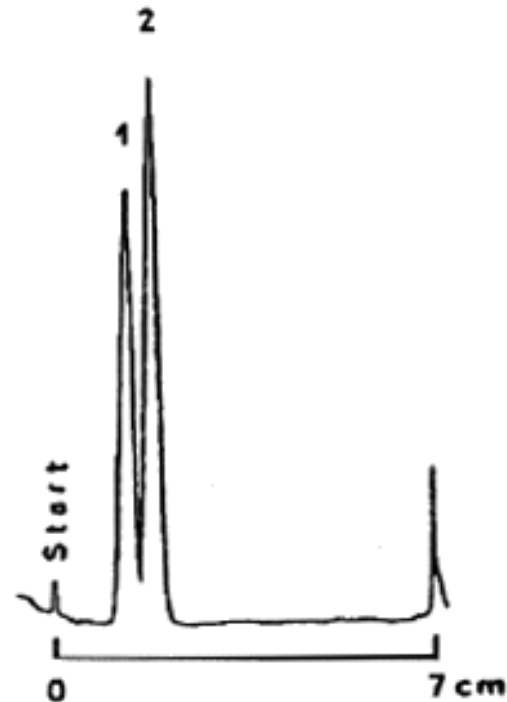
Les plaques de silice greffée



- CN (silice greffée cyano-propyl)

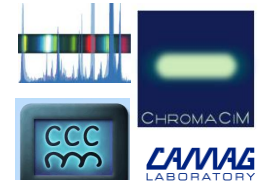


Petrol ether / Aceton:80/20
1.Estriol,2.Estradiol,3.Estrone

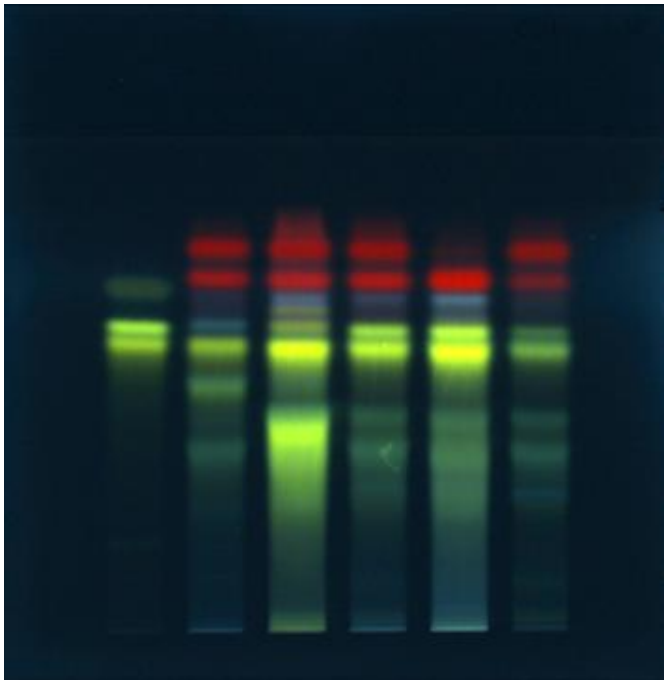


*EtOH/H2O:20/80 + 0,1 mole/L
Tetraethylammonium chloride*
1.Benzoïc ac.,2.Sorbic ac.

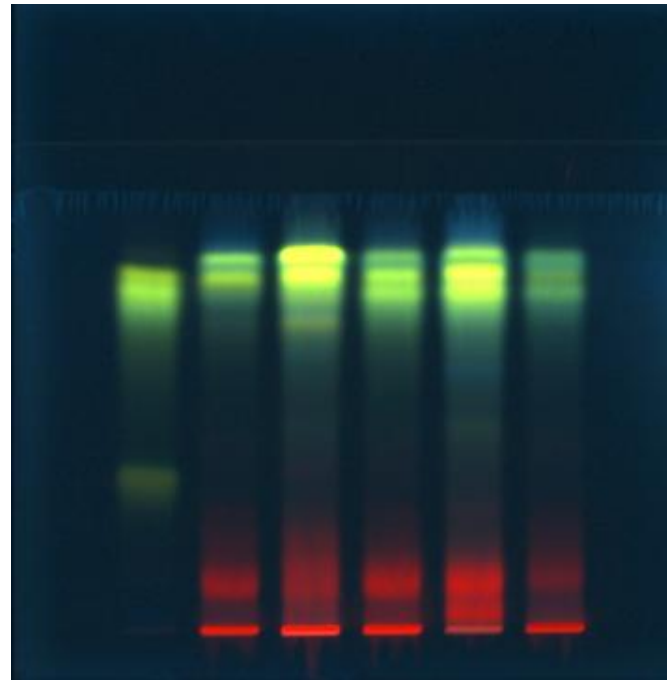
Les plaques de silice greffée



- CN (silice greffée cyano-propyl)

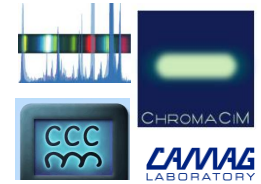


Phase directe

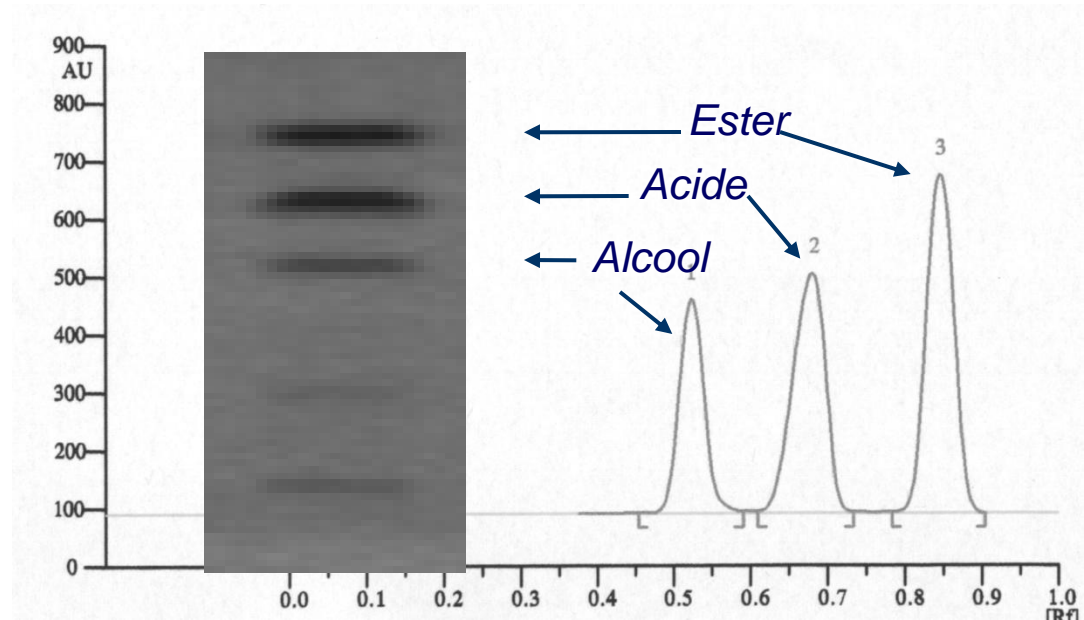


Phase inverse

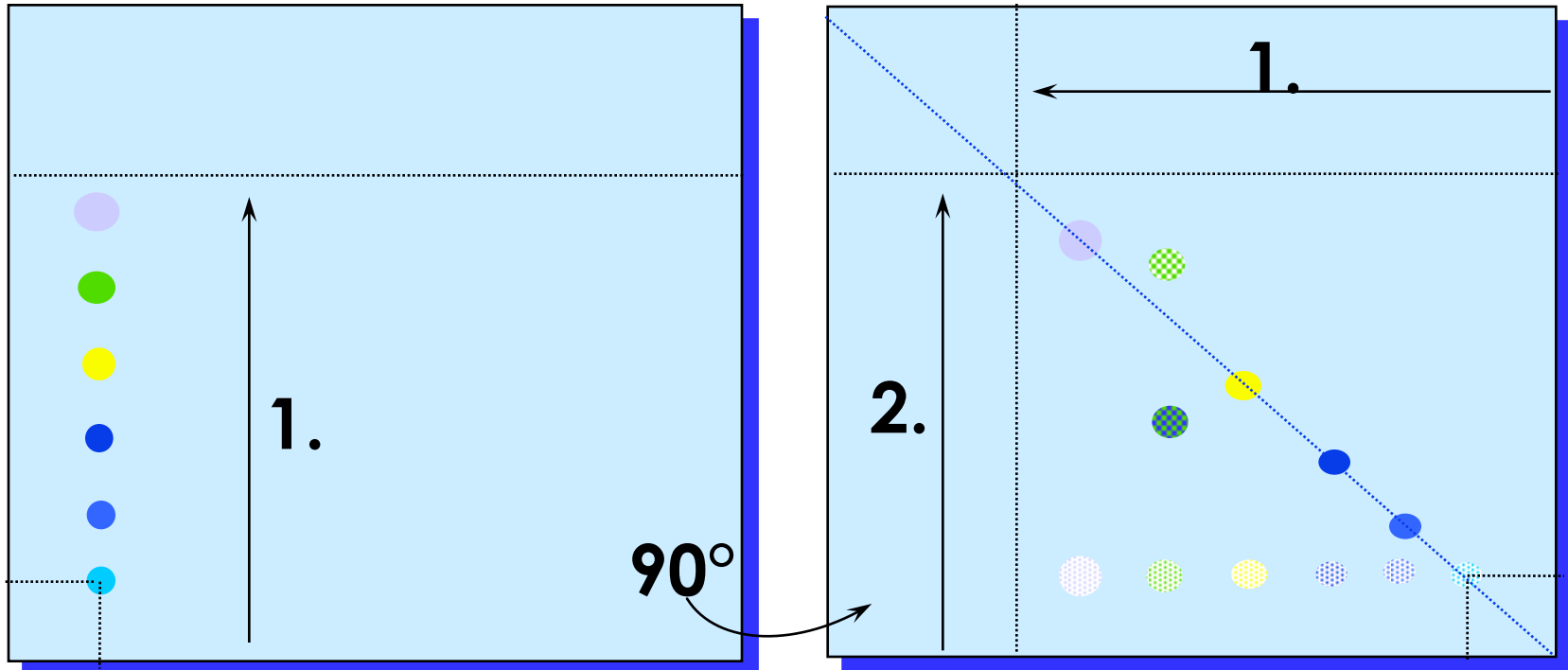
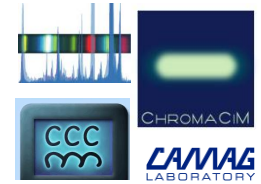
Les plaques de silice greffée



- Exemple d'un bilan d'esterification sur plaque CN (silice greffée cyano-propyl)



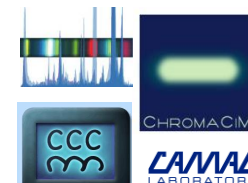
... car on peut vérifier la stabilité sur la plaque



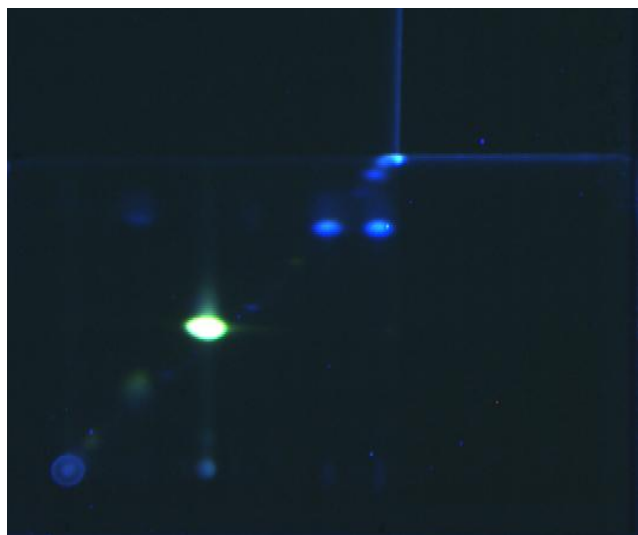
Technique SRS : Séparation-Réaction-Séparation

... Avec le même solvant, mais en tournant la plaque de 90°

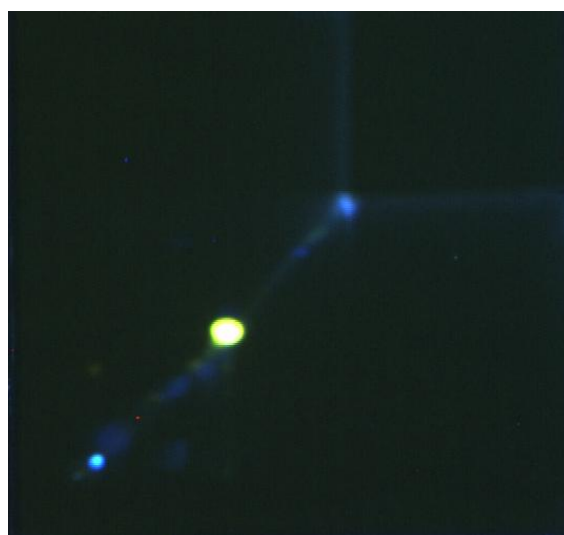
Exemple d'instabilité pris dans les pharmacopées



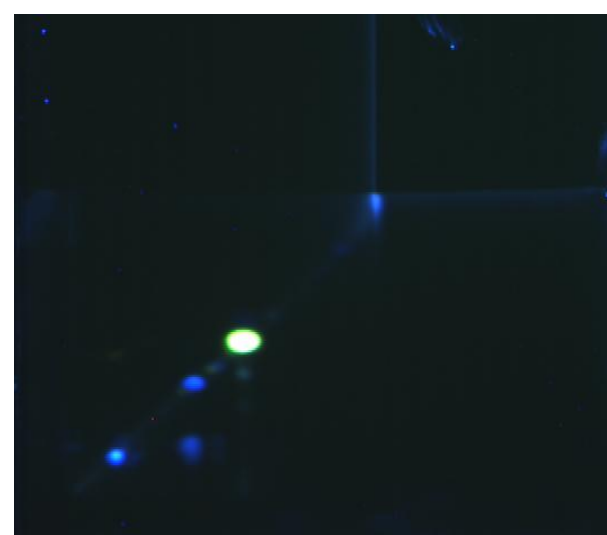
- Comparaison de 3 méthodes pour l'Hydrastis, dont deux monographies de Pharmacopées



Pharmacopée Chinoise

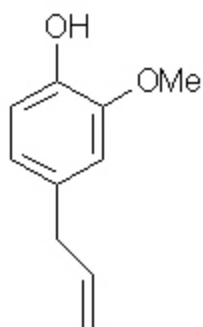
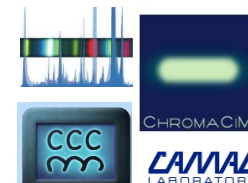


Méthode CAMAG

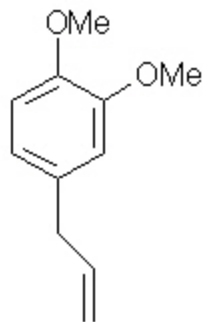


Pharmacopée US

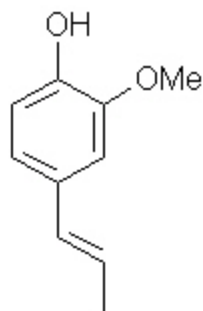
Les plaques de silice greffée



eugénol

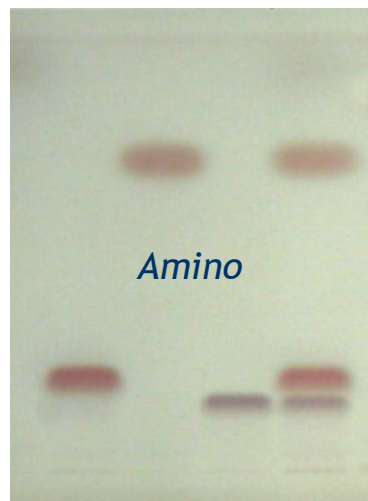
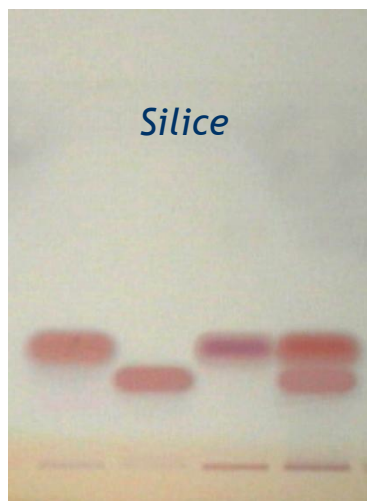


methyleugénol

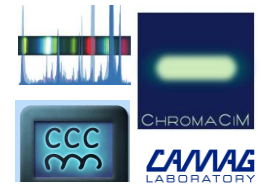


isoeugénol

- Phase mobile: toluène
- Visualisation: acide sulfurique



Les plaques de silice greffée

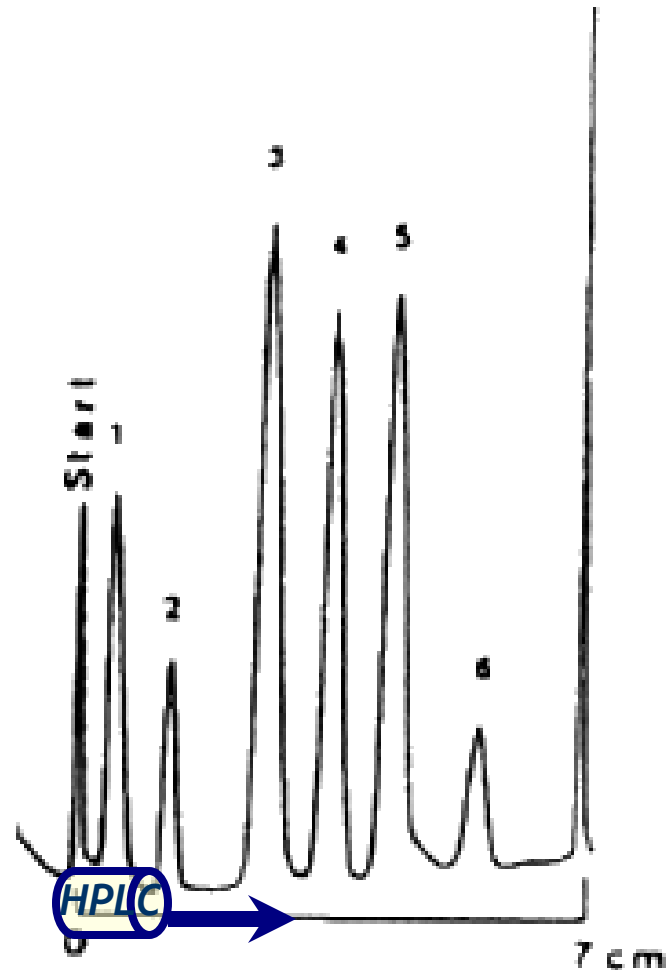


- RP2 (silice silanisée)

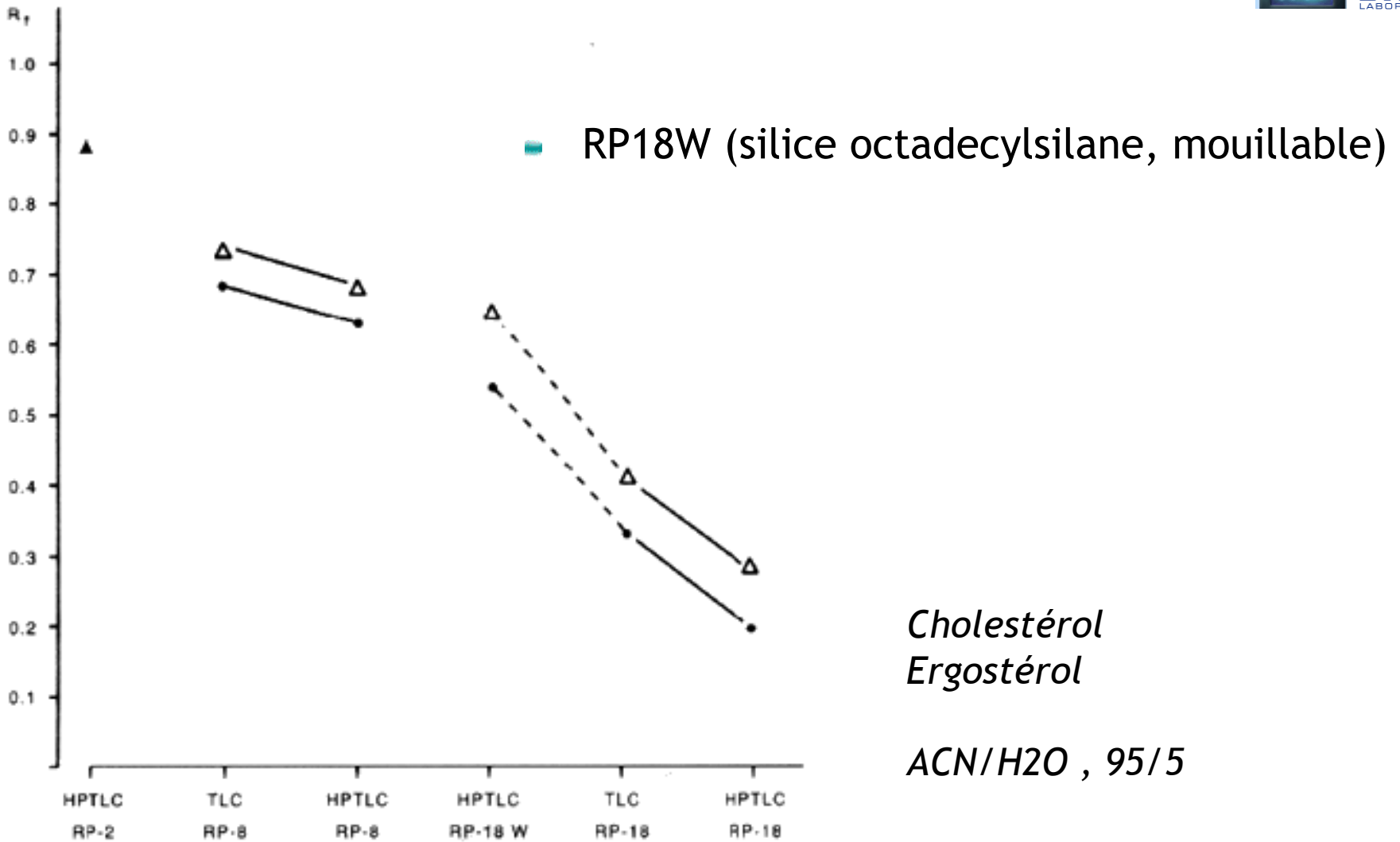
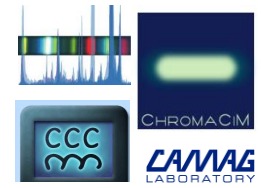
Migration : MeOH/ 1N acetic ac. : 80/20

RMnCl₂-ac.Sulf.; 5 mn à 120°C/ 366nm

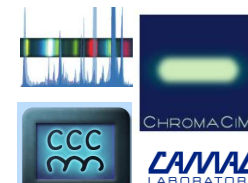
1. *Cholésterol*
2. *7-Hydroxycholésterol*
3. *Ac. Lithocholique*
4. *Ac. Me.Ester Cholique*
5. *Ac. Cholique*
6. *Ac. Déhydrocholique*



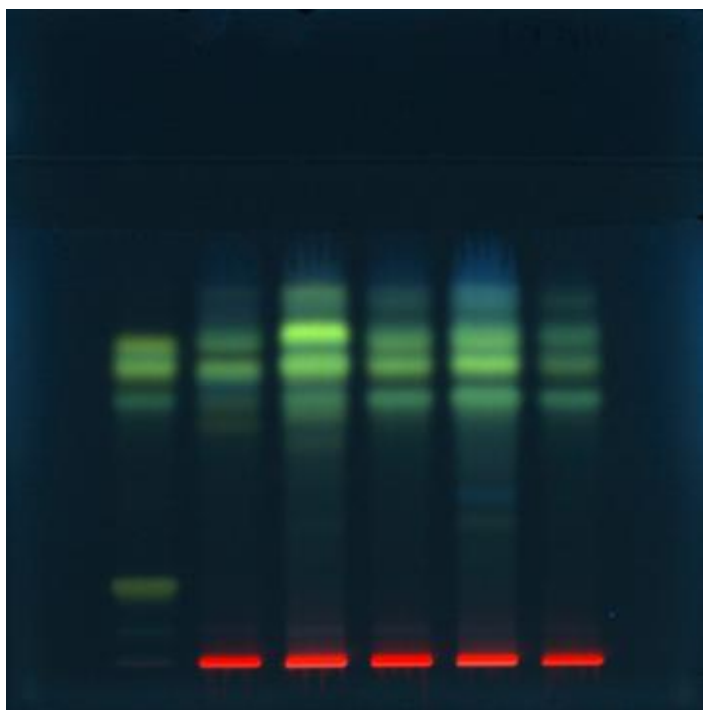
Les plaques de silice greffée



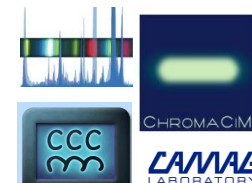
Les plaques de silice greffée



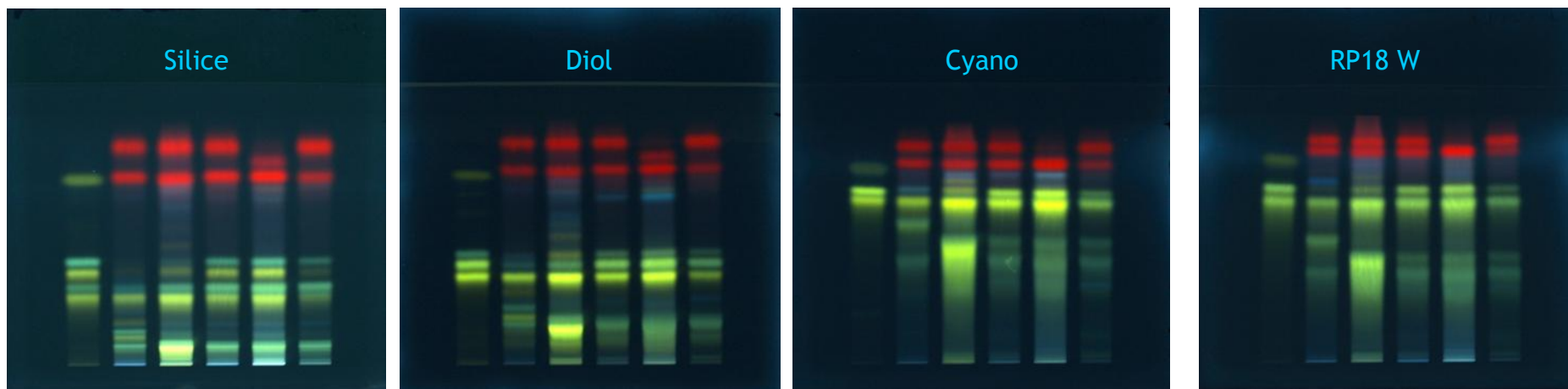
- RP18W (silice octadecylsilane, mouillable)



Les plaques de silice greffée



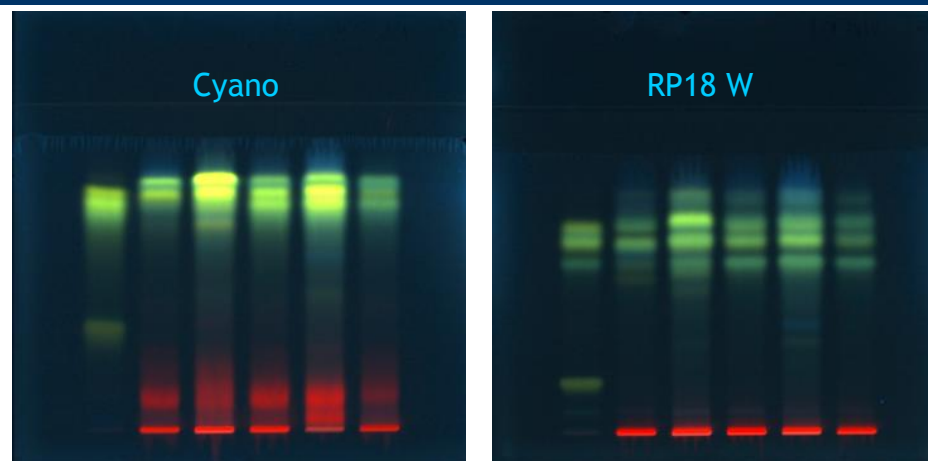
Phase normale



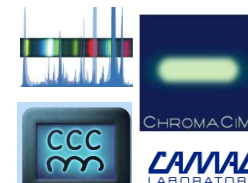
Solvants de migration : Normal = THF, toluène, acide formique, eau (24:12:3:1.5) Inverse = méthanol, acide formique, eau (5.5:1:4.5).

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

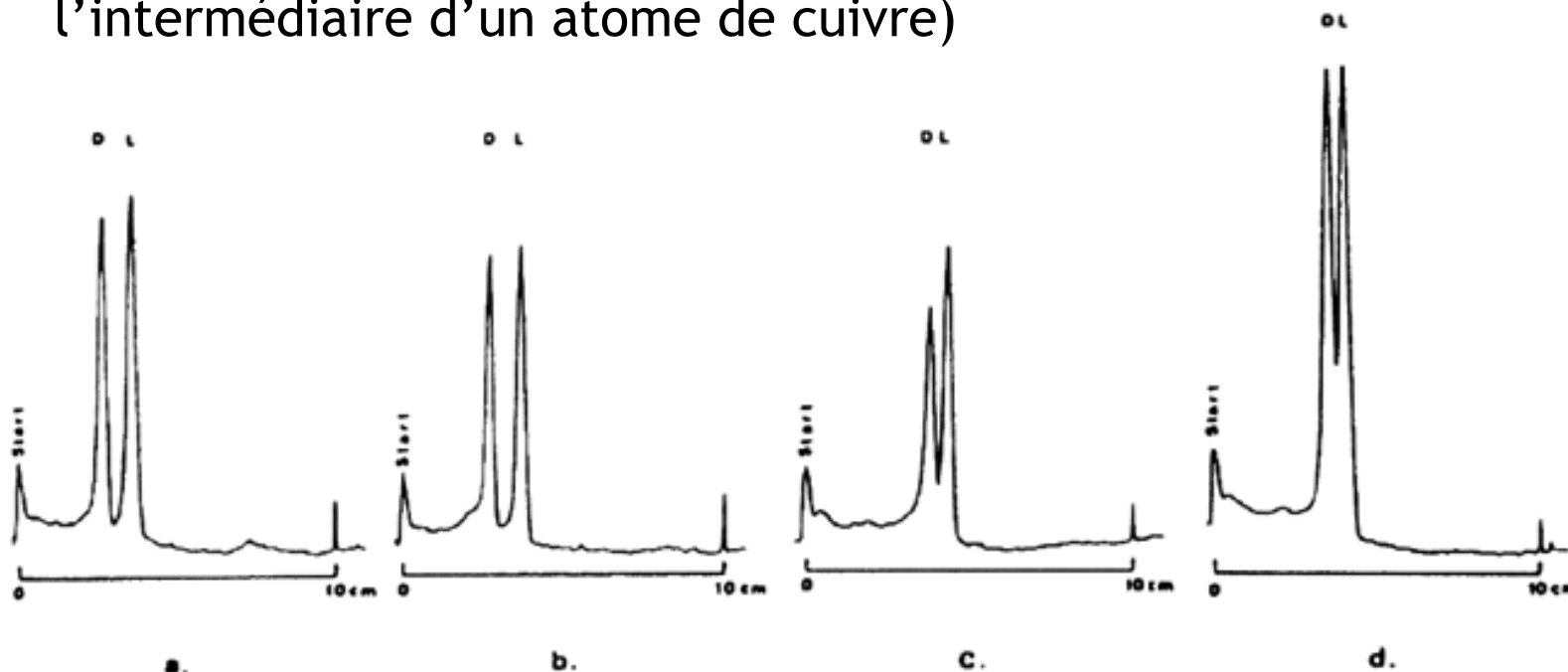
Phase inverse



Les plaques de silice greffée



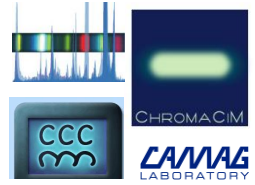
- Chir (silice RP18 imprégnée d'une hydroxyproline par l'intermédiaire d'un atome de cuivre)



Alpha-aminoacides : a Phe ; b Trp ; c Tyr ; d Val.

Solvent : MeOH/H₂O/ACN : 50/50/30; revelation : Ninhydrin

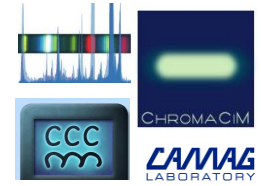
Choix des plaques et chromatographie



■ Modes de chromatographie

- *Adsorption (Si) : différence de rétention des fonctions chimiques.*
- *Partage (RP): élution des séries d'isomères en fonction de leur polarité.*
- *Ionique : interactions ioniques entre la phase et les molécules plus ou moins retenues.*
- *Complexe (chir, caffeine) : formation de complexes de stabilité différente entraînés plus ou moins loin sur la plaque.*

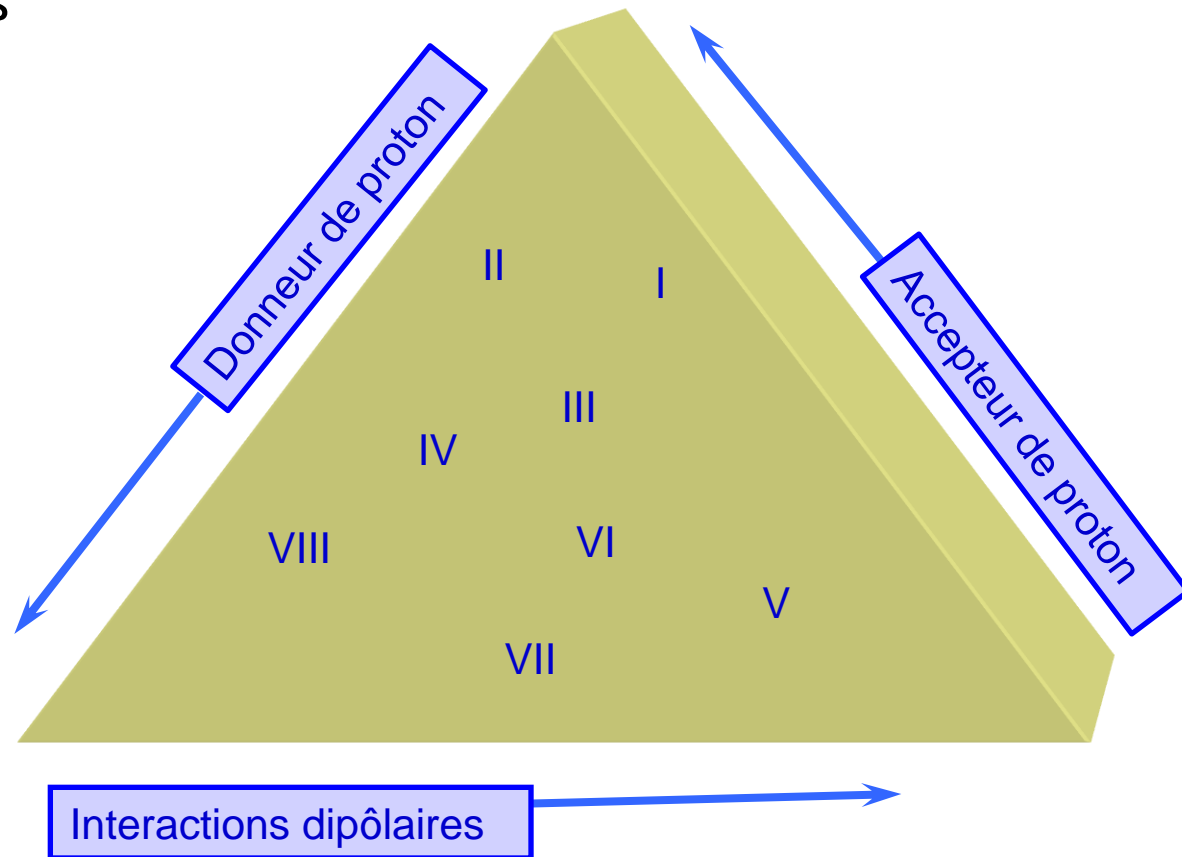
Ce qui retient les molécules...



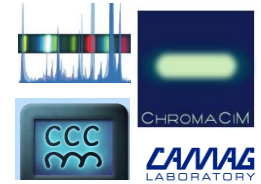
■ Energies d'interaction
(rétention des molécules
en KJ/mole) :

- *van der Waals* 5-20
- *dipôle* 8-25/25-40
- *liaison Hydrogène* 25-40
- *liaison ionique* 250-1050
- (*covalente* 670-3360)

■ Interactions avec les solvants:
Triangle de Snyder (1978)

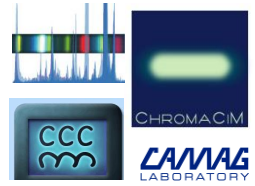


Choix des plaques, concrètement



- *Silice = 80%, mais attention à l'humidité (les autres phases sont insensibles 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*

Merci de votre attention...



- Comme j'ai sûrement oublié de parler de choses qui vous intéressent, n'hésitez pas à poser vos questions...