

Club de Chromatographie sur Couche Mince

14^{ème} année _ 24^{ème} réunion



Détection et quantification en HPTLC

Pierre Bernard-Savary, Club de CCM, info@hptlc.com +33 676 29 32 81

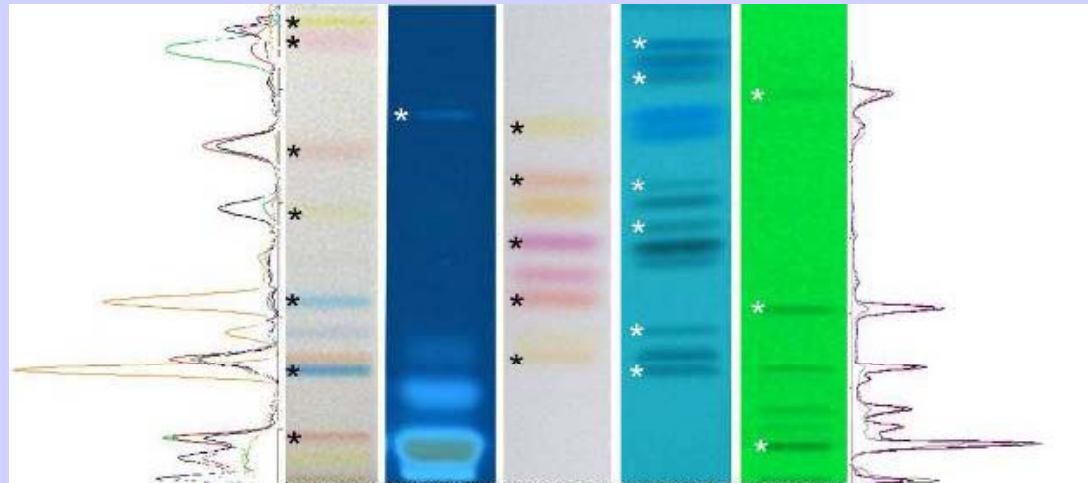
Gerda Morlock, Université de Hohenheim, Stuttgart, Allemagne



Détection et quantification en HPTLC



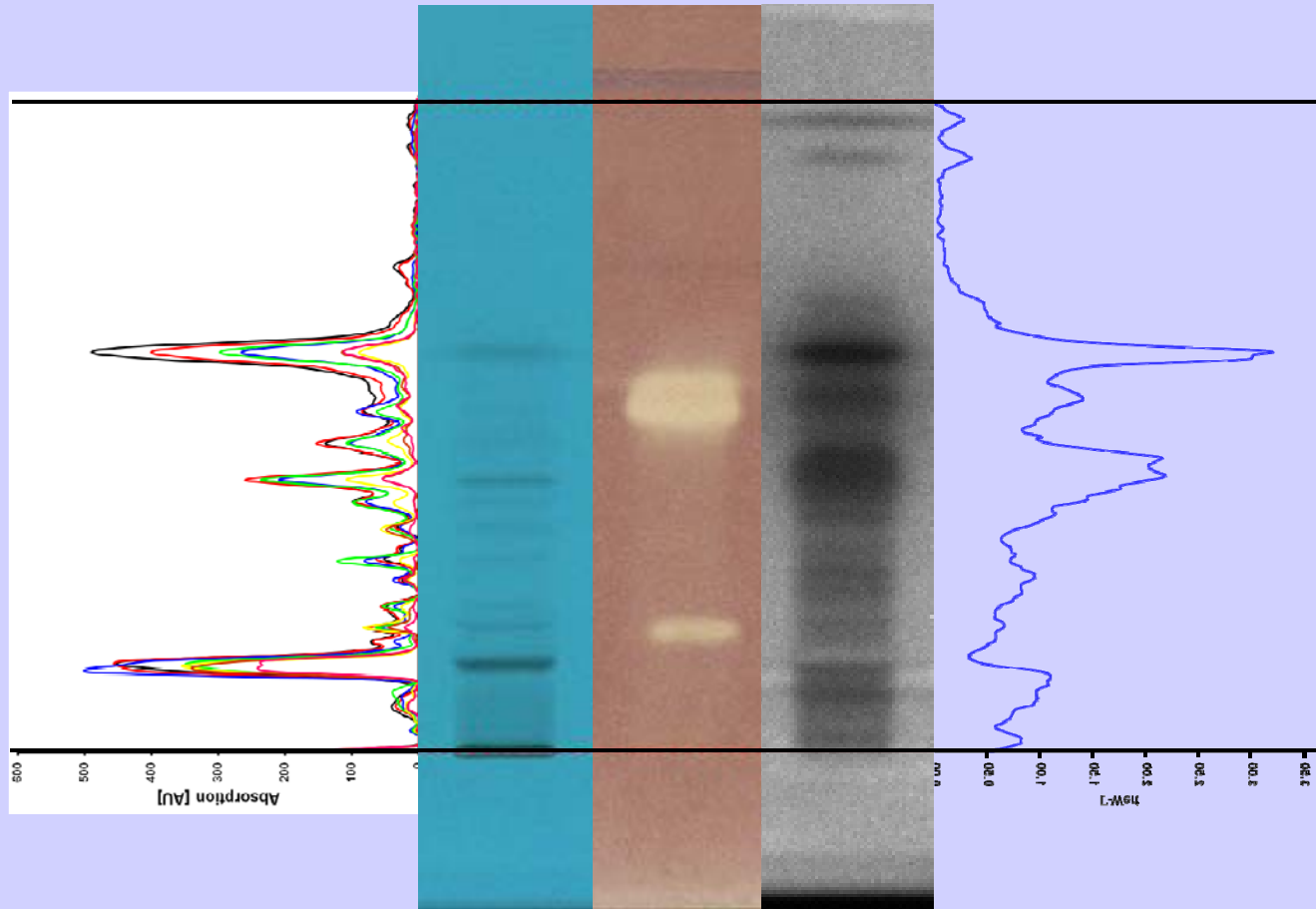
Introduction
Quantification
Couplages
Conclusions



Introduction



Multi wavelength scan $\lambda = 254 \text{ nm}$ AChE *Vibrio fischeri* Γ Value



From Stefan C. Weiss, LKW, HPTLC'11

Introduction



Pré-requis à l'analyse HPTLC
Bases de la lecture quantitative
Aspects pratiques et exemples.

Revue des couplages et détections
biologiques EDA, nouveautés et
exemples.

Introduction à la quantification



Déjà en Juin 2001 et Octobre 2008

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)

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

Choix de la plaque et nettoyage

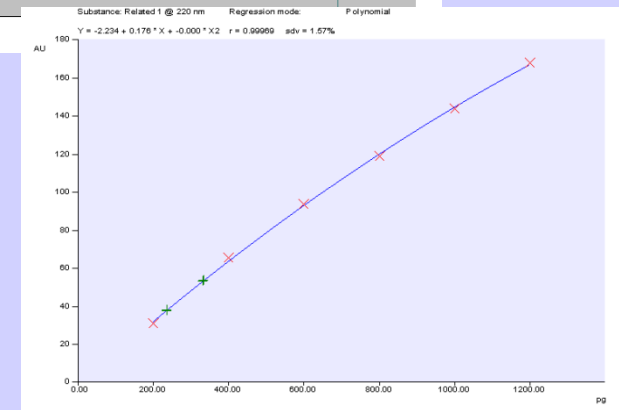
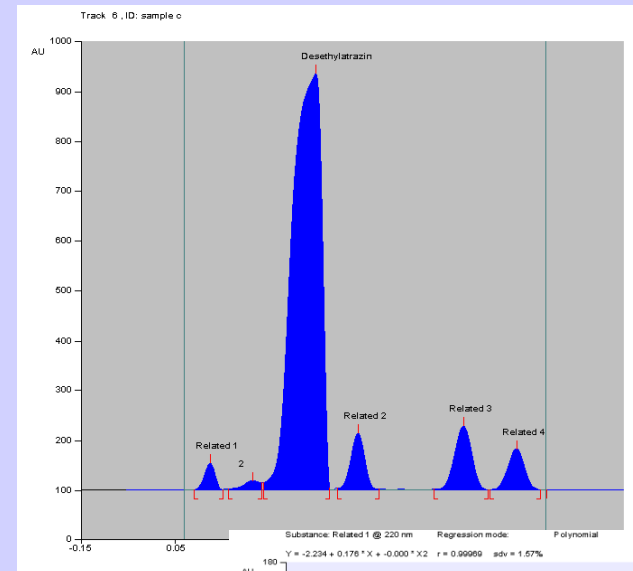
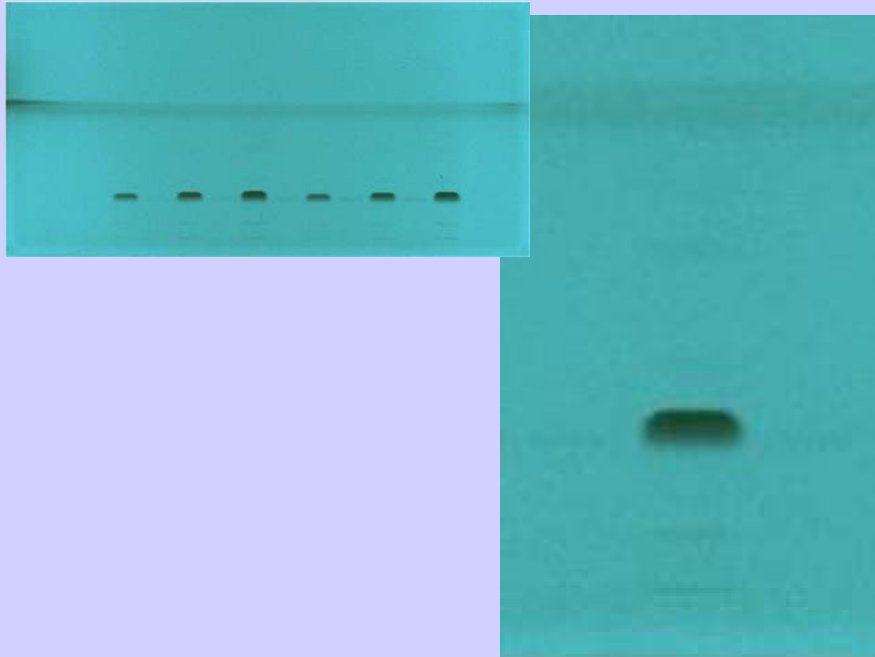


Indicateur indispensable en vidéo à 254nm
mais pas en densitométrie

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

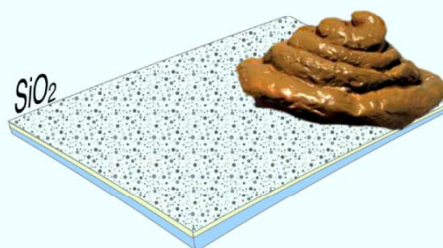


thickness (μm)	pH of layer	fluorescence indikator	Productnumber	typical use
<i>HPTLC Standard</i>		broken material		
100	"alkaline"	+	11764	pH-Gradient, pesticides
200	"alkaline"	-	5641	pH-Gradient, pesticides
200	"alkaline"	+	5642	pH-Gradient, pesticides
<i>Plaques WR</i>				
100	"acidic"	-	110556	acidic 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

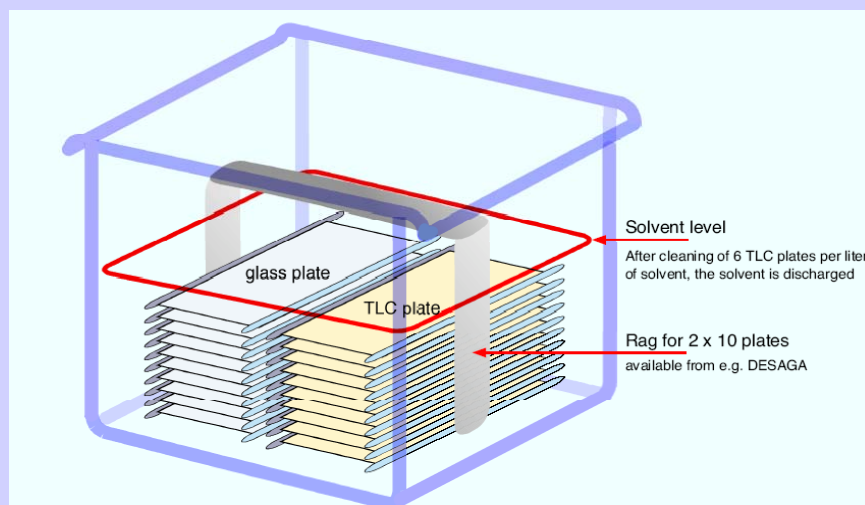
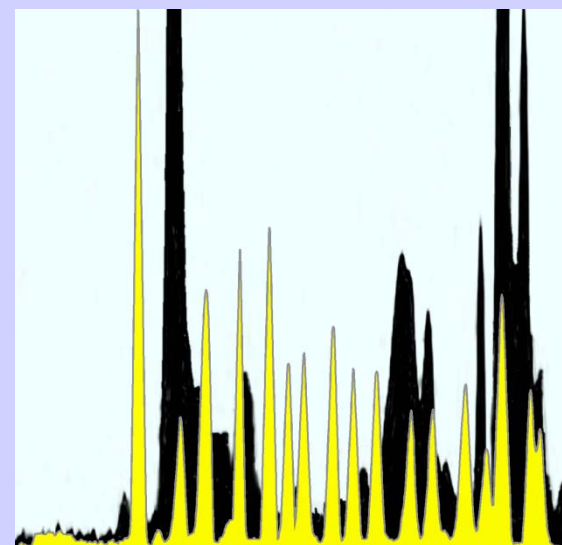
Nettoyage...



A dog's muck ...



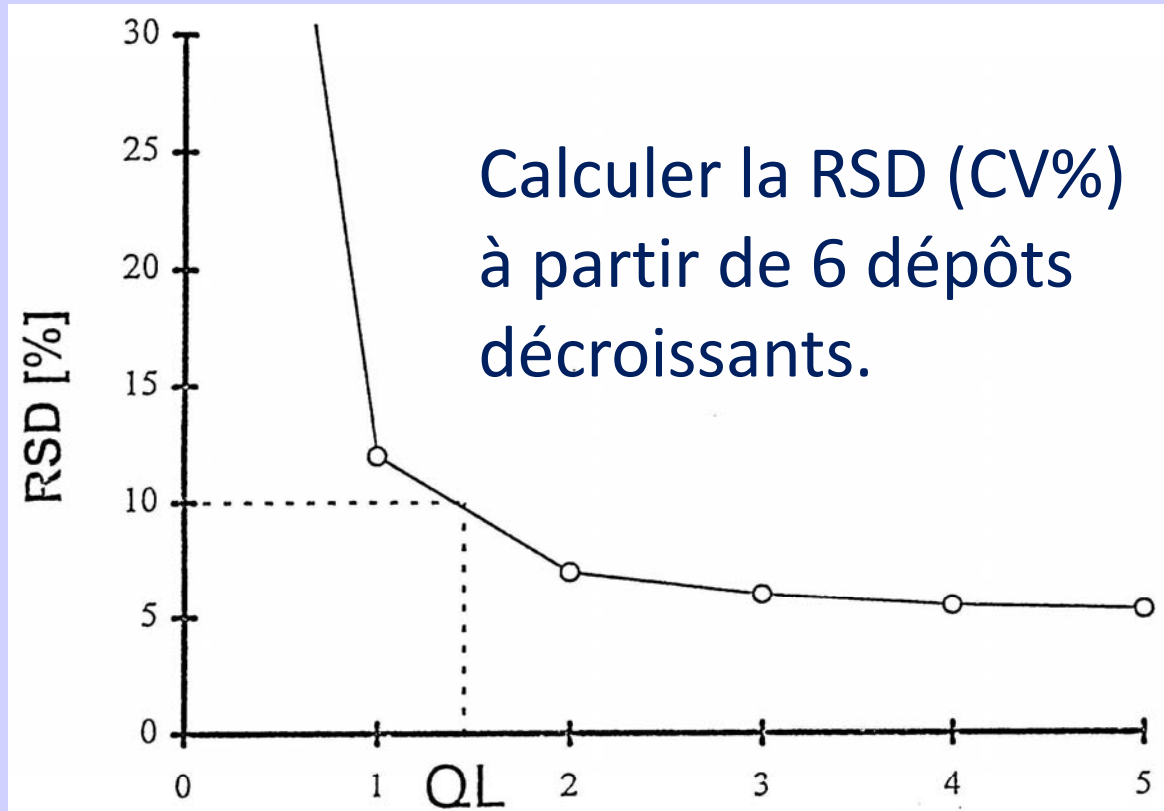
and how to prevent it!



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

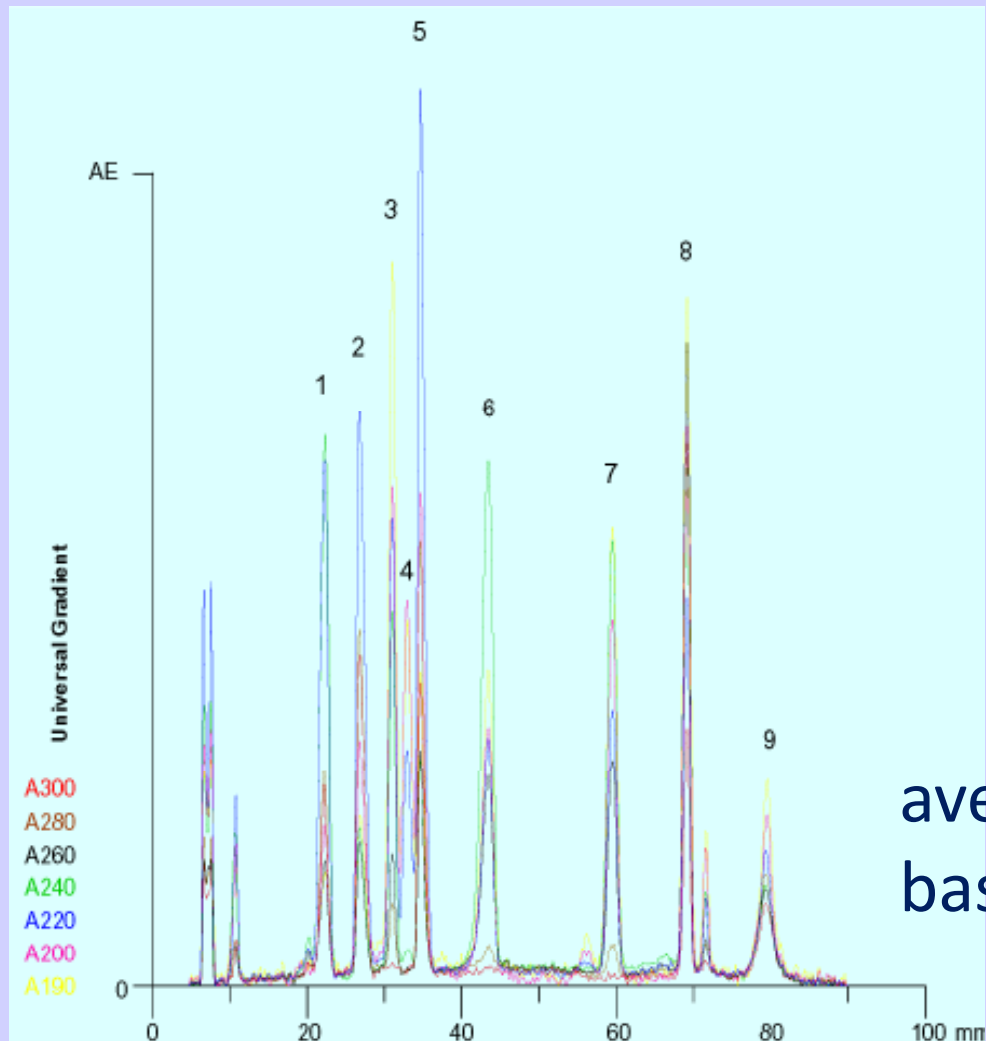
From K.Burger, Lyon'03

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...)

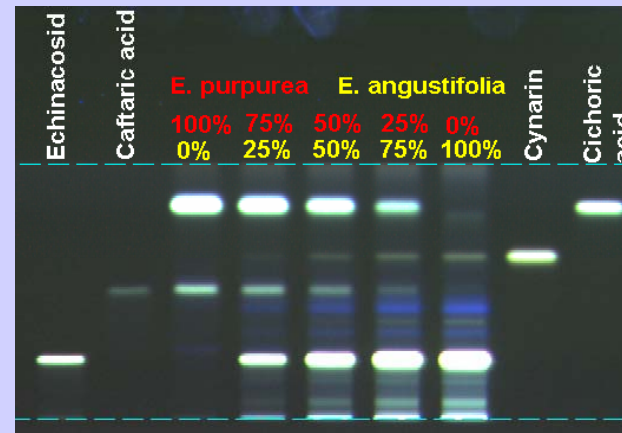
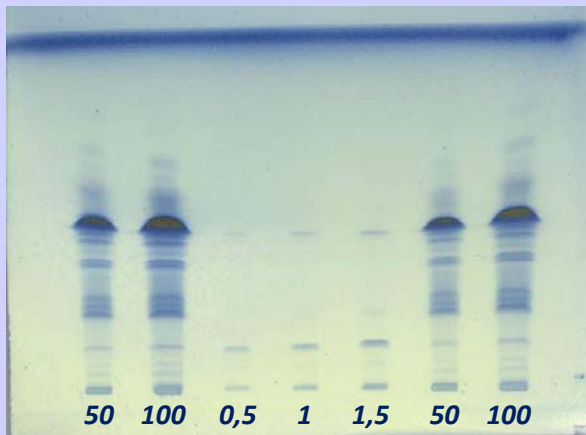
Utilisation d'une gamme de standard bien
choisie

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

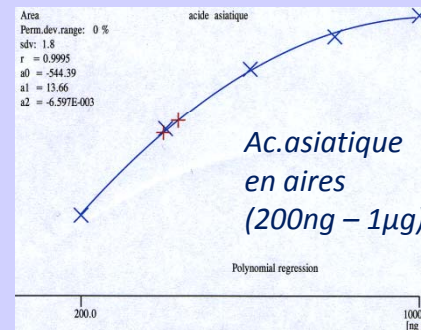
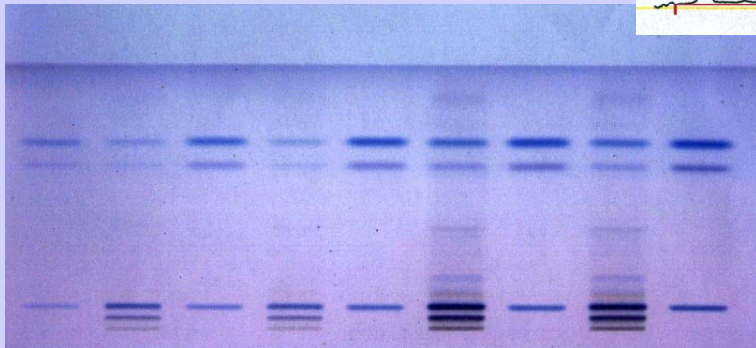
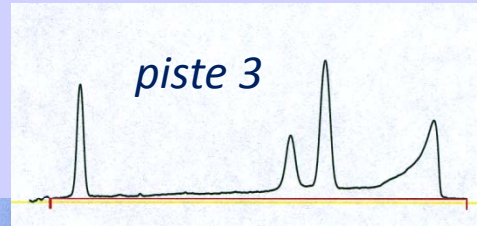


Dans ce cas le choix de la gamme de standard pour encadrer les points à mesurer est primordiale.

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.

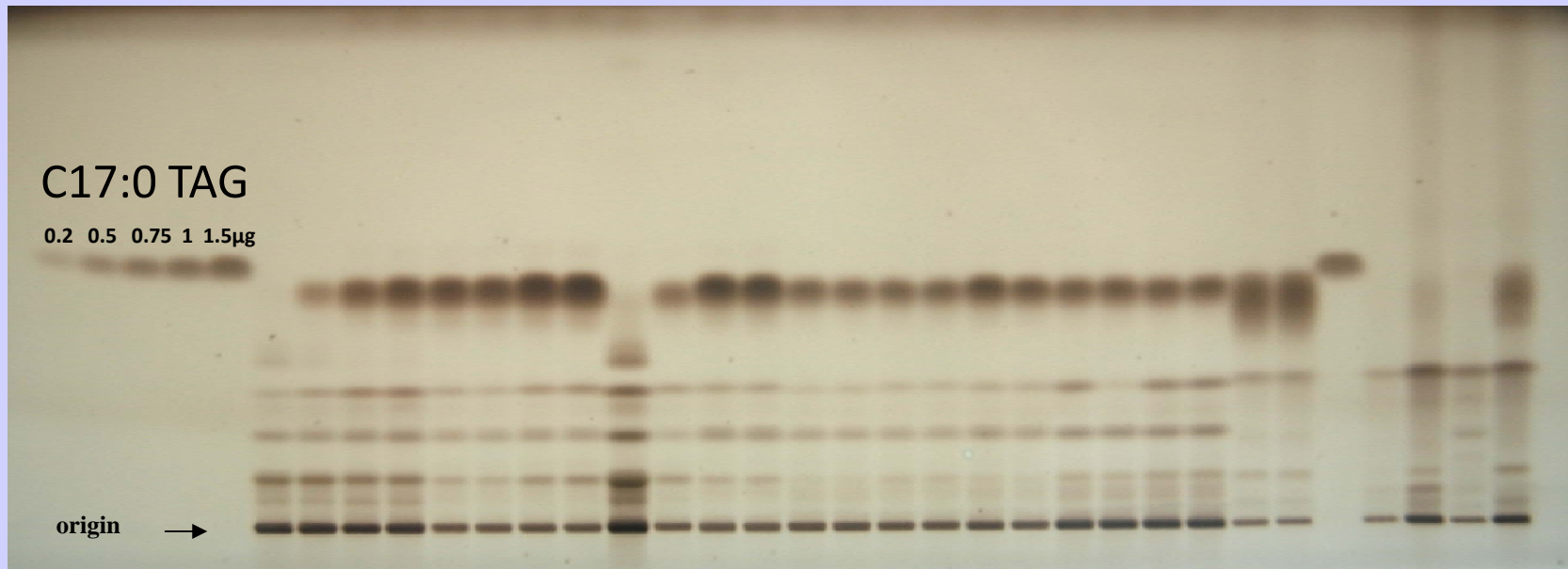


On dépose ensuite les échantillons (pas tous du même côté, et au moins en double) de manière à ce qu'ils se retrouvent dans la gamme.

Utilisation optimale de la plaque(...)



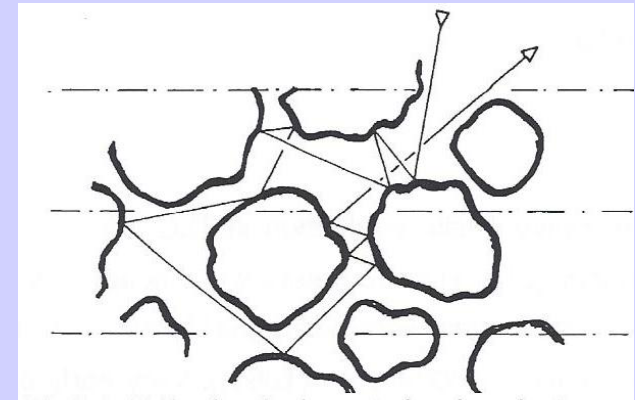
30 dépôts sur la plaque mais... les standards d'un coté ne permettront pas de tenir compte de l'homogénéité de la plaque (semi-quantitative HTS)



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.

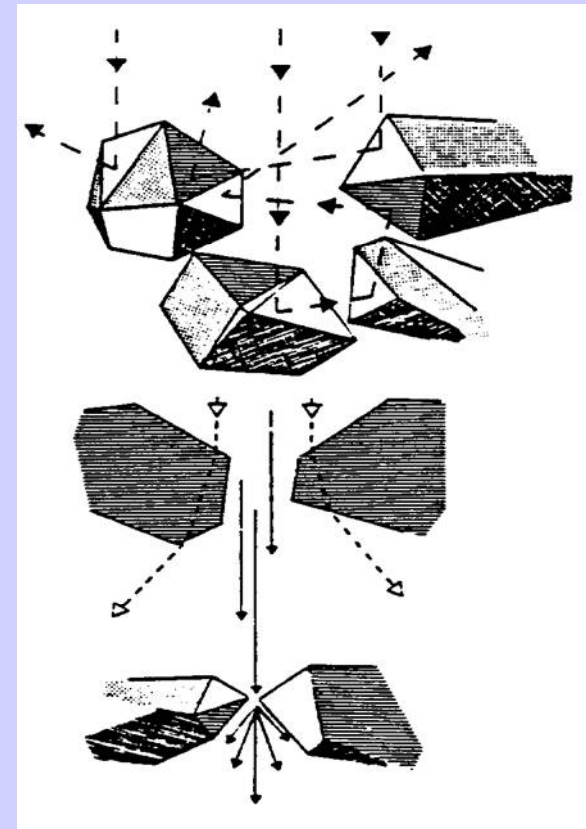
Bases de la lecture quantitative



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).

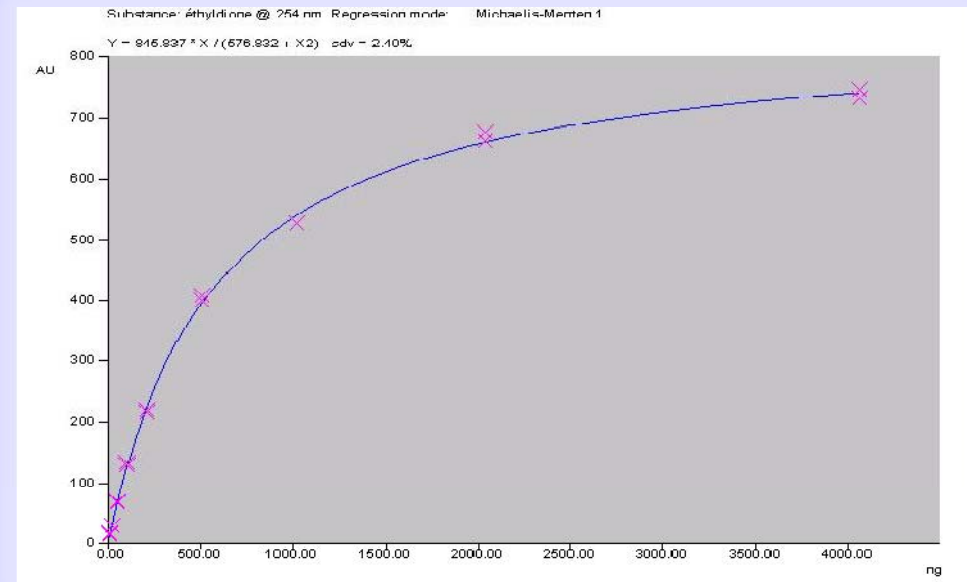


Bases de la lecture quantitative



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



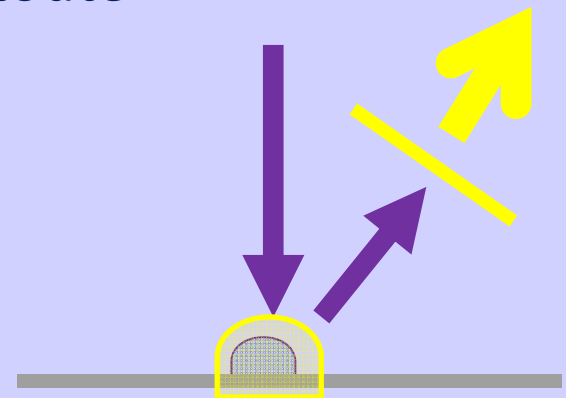
Conclusion :

En **absorbance**, il faut de préférence travailler aux limites de quantification pour s'éloigner autant que possible de la zone de saturation.

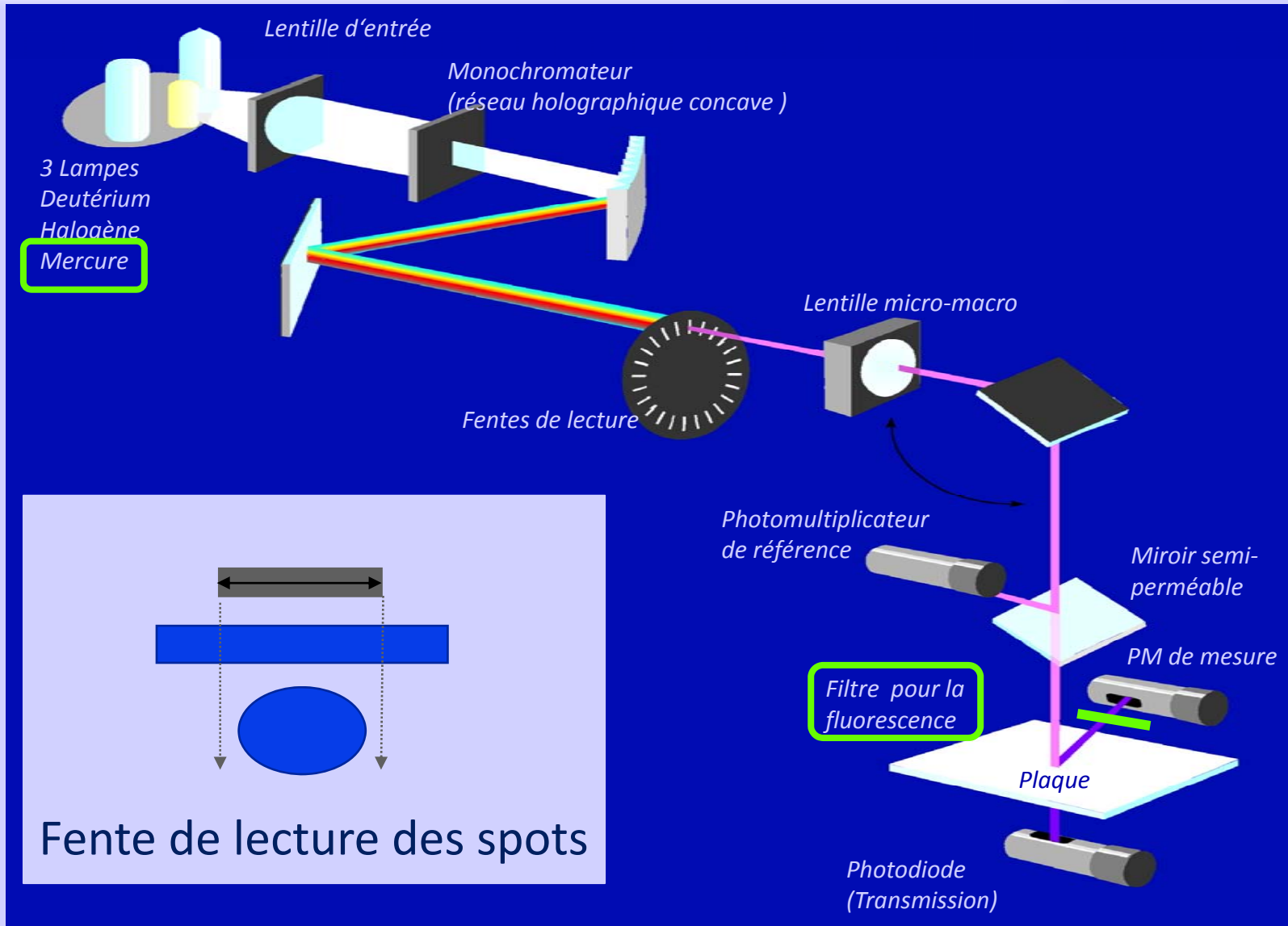
Calibrer au moins sur deux points si l'on se trouve dans une zone linéaire pour borner le domaine de travail

Ce domaine doit toujours être étudié avant toute analyse quantitative.

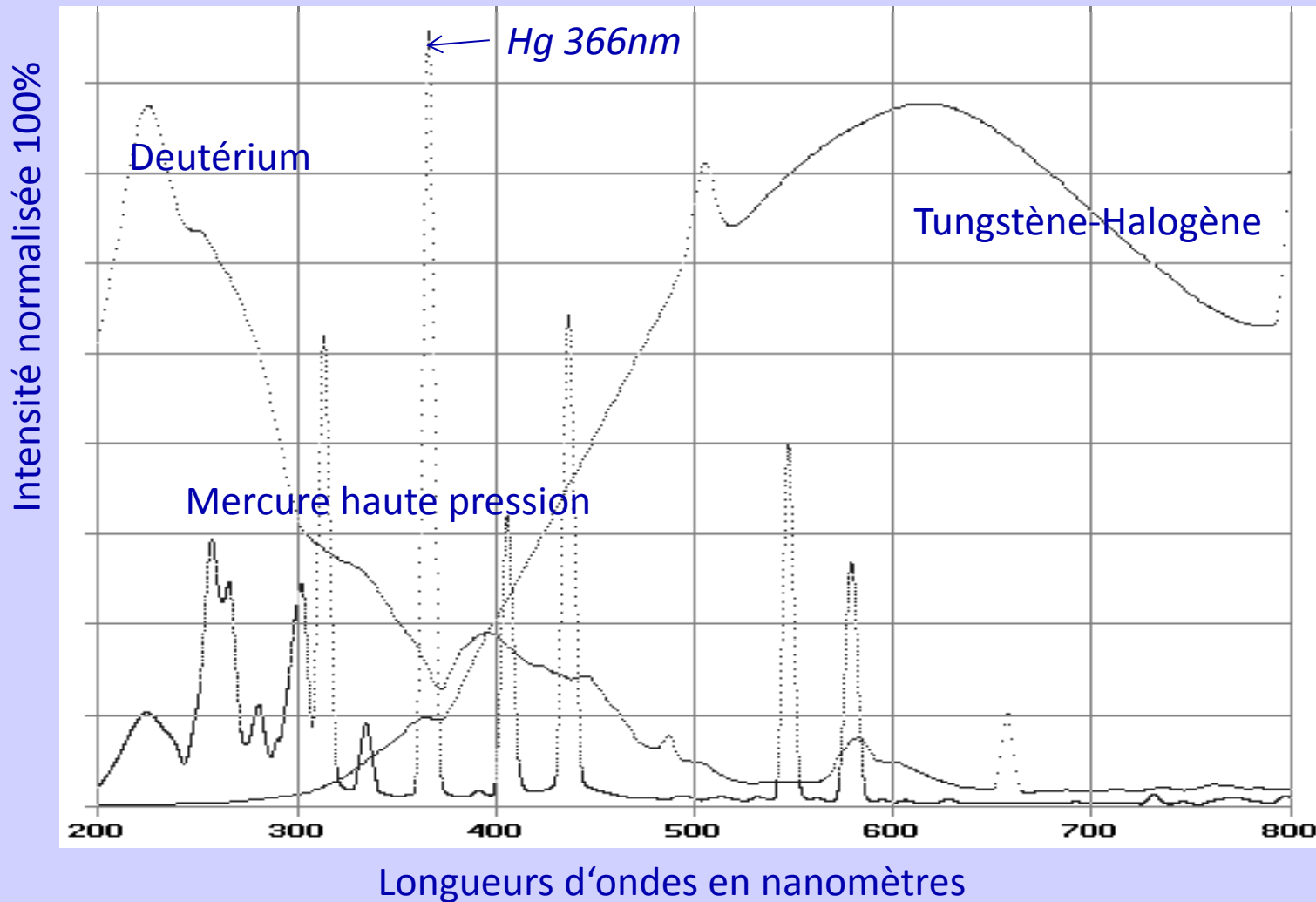
En **fluorescence** on est pas confrontés au phénomène de saturation, et on peut plus facilement obtenir une réponse linéaire



Lecture en densitométrie (schéma)



Spectres des lampes



Paramétrage abs et fluo



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 θ adjust	5.0 mm
Track # for θ adjust	1
Track start for quick scan	Automatic
Track end for quick scan	Automatic
Track # for quick scan	Automatic
Analog offset	1U %
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 θ adjust	K320
Track # for θ adjust	K400
Track start for quick scan	K540
Track end for quick scan	U1:
Track # for quick scan	U2:
Track # for quick scan	U3:
Track # for quick scan	Automatic
Analog offset	1U %
Sensitivity	Automatic

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

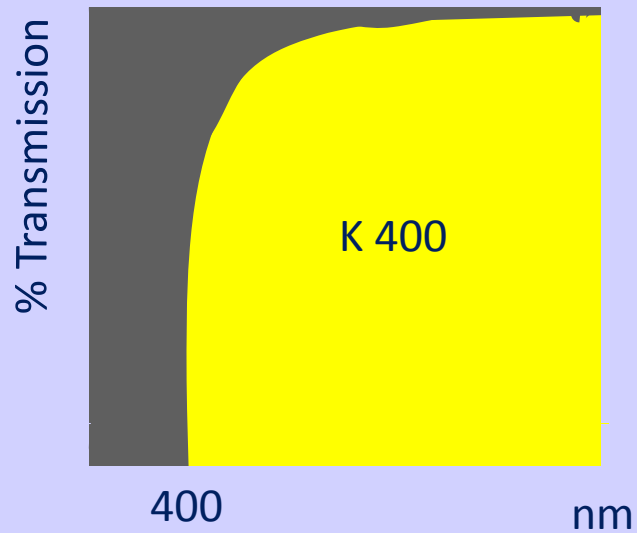
Detection Analysis ready 00:00:00

Mesure en fluorescence

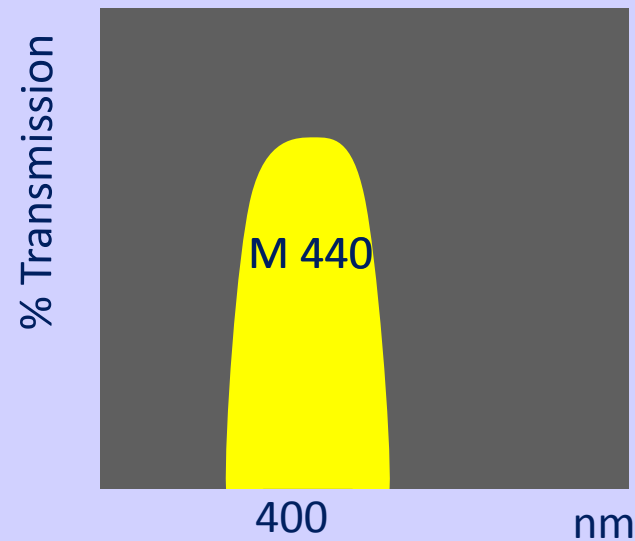
Filtres en fluorescence



Filtre coupe-bas



Filtre à bande étroite



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

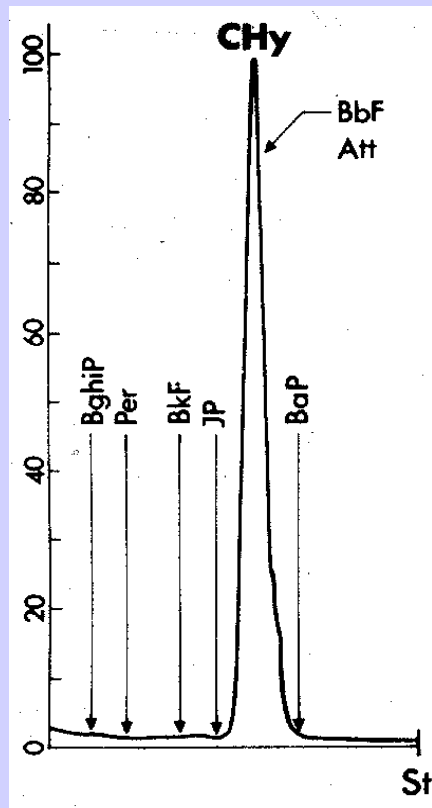
Types de filtres

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

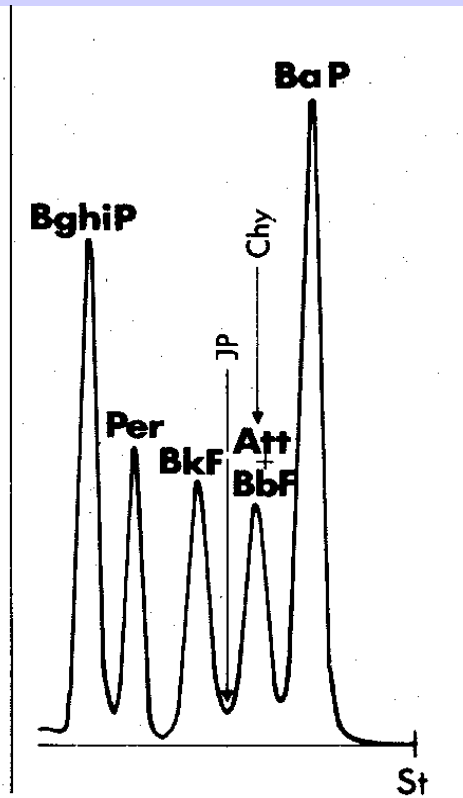
Application au dosage des HPA



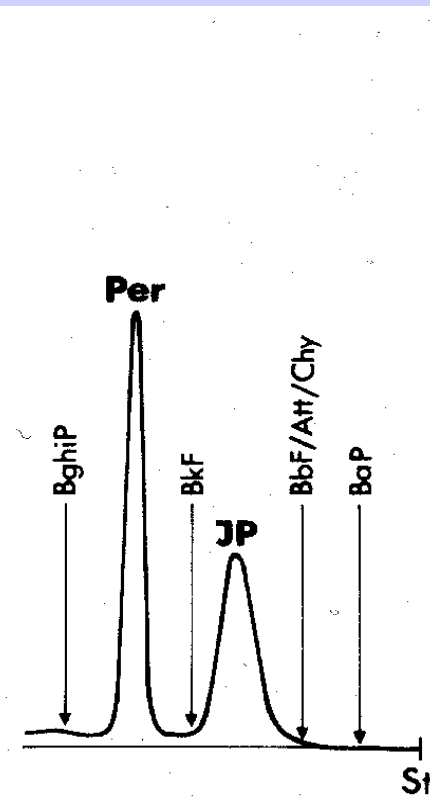
266/M365 nm



365/M436 nm

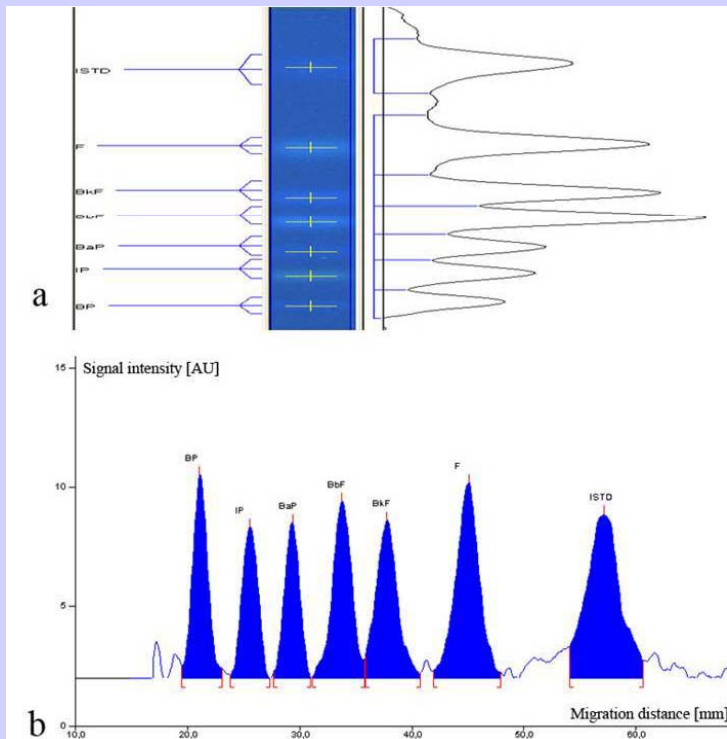


436/M578 nm



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

Introduction à la détection



Révélation bien connue et relayée

- Précédentes réunions
- Livre des révélateurs sur le site du Club

Développement des couplages


- MS ...
- Effect Directed Analysis**

Pourquoi l'EDA sur HPTLC



Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 6600–6609

Contents lists available at ScienceDirect

 **Journal of Chromatography A**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Review

Hyphenations in planar chromatography

Gertrud Morlock*, Wolfgang Schwack

University of Hohenheim, Institute of Food Chemistry, Garbenstrasse 28, 70599 Stuttgart, Germany

- HPTLC-UV/Vis/FLD-MS [13,14],
- HPTLC-UV/Vis/FLD-bioactivity-HRMS [15],
- HPTLC-UV-FTIR [16,17],
- HPTLC-UV/Vis/FLD-FTIR ATR [18],
- TLC-Vis-SERS [12].

ARTICLE INFO

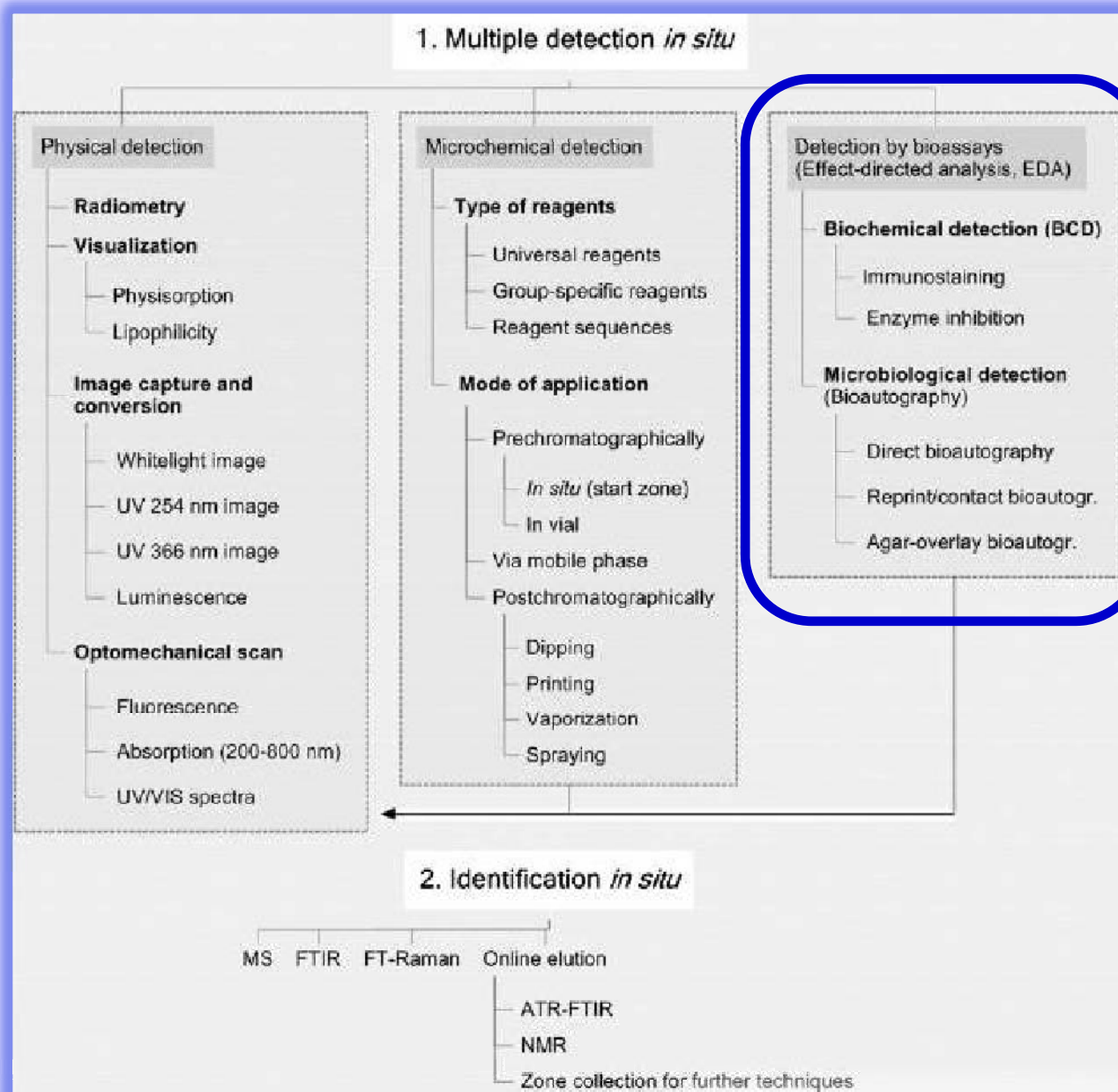
Article history:
Available online 20 May 2010

Keywords:
Mass spectrometry
High-performance thin-layer chromatography
Effect-directed analysis
Bioassays

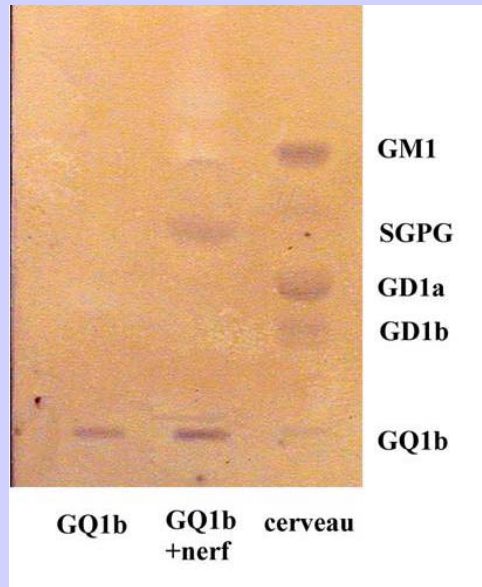
ABSTRACT

This review is focused on planar chromatography and especially on its most important subcategory high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). The image-giving format of the open, planar stationary phase and the post-chromatographic evaporation of the mobile phase ease the performance of various kinds of hyphenations and even super-hyphenations. Examples in the field of natural product search, food and lipid analysis are demonstrated, which point out the hyphenation with effect-directed analysis (EDA) and mass spectrometry and illustrate the efficiency gain. Depending on the task at hand, hyphenations can readily be selected as required to reach the relevant information about the sample, and at the same time, information is obtained for many samples in parallel. The flexibility and the unrivalled features through the image format valuably assist conventional scientists.

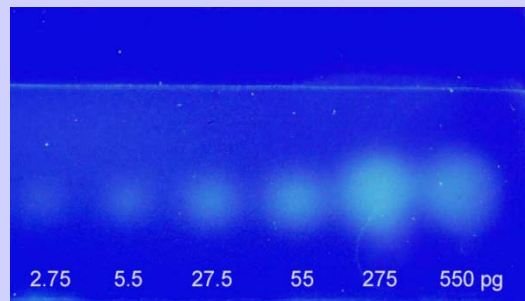
“the main difference is : with HPLC, after separation, samples go to the waste; with HPTLC, after separation, samples remain on the dried plate” (G.Morlock, HPTLC’11)



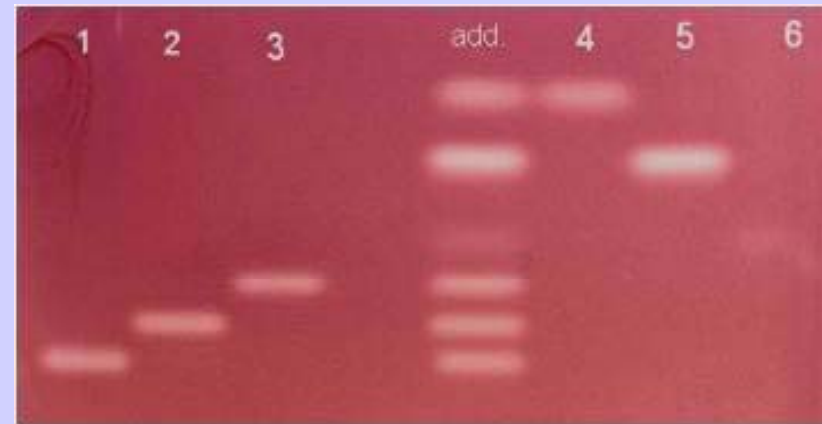
EDA = Effect Directed Analysis



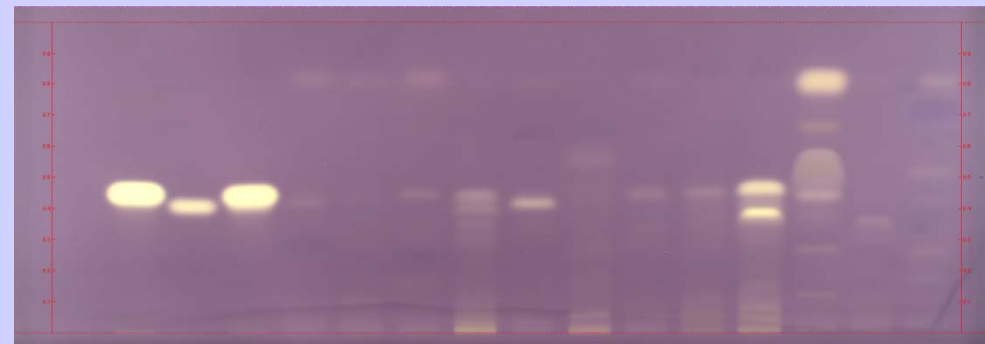
Immunostaining _ antigènes-anticorps gangliosides, M.J. David, Biochimie HEH



Hormones en équivalent estriol (C.Weins, Berlin'06)

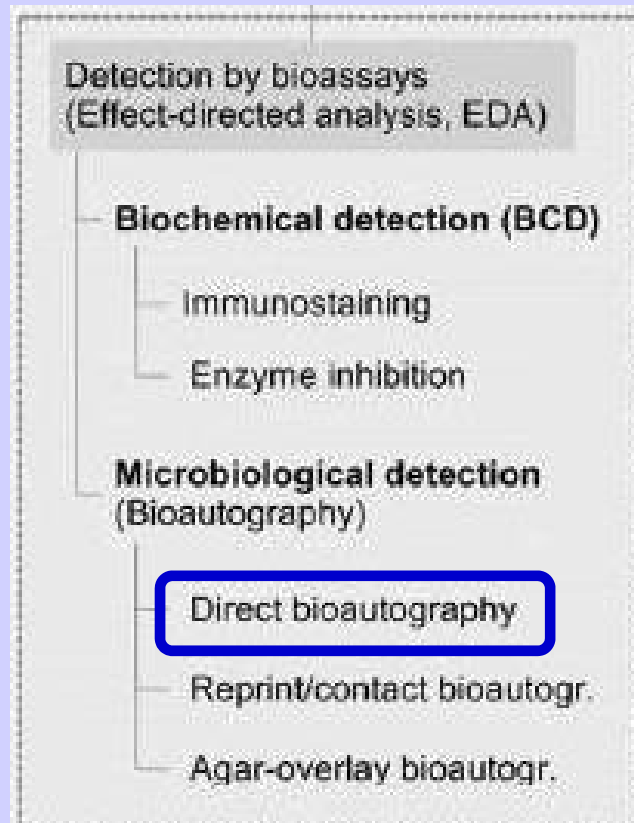


Test sur pesticides (2 pg sur la plaque) HPTLC, Berlin 2006, W.Schwack



Activité anti oxydante des huiles essentielles_test DPPH_ note F-38 CAMAG

EDA = Effect Directed Analysis



EDA = Effect Directed Analysis

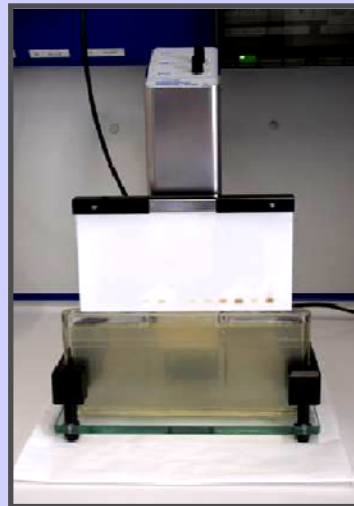


Vibrio fischeri



BIOLUMINESCENCE

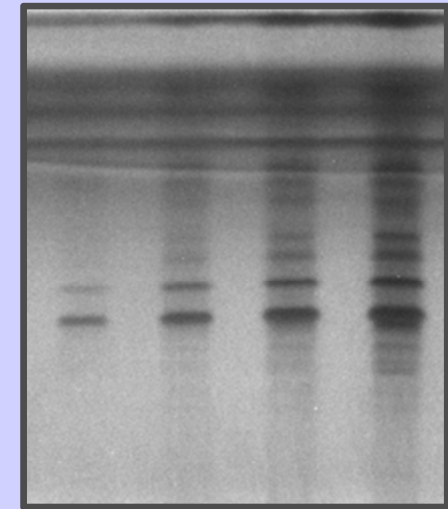
Immersion



Détection



Résultat



simple, rapide, efficace

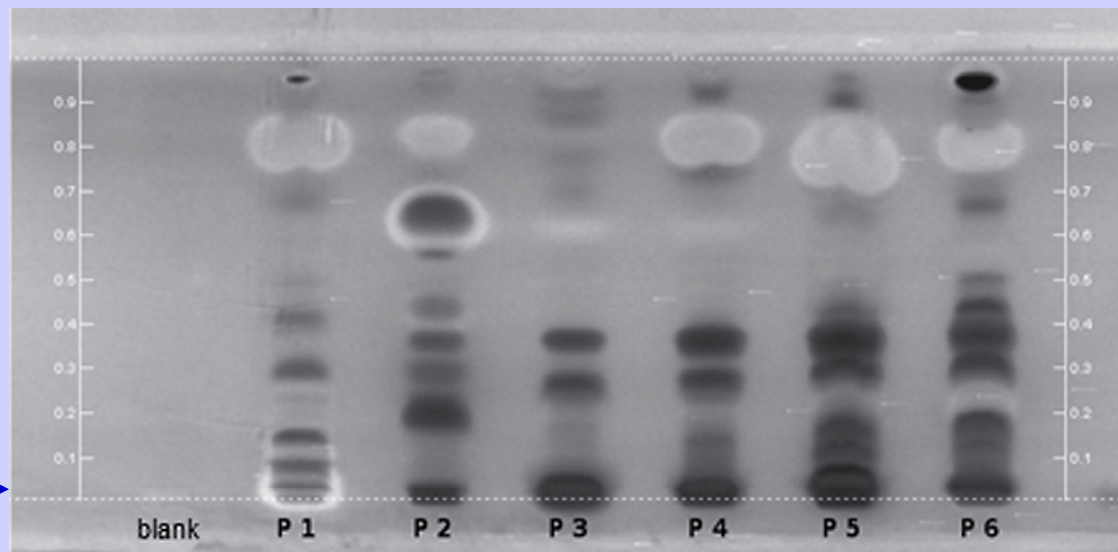
Pourquoi mieux qu'en cuvettes



élution via
l'interface
HPTLC-MS



Les inhibitions de bioluminescence apparaissent en sombre, son augmentation apparait en zones claires.



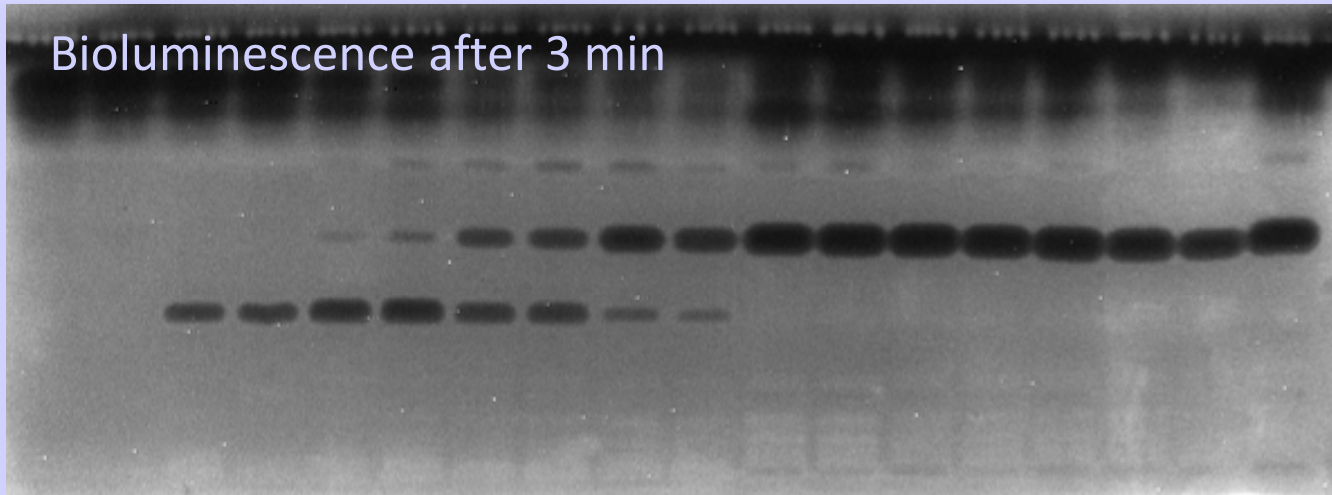
Parce que l'on a plus d'information due au fait que les zones claires et sombres sont séparées et non moyennées.

6 types de feuilles d'emballage: :
blanc: ethanol, P1 and P2: commercial PVC cling film, P3: commercial PE cling film, P4: foil of a mushrooms' packaging, P5: packaging foil for meat, and P6: packaging foil for cheese.

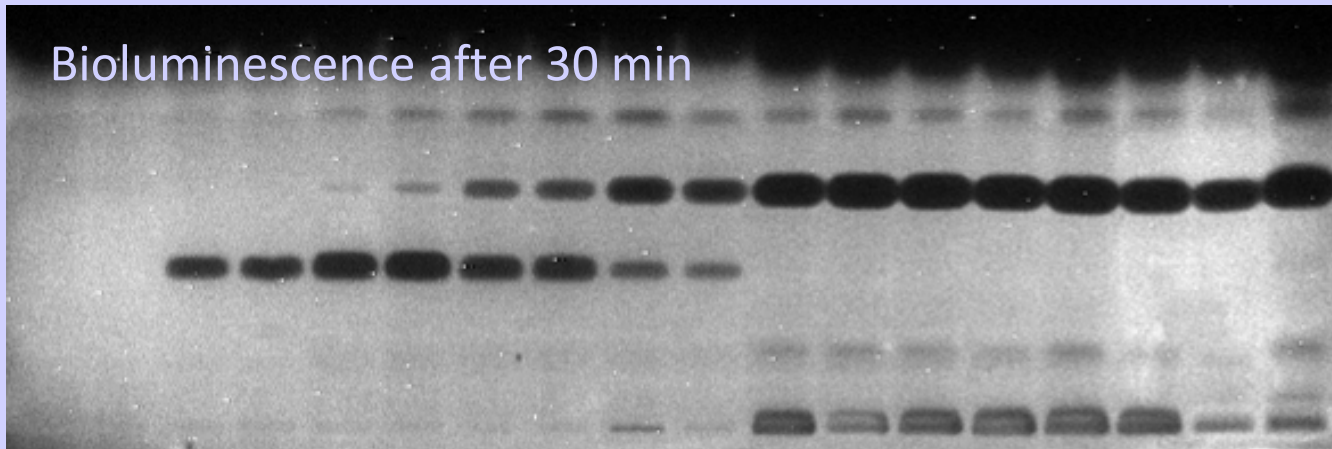
Bioactifs toxiques de *Basidiomycetes*



Bioluminescence after 3 min



Bioluminescence after 30 min



EDA pour le monitoring de bioréacteurs.

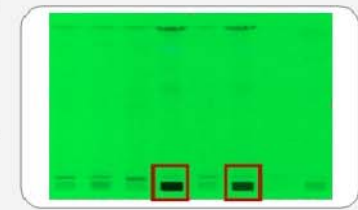
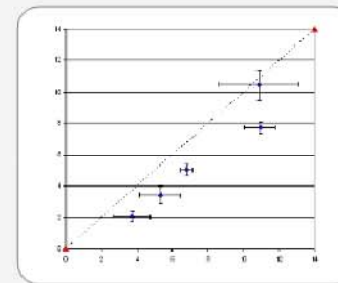
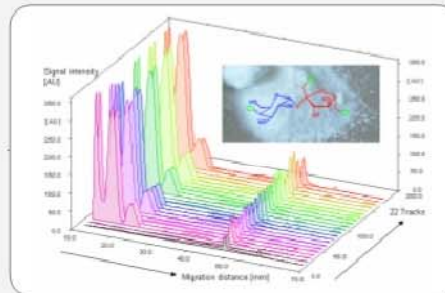
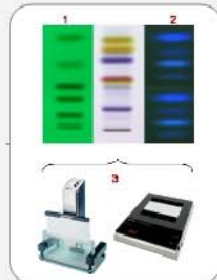
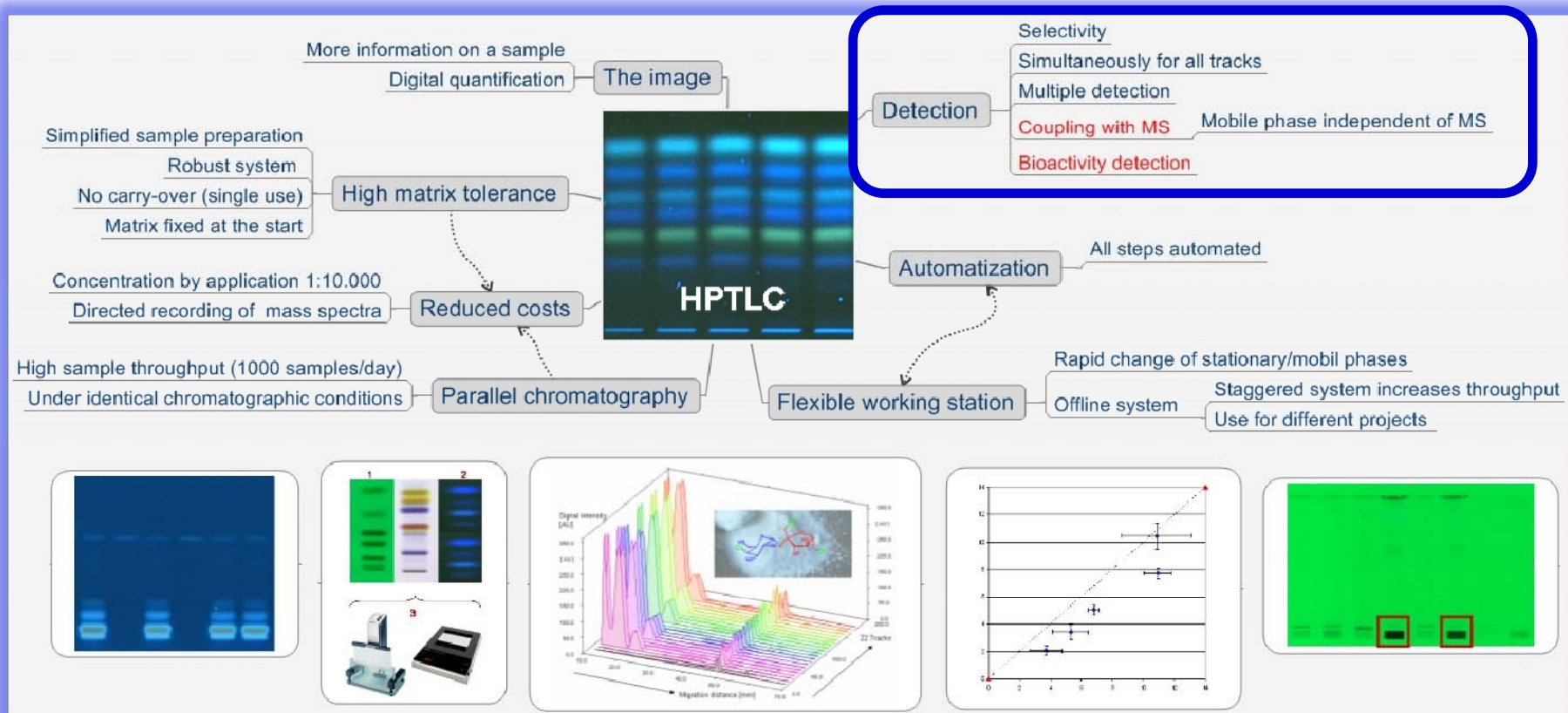
Instrumentation for good results...



HPTLC is an OFF-LINE method, with automation at each step



HPTLC is an attractive method



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

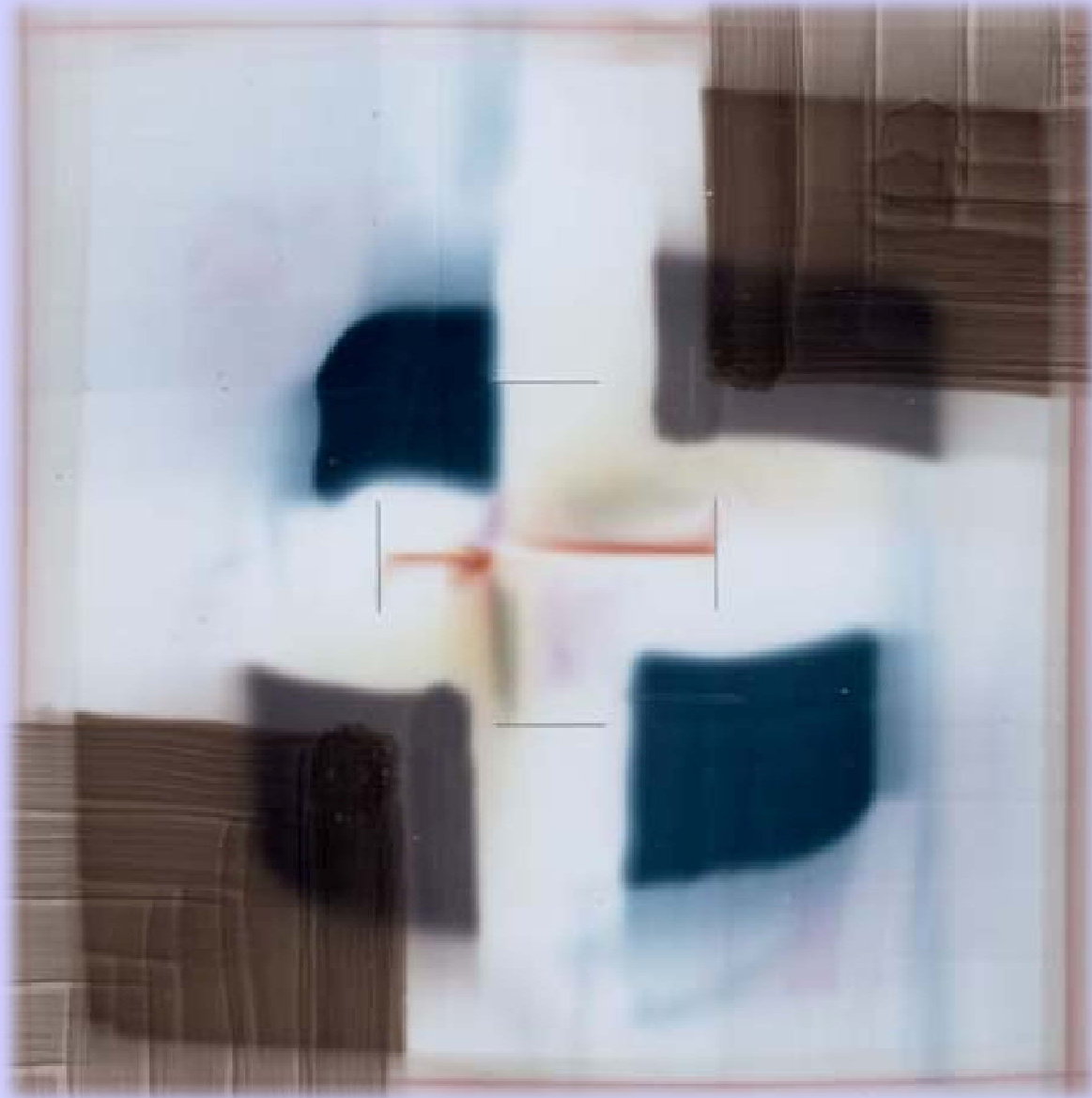
Conclusion



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 **détection sélective** (très nombreuses possibilités, en particulier en fluorescence)
- 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

et je vous remercie de votre attention ...!

