

# Fluorescence Detection by Intensity Changes (FDIC): théorie et applications pour l'analyse de molécules sans chromophores

**Vicente L. Cebolla**  
**CSIC**

**Instituto de Carboquímica**  
**(Zaragoza, Spain)**



*LVMH-Dior, Saint Jean de Braye, 14/10/2010*

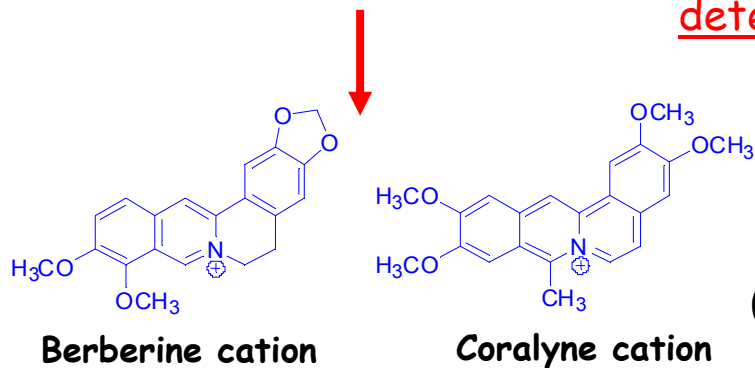




# Introduction *L'effect du milieu sur l'émission fluorescente*

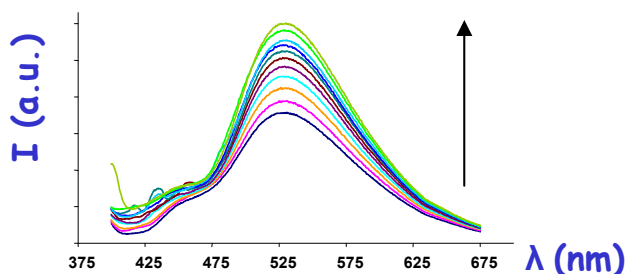
Des changements dans l'émission, induits par des interactions non-covalents, entre un fluorophore et des molécules sans groupes chromophores ont permis

detecter and quantifier



(in LIQUIDS or SOLIDS)

*Hydrocarbures saturés  
Lipides  
Polymères  
Protéines*



*Additions de n-dodecanol non-fluorescent à une solution de berberine dans methanol*

## TECHNOLOGIES

*HPTLC  
GPC  
HPLC  
SSS  
Film senseurs*

## PROBLEMS

*Environnement  
Petrochimie  
Chimie polymères  
Biomolécules*

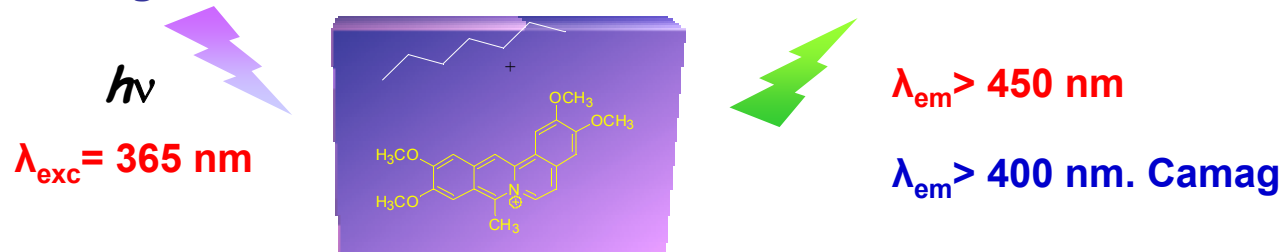
*THEORY*

*Analyst 2009, 134, 2286*

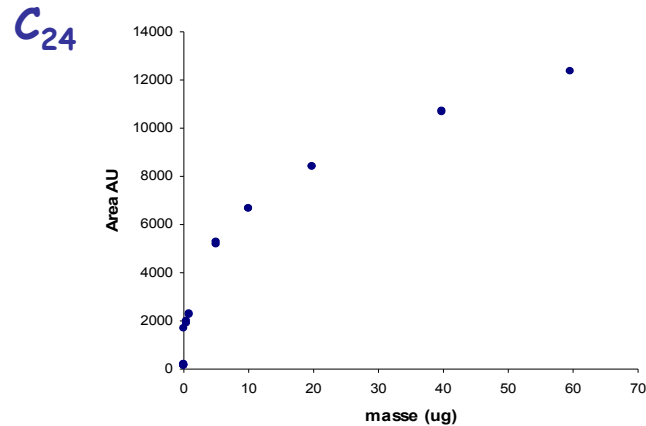
# Hydrocarbures saturés (alcanes) par HPTLC

(Anal.Chem. 2000, 72, 1759)

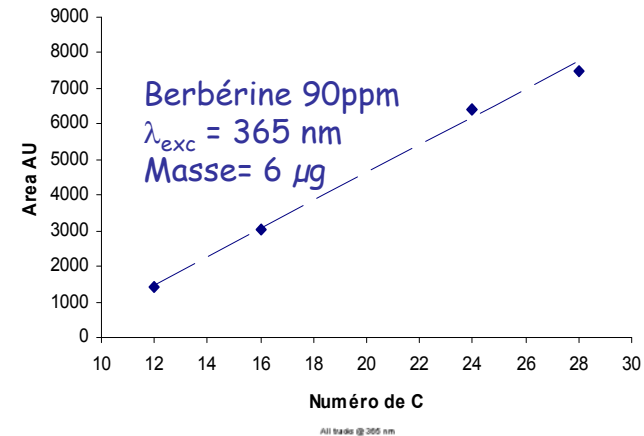
Augmentation de l'émission fluorescente



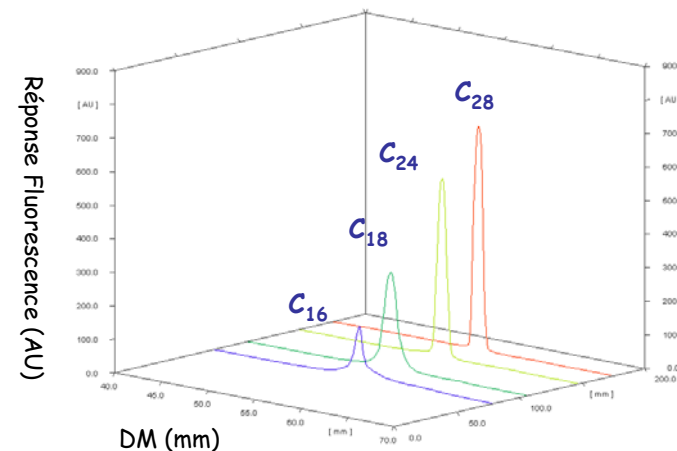
Effet de la masse appliquée  
LOD < 8ng



Effet de la longueur de chaîne



La réponse fluorescente depend de la masse et longueur de chaîne, et de la concentration de sonde



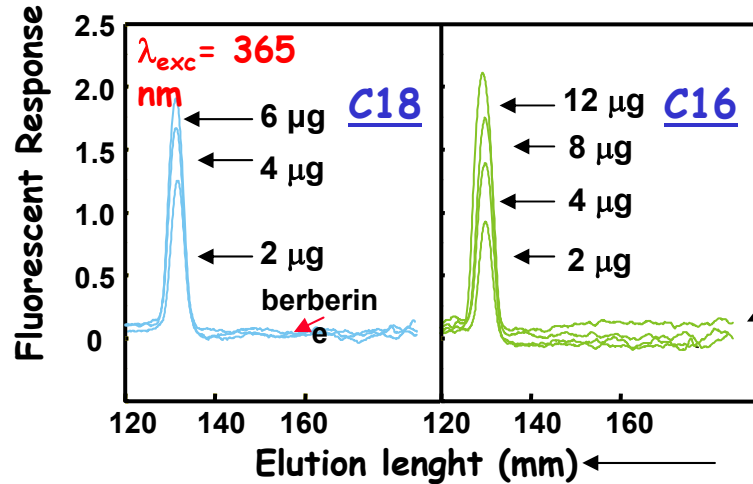
# Applications FDIC

# Exemples de HPTLC-FDIC (berberine cation, 60 ppm)

Cation berberine



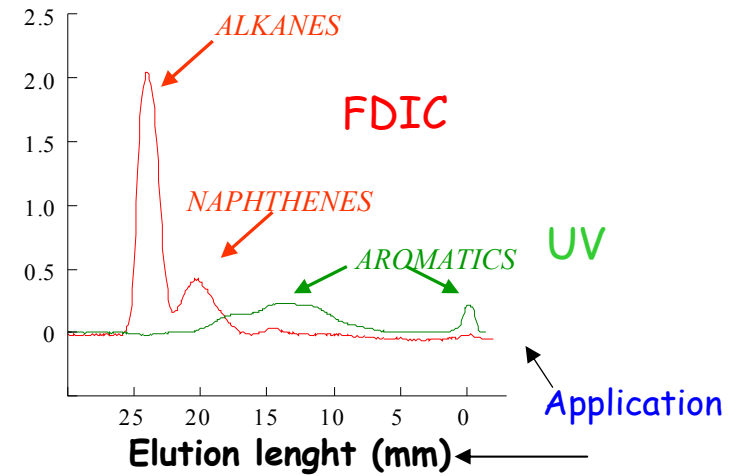
Augmentation de l'émission: ALCANES  
(Org.Lett. 2000, 2, 2311)



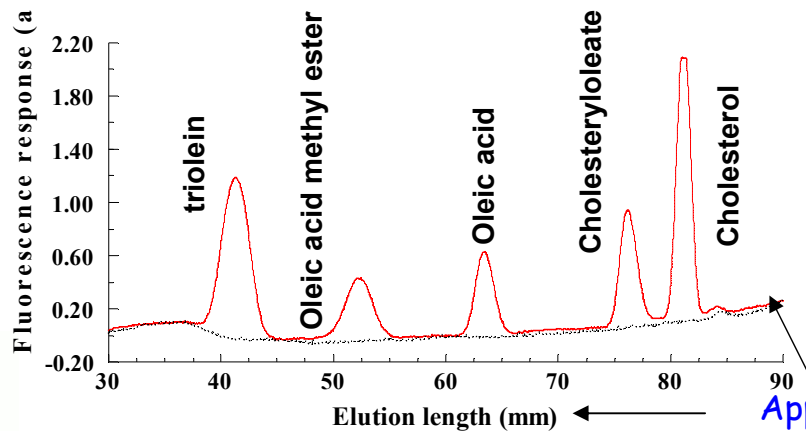
Application



TYPES D'HYDROCARBURES EN DIESEL  
(J.Sep. Sci. 2003, 26, 1665)



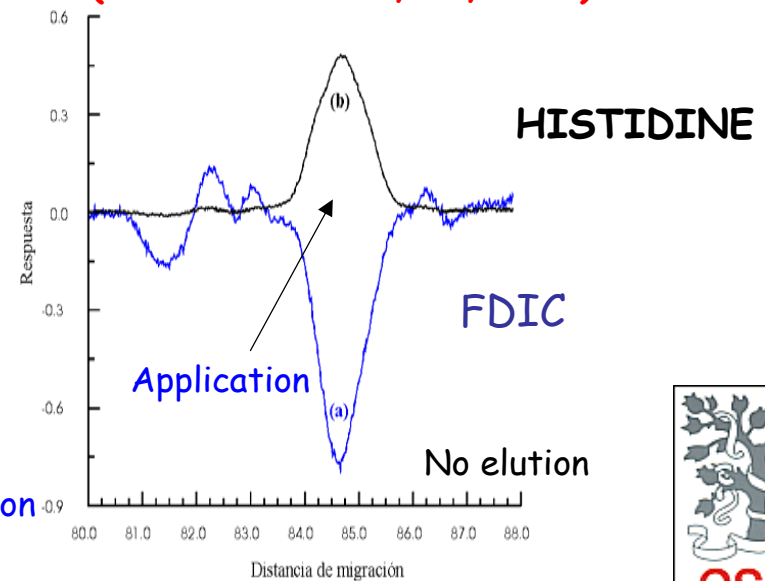
Augmentation de l'émission: les LIPIDES  
(J.Chromatogr. A 2007, 1146, 251)



Application



Quenching: molécules polaires  
(Anal.Chem. 2006, 78, 3699)



# Réponse des lipides en FDIC

Cation berberine

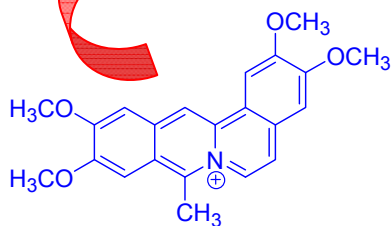
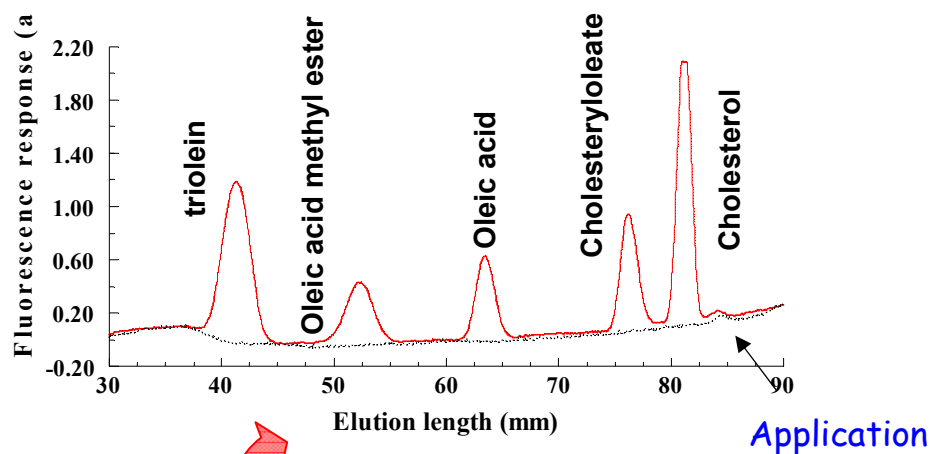
## FAMILLES DE LIPIDES NEUTRES

Coralyne (6 ppm). Preimpregnation

Petroleum ether (80)-diethylether

(20)-acetic acid (1), 20 min

$\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} > 450 \text{ nm}$



Coralyne  
cation

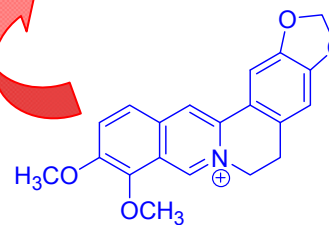
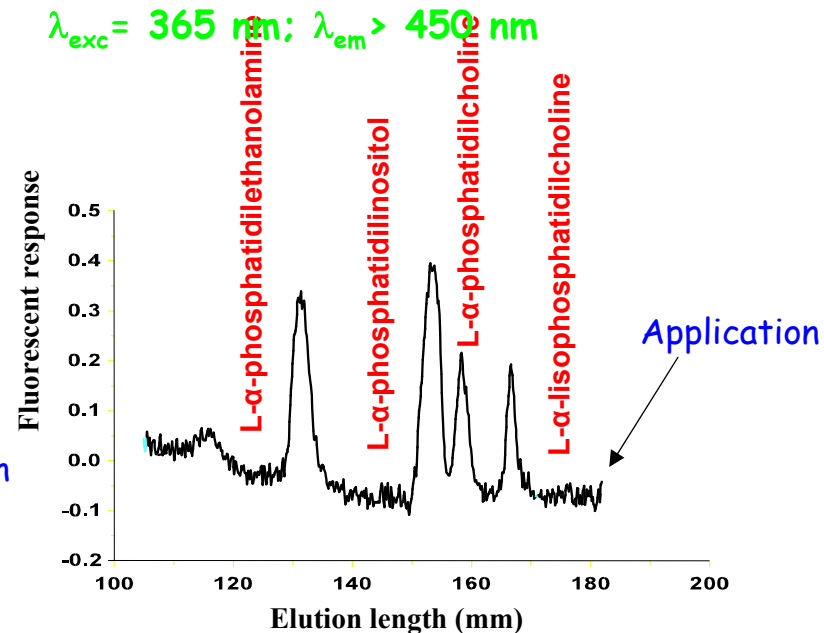
## FAMILLES DE PHOSPHOLIPIDES

Berberine (10 ppm). Postimpregnation

Chloroform (65)-methanol (25)-water(4), 15

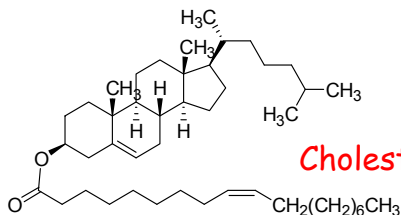
min

$\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} > 450 \text{ nm}$

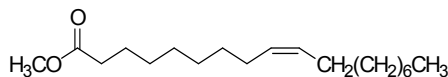


Berberine cation

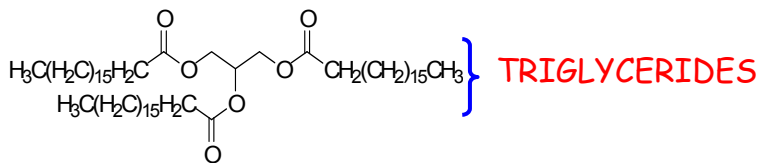
**Lipides neutres et stérols glycosilés**  
**Sphingolipides**  
**Mélanges sphingosine-sphinganine**



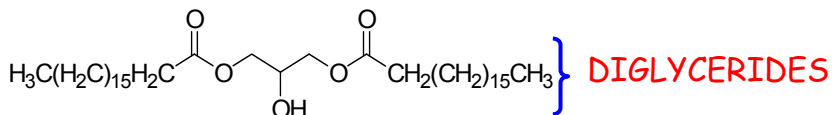
Cholestéryl oleate



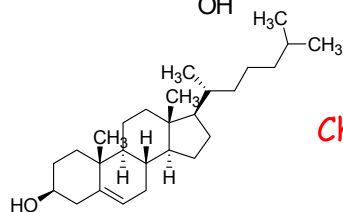
Methyl oleate (FAME)



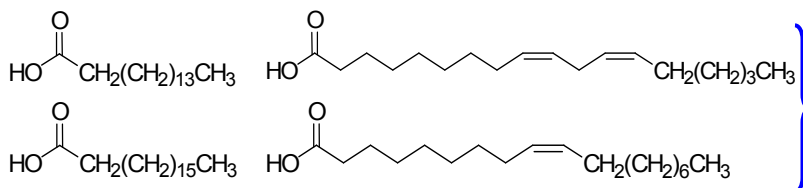
TRIGLYCERIDES



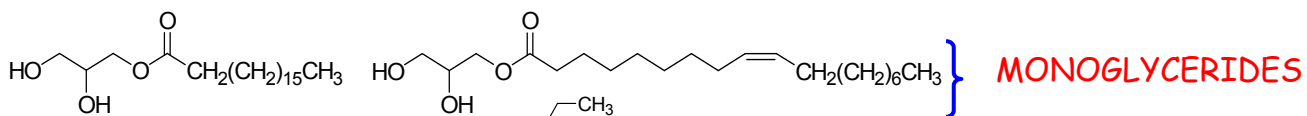
DIGLYCERIDES



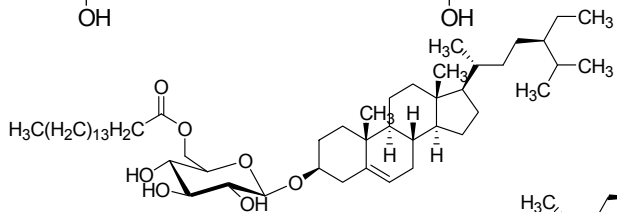
Cholesterol



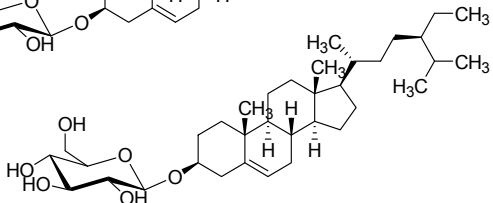
ACIDES GRAS



MONOGLYCERIDES



Acyl-sterol glycosilé (esterifié)



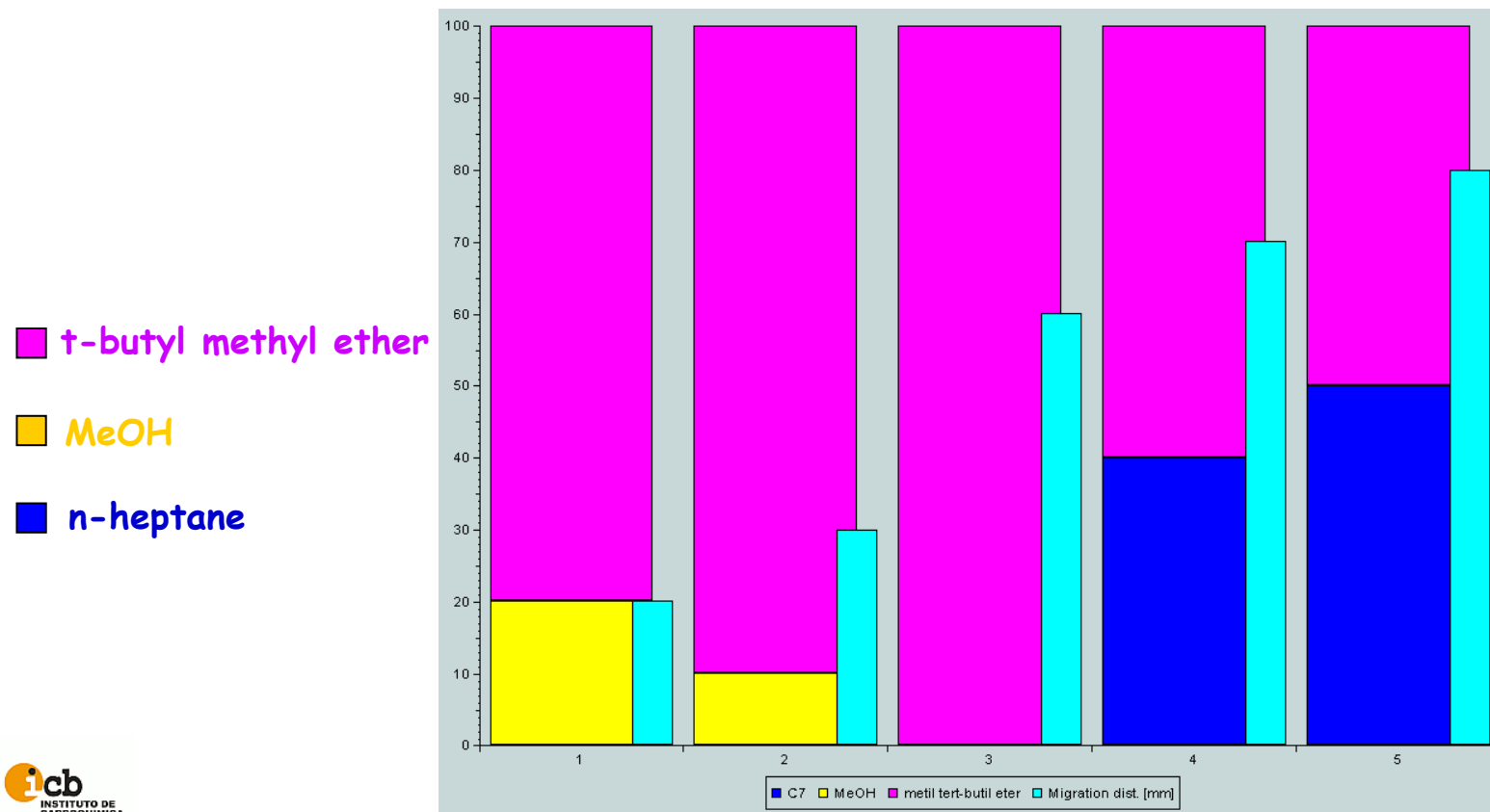
Sterol glycosilé

*Distance de migration*  
(dans les conditions suivantes)



# Conditions AMD (gradient de solvants) pour séparer des lipides neutres et stérols glycosylés

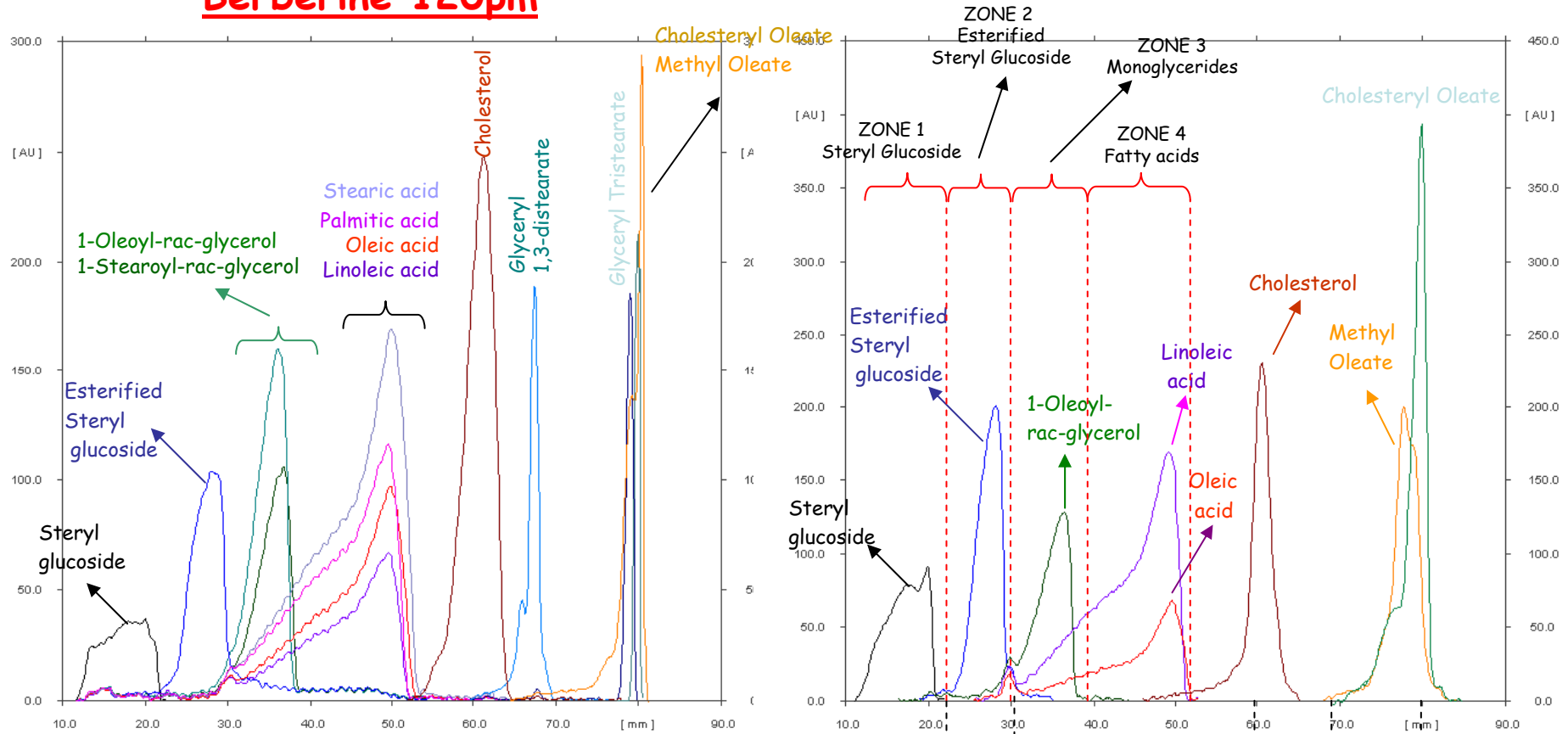
Tert-Butyl Methyl Ether	C7	MeOH	Migration/mm
80.0 Vol %	0.0 Vol %	20.0 Vol %	20.0 mm
90.0 Vol %	0.0 Vol %	10.0 Vol %	30.0 mm
100.0 Vol %	0.0 Vol %	0.0 Vol %	60.0 mm
60.0 Vol %	40.0 Vol %	0.0 Vol %	70.0 mm
50.0 Vol %	50.0 Vol %	0.0 Vol %	80.0 mm



**FLUO-365nm**  
**Berberine 120pm**

(Masse chaque étalon: 1.7 µg)

**UV (190nm)**



80% Tert-Butyl Methyl Ether + 20%MeOH

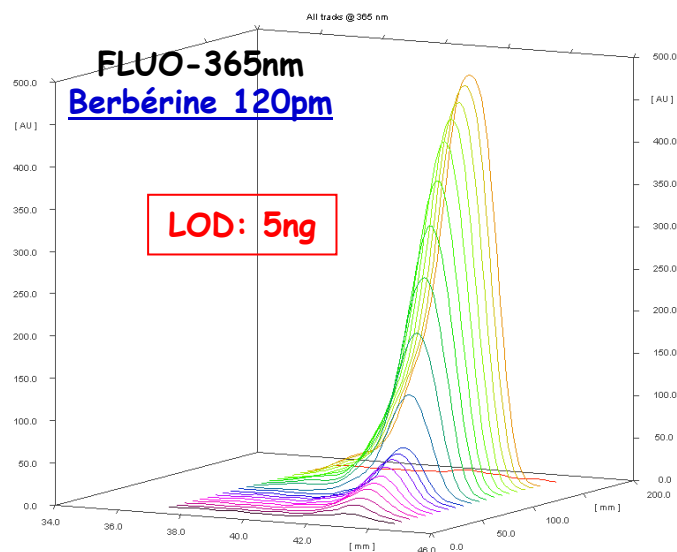
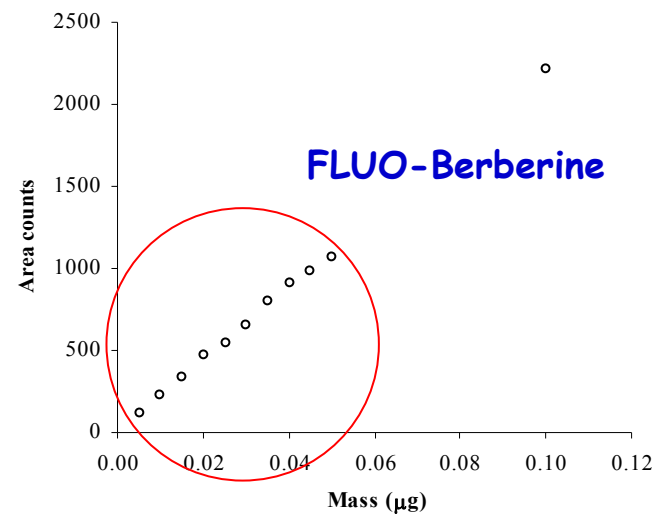
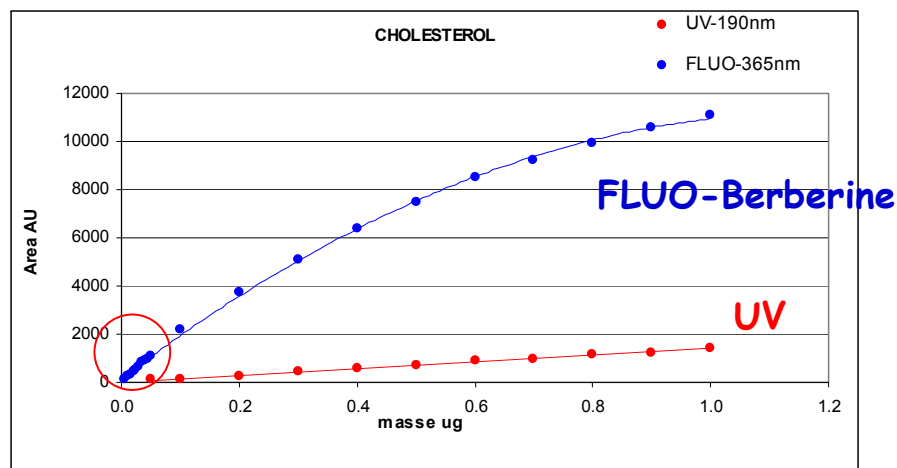
90% Tert-Butyl Methyl Ether + 10%MeOH

100% Tert-Butyl Methyl Ether

60% Tert-Butyl Methyl Ether + 40%C7

50% Tert-Butyl Methyl Ether + 50%C7

# Réponse FDIC et LOD du cholestérol



## -Paramètres d'injection

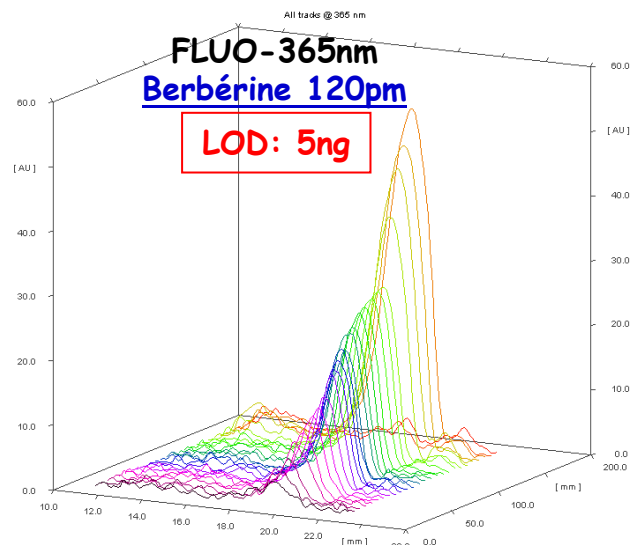
- Solvant d'injection: DCM:MeOH (1:1)
- Longueur de bande: 4mm
- Masse injectée: de 1ng à 100 ng

## -Détection

Post-imprégnation (berberine /MeOH 120ppm)

# LOD de lipides ( $\mu\text{g}$ ) par UV (190 nm) et FDIC-berberine

## Stérol glycosilé

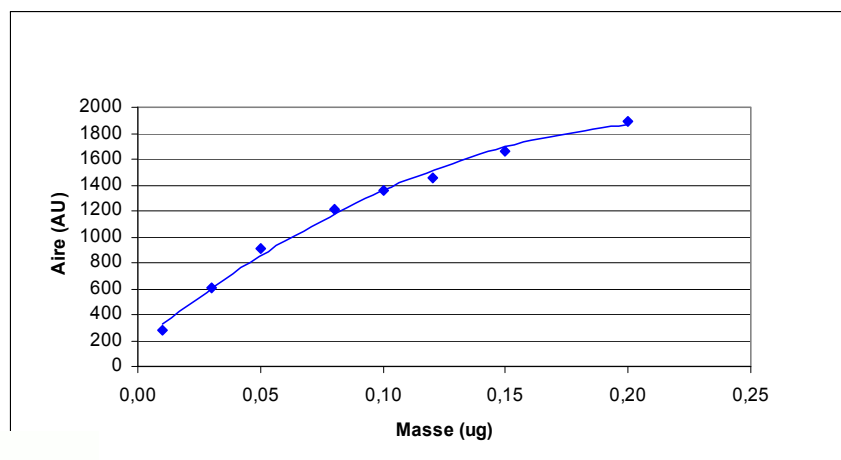


	FDIC-berberine ( $\mu\text{g}$ )	UV (190 nm) ( $\mu\text{g}$ )
1-oleoyl glycerol	0.15	0.15
1-monopalmitoleoyl-glycerol	0.10	0.10
1-stearoyl-glycerol	0.05	Not detected
1-palmitoyl-glycerol	0.05	Not detected
Stérol glycosilé	0.005	0.10
Cholestérol	0.005	0.10

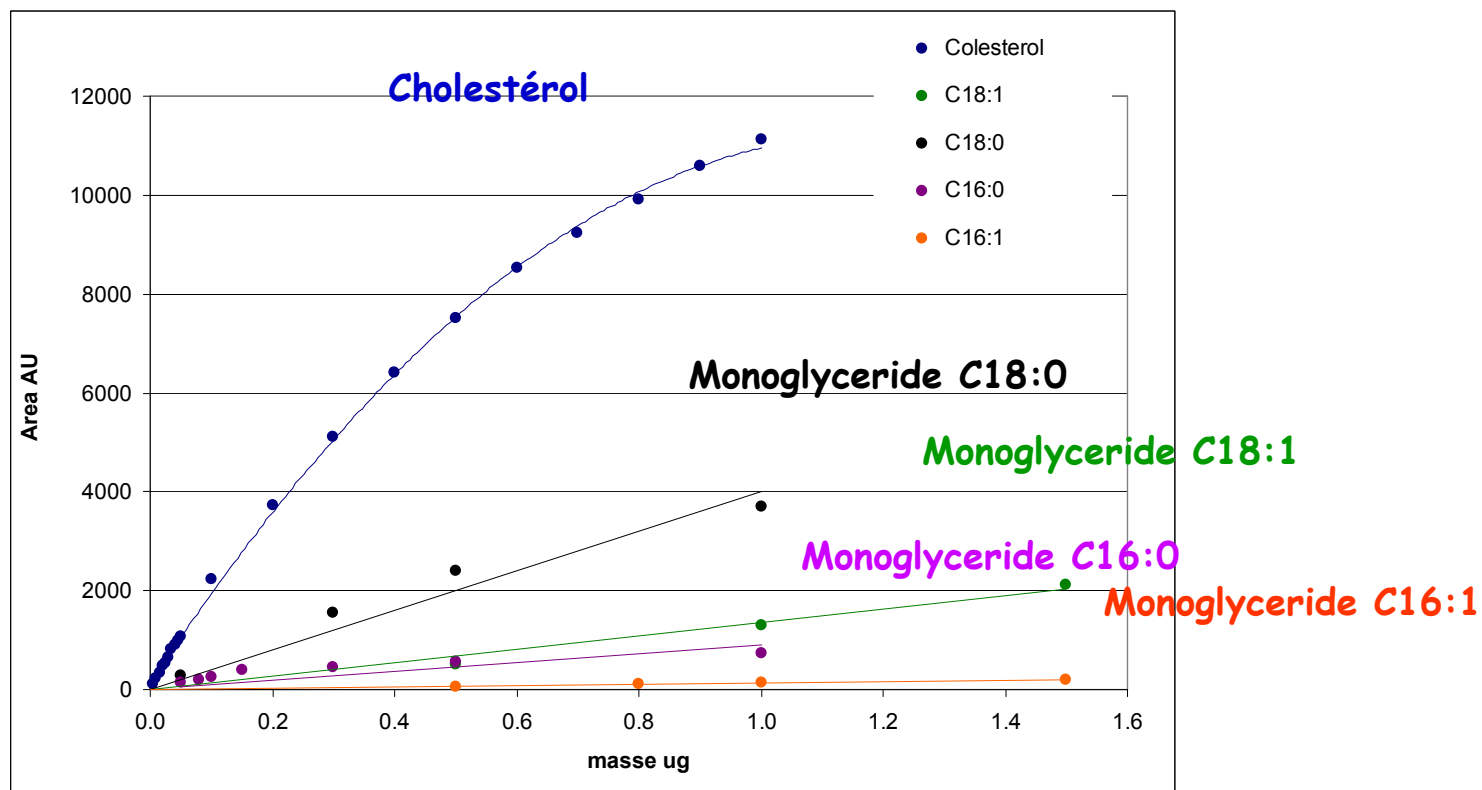


<sup>a</sup>LOD, calculé à partir de  $S/N \geq 3$  ( $S$ , Area A.U.)

<sup>b</sup>AMD conditions de la séparation



# Réponses FDIC des lipides neutres et stérols glycosilés



Monoglycerides: C18:0 > C18:1 ~ C16:0 > C16:1

# Réponses FDIC des lipides neutres et stérols glycosilés

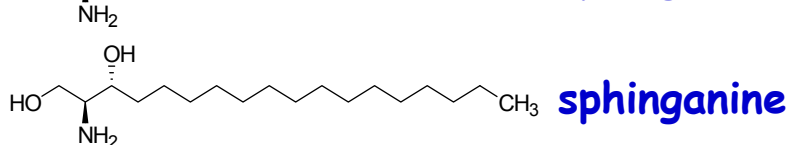
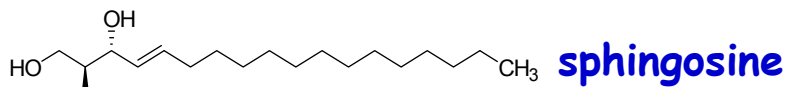
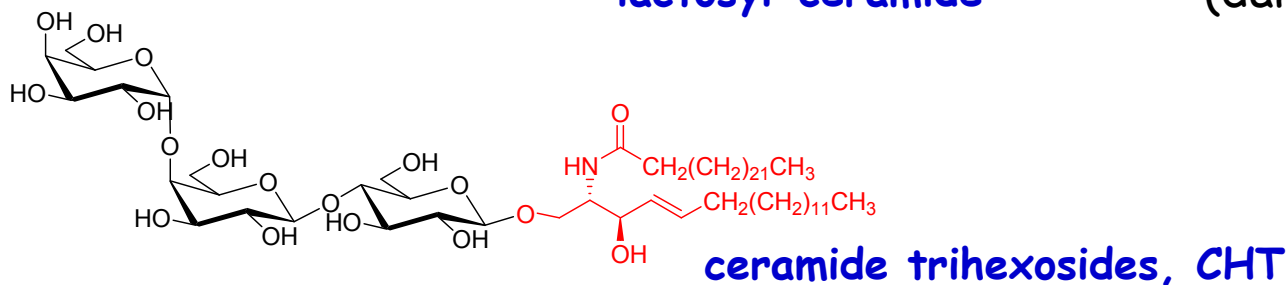
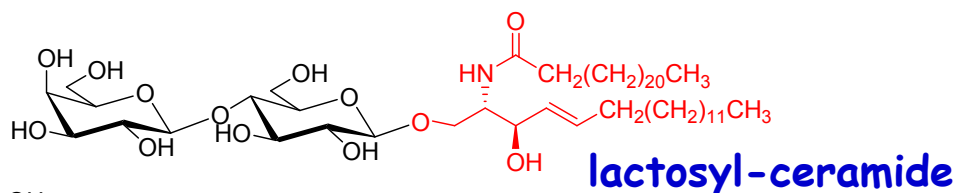
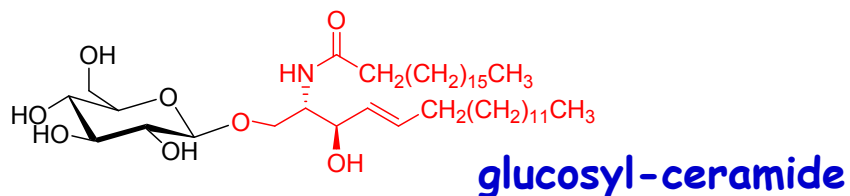
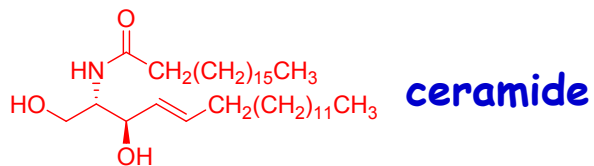
Réponses analytiques (Area masse<sup>-1</sup>), réponses molaires (Area mol<sup>-1</sup>) et polarizabilités ( $\alpha$ , Å<sup>3</sup>) de plusieurs stérols, cholestérols et monoglycerides avec FDIC-berberine

	Area masse <sup>-1</sup> (A.U. µg <sup>-1</sup> )	Area mol <sup>-1</sup>	$\alpha$ (Å <sup>3</sup> )	MW	
Cholesteryl oleate	16074	<b>10.5</b>	80.69	651.10	}
Acyl-stérol glycosilé	8140	<b>6.6</b>	94.09	815.26	
Cholesterol	16500	<b>6.4</b>	47.56	386.65	
Stérol glycosilé	5760	<b>3.3</b>	64.59	576.85	
1-stearoyl- glycerol	6563	2.35	41.28	358.56	}
1-palmitoyl- glycerol	3616	1.19	37.61	330.50	
1-oleoyl-glycerol	3026	1.08	41.30	356.54	
Monopalmitoleoyl- glycerol	1172	0.38	37.64	328.49	

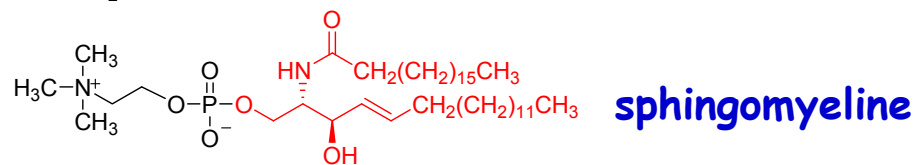
C18:0 > C18:1 ~ C16:0 > C16:1

Lipides neutres et stérols glycosilés  
**Sphingolipides**  
Mélanges sphingosine-sphinganine

Ils sont directement impliqués dans le diagnostic de maladies humaines résultant de l'accumulation anormale de lipides membranaires



Ratio: biomarker d'exposition aux fumonisines



*Distance de migration*  
(dans les conditions suivantes)

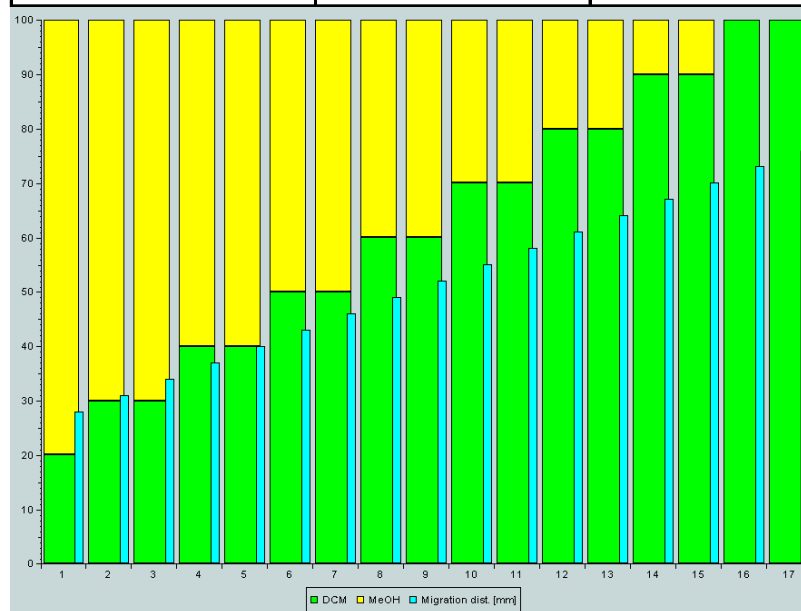


# Conditions AMD (gradient de solvants) pour séparer des sphingolipides

DCM	MeOH	Migration/mm
20.0 Vol %	80.0 Vol %	28.0 mm
30.0 Vol %	70.0 Vol %	31.0 mm
30.0 Vol %	70.0 Vol %	34.0 mm
40.0 Vol %	60.0 Vol %	37.0 mm
40.0 Vol %	60.0 Vol %	40.0 mm
50.0 Vol %	50.0 Vol %	43.0 mm
50.0 Vol %	50.0 Vol %	46.0 mm
60.0 Vol %	40.0 Vol %	49.0 mm
60.0 Vol %	40.0 Vol %	52.0 mm
70.0 Vol %	30.0 Vol %	55.0 mm
70.0 Vol %	30.0 Vol %	58.0 mm
80.0 Vol %	20.0 Vol %	61.0 mm
80.0 Vol %	20.0 Vol %	64.0 mm
90.0 Vol %	10.0 Vol %	67.0 mm
90.0 Vol %	10.0 Vol %	70.0 mm
100.0 Vol %	0.0 Vol %	73.0 mm
100.0 Vol %	0.0 Vol %	76.0 mm

17 étapes

■ MeOH  
■ DCM

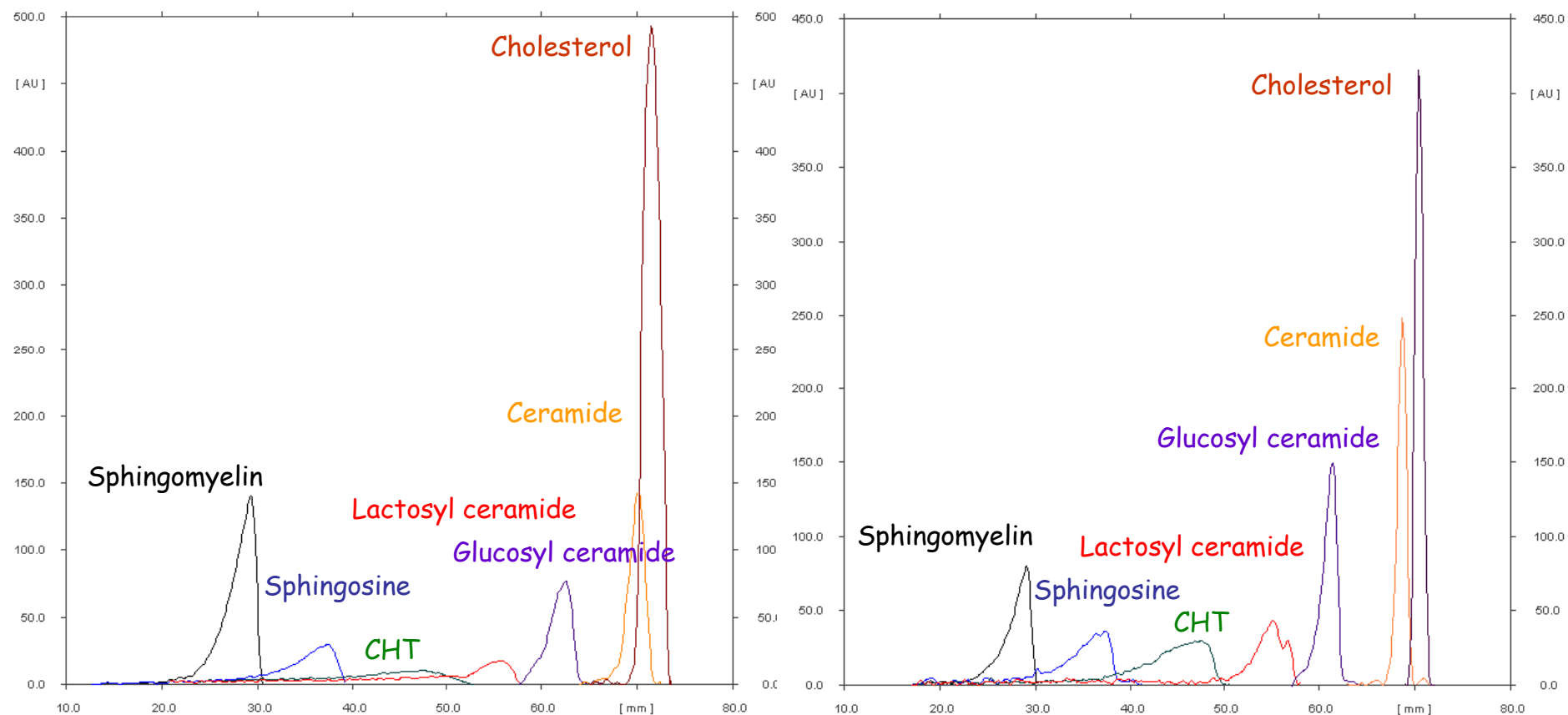


FLUO-365nm

Berberine 200 ppm

(Masse chaque étalon: 3 µg)

UV (190nm)

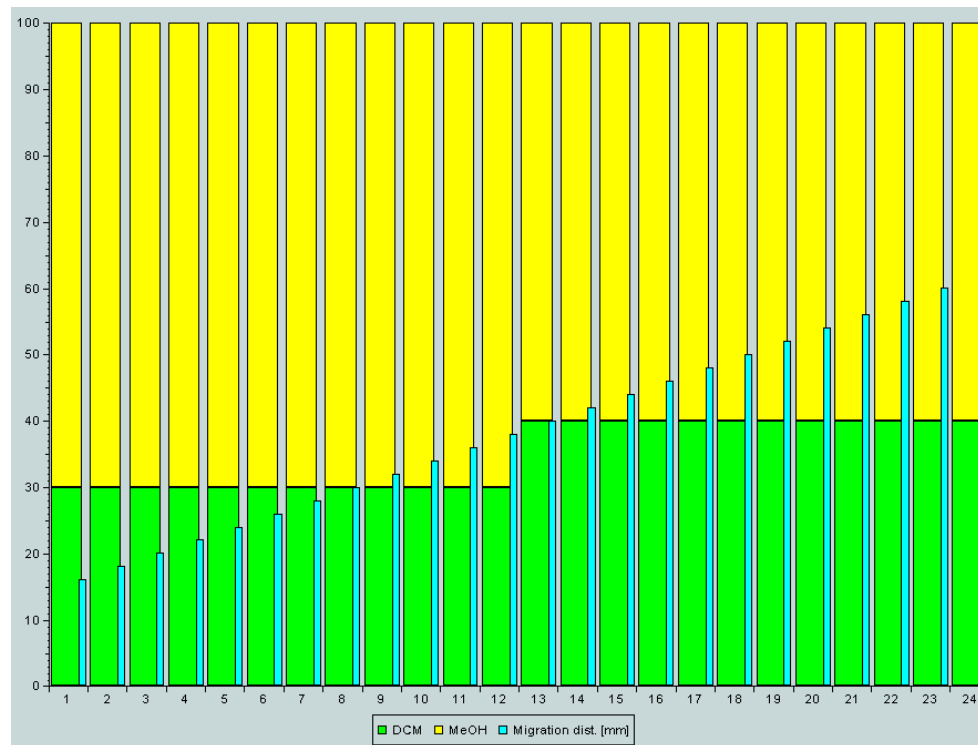


(Plaque lavée au THF et ensuite au MeOH)

**Lipides neutres et stérols glycosilés**  
**Sphingolipides**  
**Mélanges sphingosine-sphinganine**

# Conditions AMD (gradient de solvants) pour séparer sphingosine et sphinganine

DCM	MeOH	Migración
30%	70%	16 mm
30%	70%	18 mm
30%	70%	20 mm
30%	70%	22 mm
30%	70%	24 mm
30%	70%	26 mm
30%	70%	28 mm
30%	70%	30 mm
30%	70%	32 mm
30%	70%	34 mm
30%	70%	36 mm
30%	70%	38 mm
40%	60%	40 mm
40%	60%	42 mm
40%	60%	44 mm
40%	60%	46 mm
40%	60%	48 mm
40%	60%	50 mm
40%	60%	52 mm
40%	60%	54 mm
40%	60%	56 mm
40%	60%	58 mm
40%	60%	60 mm
40%	60%	65 mm

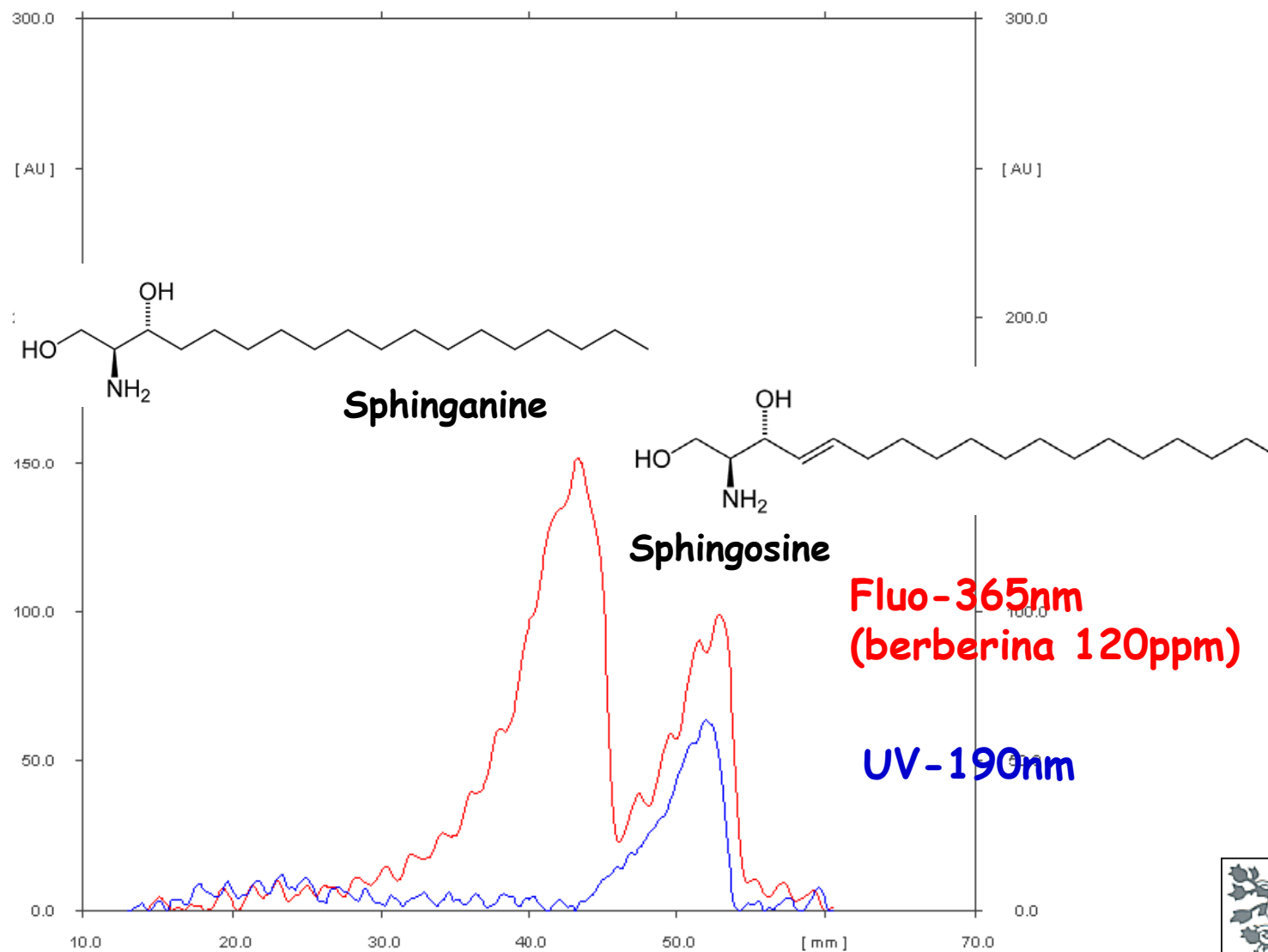


24 étapes

MeOH

DCM

# Mélanges sphinganine / sphingosine (7 / 14 µg)



# Explication des réponses FDIC

 Modèle

 Mécanique Moléculaire

## Nature de l'émission fluorescente

Des interactions électrostatiques nonspécifiques entre les fluorophores ioniques et les chaînes aliphatiques polarisables sont responsables des augmentations de l'émission

### Analyse des orbitaux moléculaires et Mécanique Moléculaire

- ↳ Berberine est un cation plate avec une remarquable rigidité conformationnelle
- ↳ Les orbitaux frontières (HOMO and LUMO) ne sont pas affectés
- ↳ L'émission fluorescente est produite par une interaction nonspécifique entre l'alcane et le système  $\pi$  de la berberine, et il y a des distances intermoléculaires proches aux contacts de Van der Waals

---

Methods: **Ground state:** semiempirical Hamiltonian PM3 at Hartree-Fock (HF) level; **1st excited state:** 3X3CI-HE/PM3 level; **Molecular Mechanics:** AMBER force field, Montecarlo

# un MODELE basé sur l'energy des interactions electrostatiques

## Interaction ion-dipole induite dans les cas des fluorophores cationiques

L'interaction electrostatique entre le cation et la chaîne hydrocarbonée des lipides contribue a l'efficacité de l'émission fluorescente, et crée un microenvironnement qui isole la sonde fluorescente et empêche d'autres mécanismes de désactivation non-fluorescents.

$$\Phi_{i,p} = U_k \frac{e^2 \cdot Z_p^2}{8 \cdot \pi \cdot \epsilon \cdot r^4} \alpha_i \quad \uparrow \phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \downarrow$$

En général, les lipides ont des valeurs élevés de polarizabilité  $\alpha$

Si l'analyte peut établir des interactions spécifiques, donneur-accepteur:

$$\downarrow \phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \uparrow$$



# ▶ un MODELE basé sur l'energy des interactions electrostatiques

AMBER force field,  $\Delta E$  (kcal mol<sup>-1</sup>)

*n*-ALCANES

MacroModel package, Schrödinger

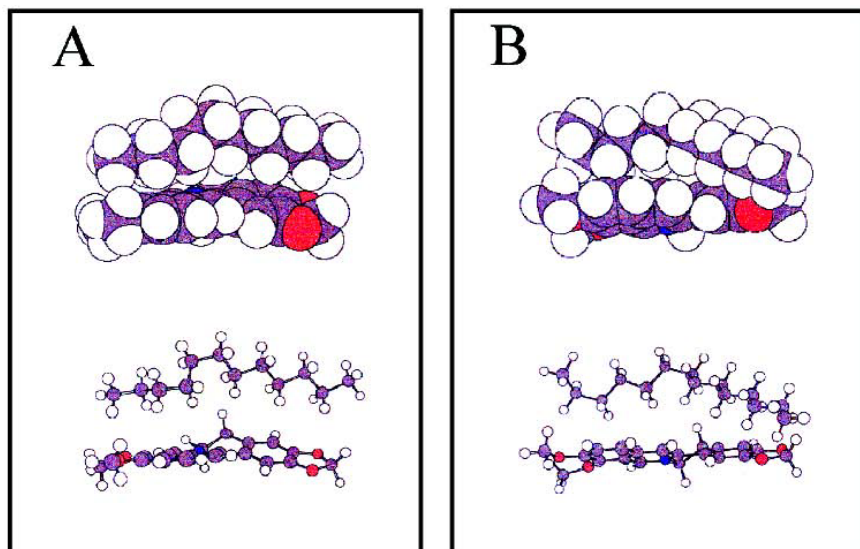
**A** Berberine-C<sub>12</sub>

**B** Berberine-C<sub>14</sub>

$\Delta I$  proportionnelle a l'energy d'interaction

- Berberine-C<sub>12</sub>: -7.04 kcal mol<sup>-1</sup>

- Berberine-C<sub>14</sub>: -7.50 kcal mol<sup>-1</sup>



Par la polarizabilité ( $\alpha$ ) des alcanes

A plus grande longueur de chaîne ( $\alpha$ ),  
plus grande l'interaction,  
plus grande la protection

$$\uparrow \phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \downarrow$$

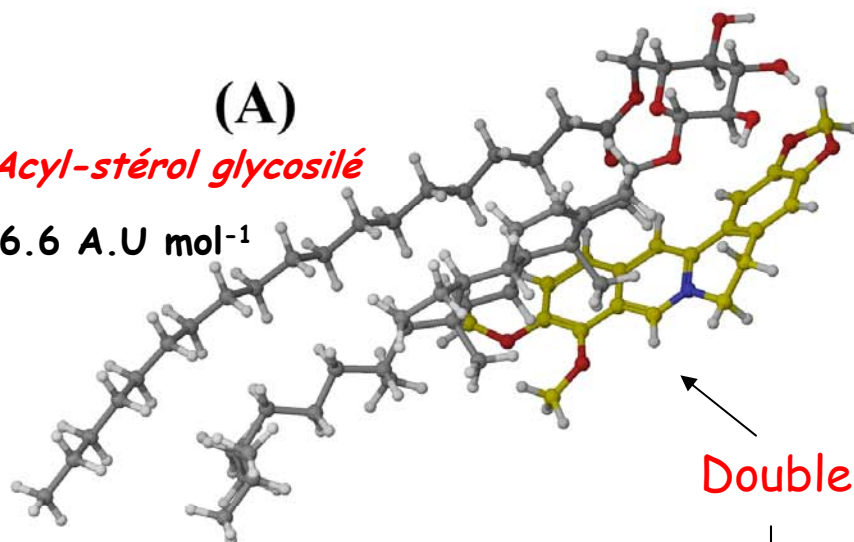
*Longueur de chaîne ( $\alpha$ ) et saturation expliquent les réponses des monoglycerides*

# Hautes réponses FDIC

OPLS\_2005 force field, MacroModel package,  
Schrödinger

(A)  
*Acyl-stérol glycosilé*

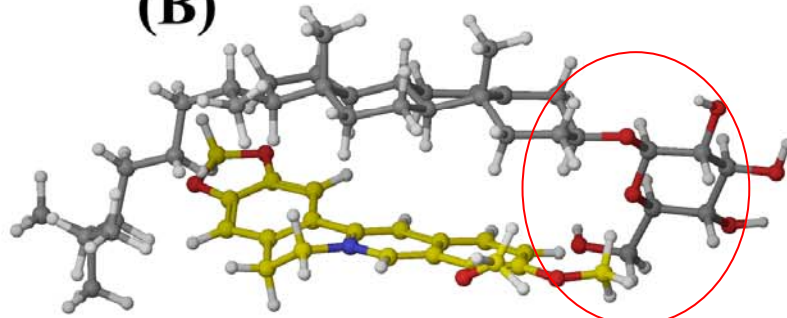
6.6 A.U mol<sup>-1</sup>



(B)

*Stérol glycosilé*

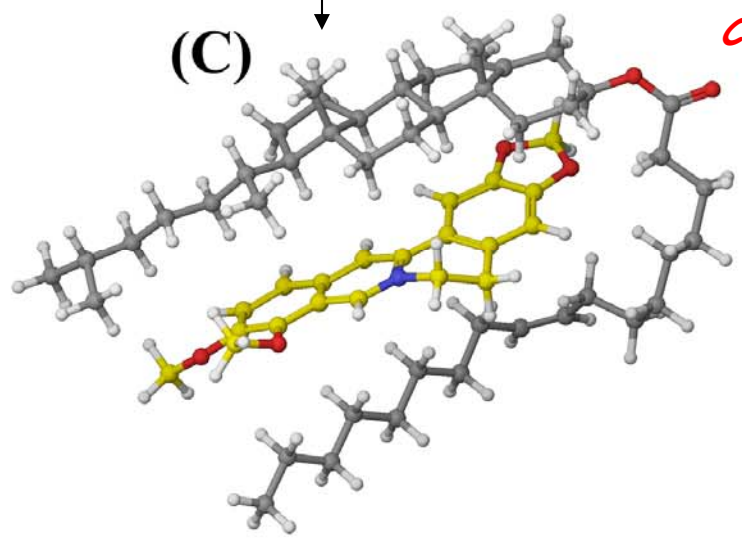
3.3 A.U mol<sup>-1</sup>



(C)

*Cholestéryl oleate*

10.5 A.U mol<sup>-1</sup>

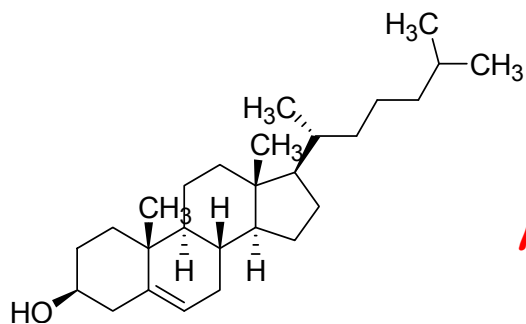


Yellow: berberine

- N atom
- O atom
- C atom

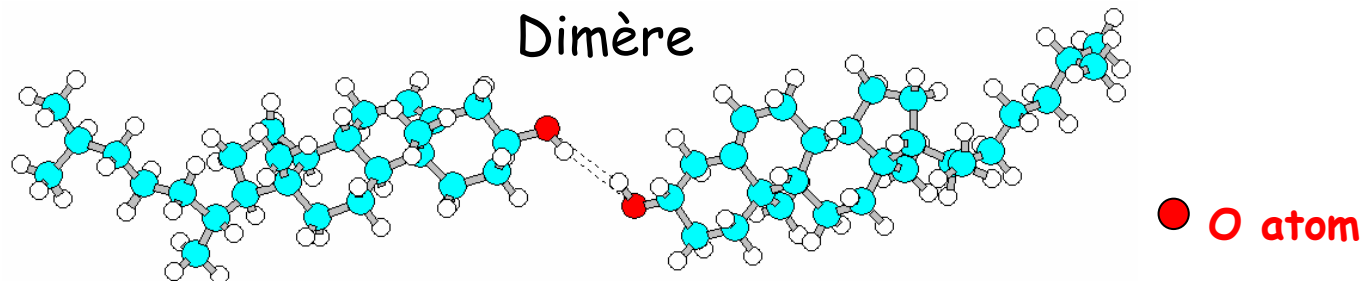
*Cholestérol pur*  
6.4 A.U mol<sup>-1</sup>

# La haute réponse FDIC du cholestérol



**Cholestérol** 6.4 A.U mol<sup>-1</sup>  $\alpha = 47.56 \text{ \AA}^3$  27 C

**n-octacosane** 1.2 A.U mol<sup>-1</sup>  $\alpha = 52.23 \text{ \AA}^3$  28 C

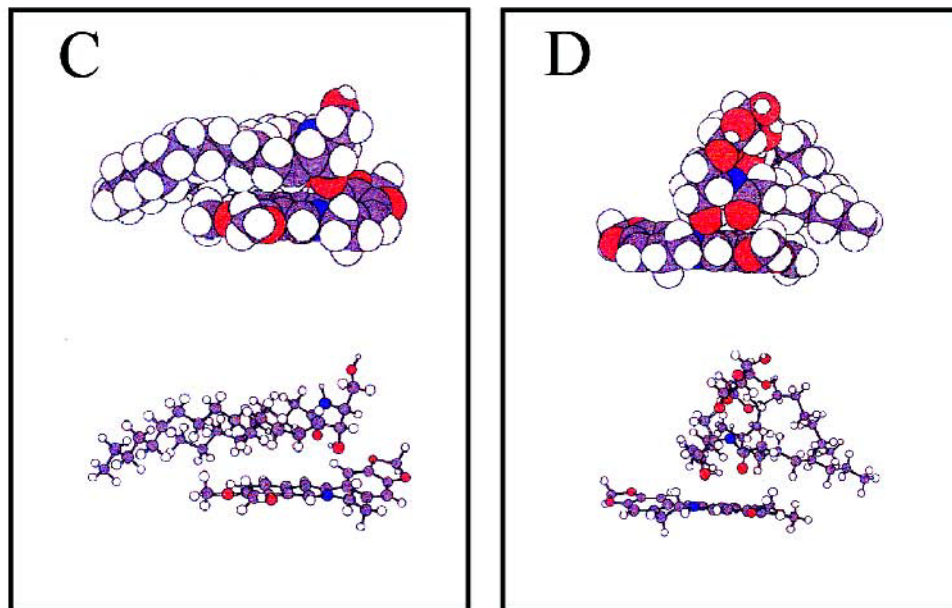


Propriétés du cholestérol associé calculés par Chiosa et avec MM+ and AM1

	Monomer	Dimer	Trimer	Tetramer	Hexamer
Polarizabilité ( $\alpha$ , $\text{\AA}^3$ )	47.56	95.34	141.73	188.76	282.19
Energie d'interaction ( $\Delta E$ , kcal mol <sup>-1</sup> )	-	-5.27	-23.16	-152.24	-19.28

# Faibles réponses FDIC

AMBER force field,  $\Delta E$  (kcal mol<sup>-1</sup>)  
MacroModel package, Schrödinger



**C** Berberine-ceramide **D** Berberine-galactocerebroside



Intéractions spécifiques N-O

## *Sphingolipides*

$$\downarrow \phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \uparrow$$

- Diminution réponse (+)
- Glucosyl > lactosyl > CHT
- Faible réponse (CHT)
- Quenching net

## Quelques conclusions

- FDIC peut être utilisé (par pre- or post-impregnation) en combinaison avec AMD pour séparer, détecter et quantifier toutes les classes de lipides et d'autres composés qui ont une structure partiellement aliphatique
- On a proposé un mécanisme pour la détection qui explique raisonnablement les données expérimentales
- Il n'y a pas une réaction chimique. Ce n'est pas une derivatization. La sensibilité de la détection peut être modulée par un simple changement de la concentration de fluorophore

Merci de votre attention