



32^{ème} Réunion du Club de CCM 18-19 Octobre 2017

Quand et comment utiliser l'HPTLC selon la problématique

Le choix optimal



Généralités

L'HPTLC vs les autres méthodes : complémentarité /compétition (le premier qui a le BON résultat)

Quelle chromatographie pour une question donnée (ex: IR ADN HPTLC pour l'identification de plantes)

Quelles compétences (comment les évaluer) et équipements minimales sont nécessaires (le marteau et le clou)

La question des couplages (spectroscopiques et chromatographiques)

Généralités



2 chromatographies liquide & 1 gazeuse

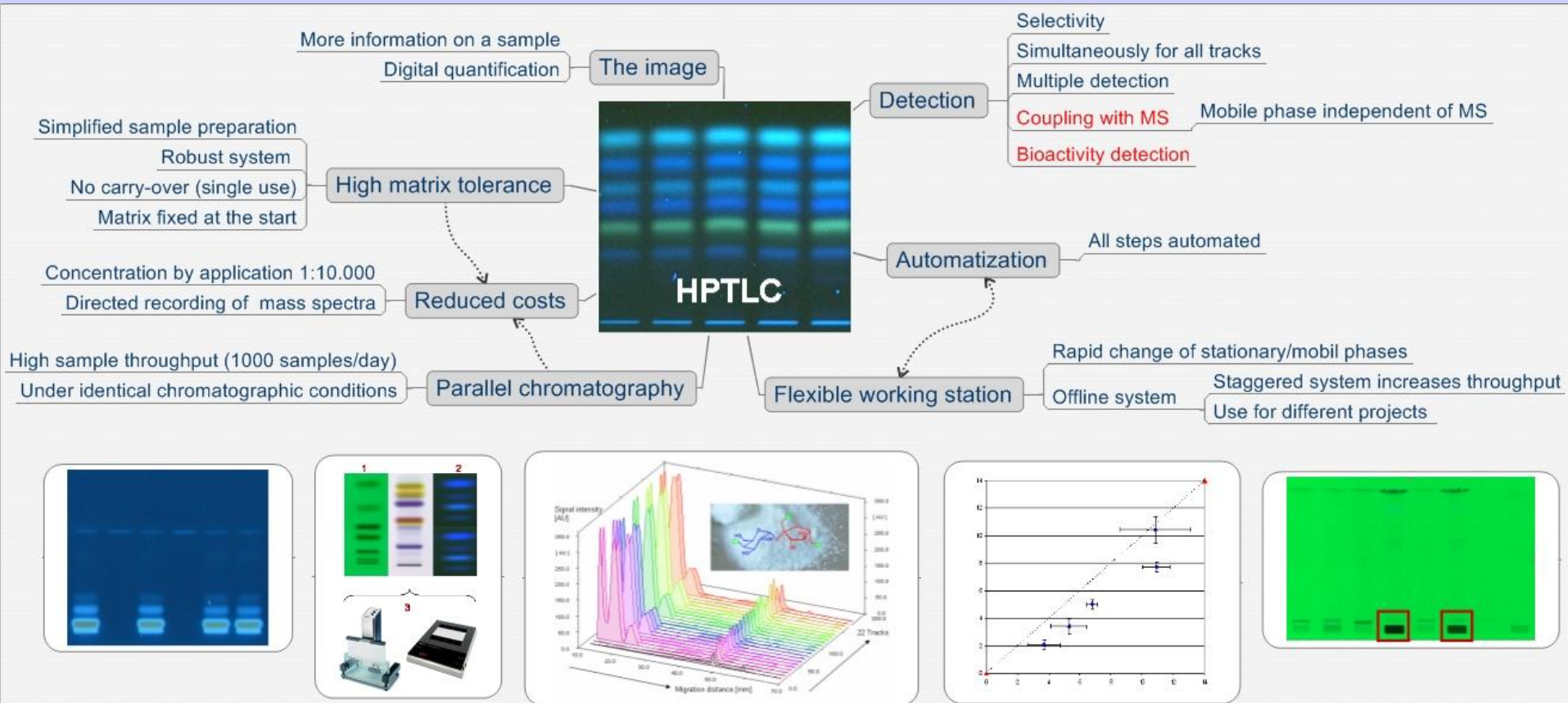
2 chromatographies on-line (en série) & 1 off-line (séquentielle)

3 possibilités d'automatisation mais une peut se faire sans électricité («TLC for ... limited resources countries » Kaale, Tanzanie , & intérêt miniaturisation/portabilité)

1 force de capillarité (vitesse décroissante $Z^2=kt$), 2 flux forcé (vitesse constante phase mobile)



Rappels généraux HPTLC



une méthode pleine de ressources !!! ... on le sait

Effcacité, sensibilité, ou sélectivité ?



P.SCHOENMAKERS
efficacité

A.MAKAROV
sensibilité

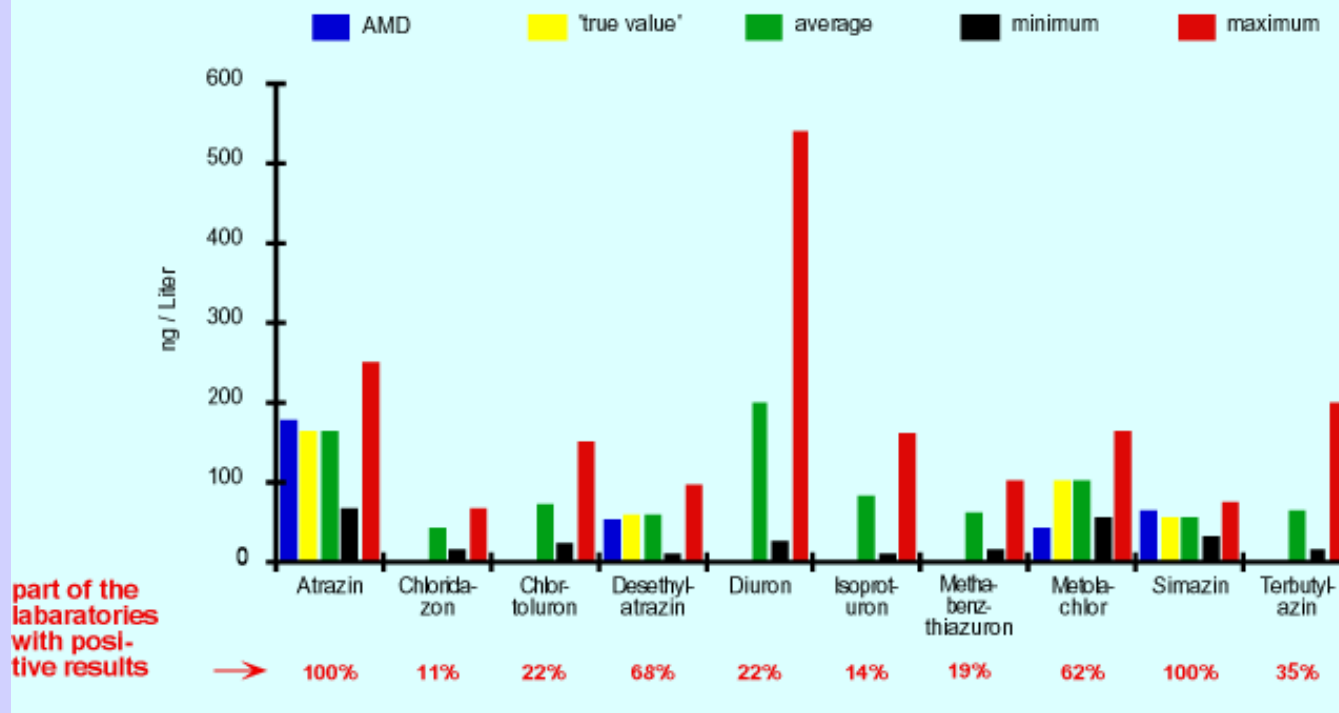
P.SANDRA
sélectivité

C'est la sélectivité !!! ... on le sait, ou on devrait.



... une histoire de sélectivité

37 Participants, Analytical Program: 10 Herbicides. Sample W



Complémentarité méthodes



La complémentarité des méthodes existe en théorie mais est peu pratiquée

Une évidence est l'orthogonalité des méthodes qui est fortement conseillée lorsque l'on veut garantir un résultat

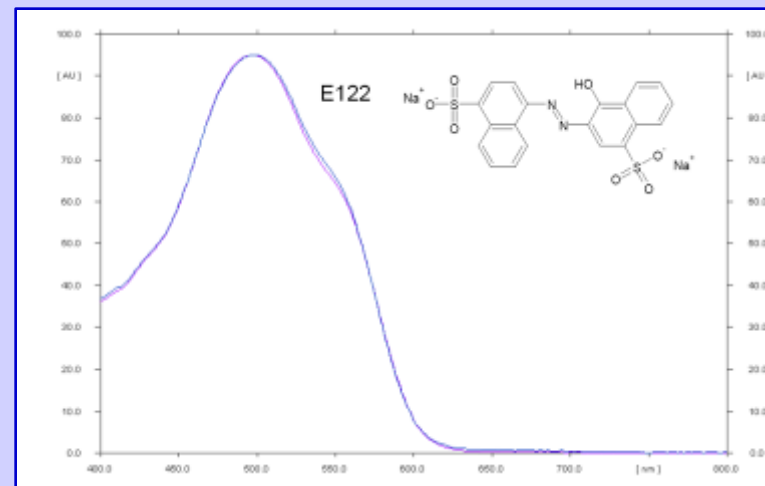
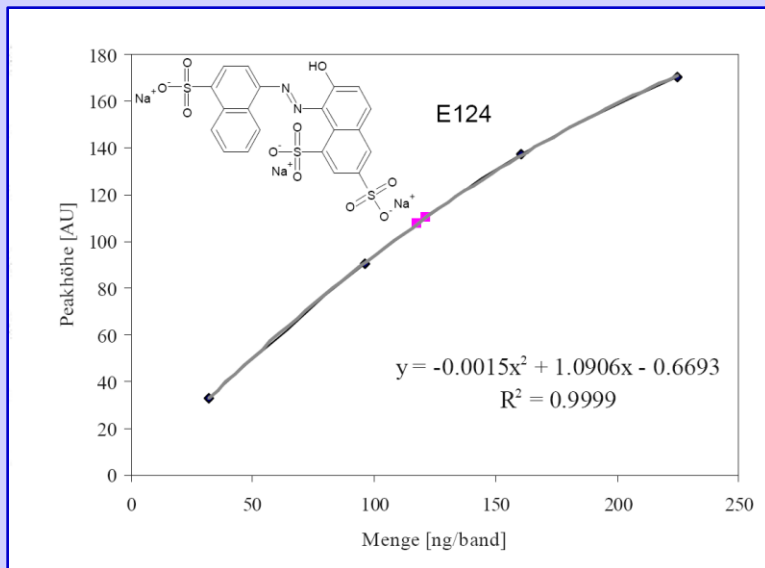
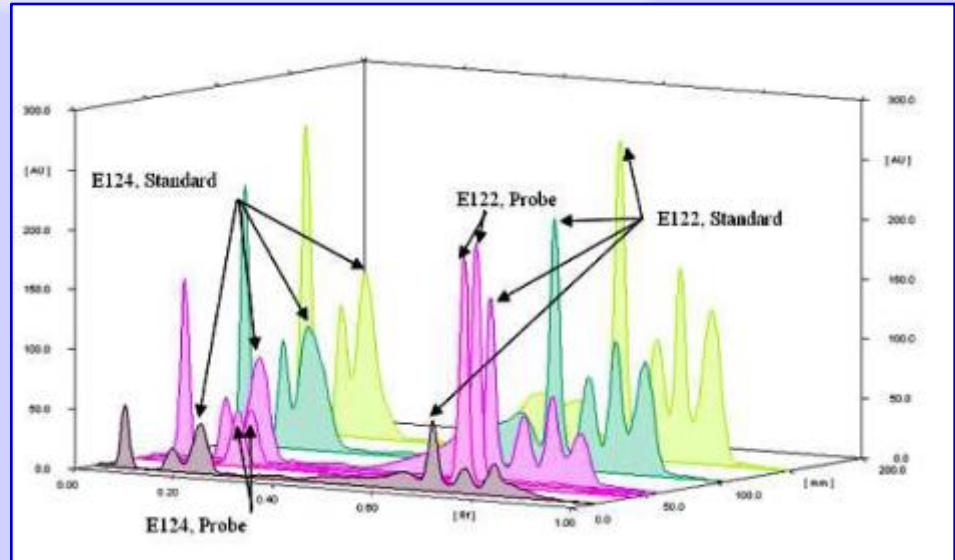
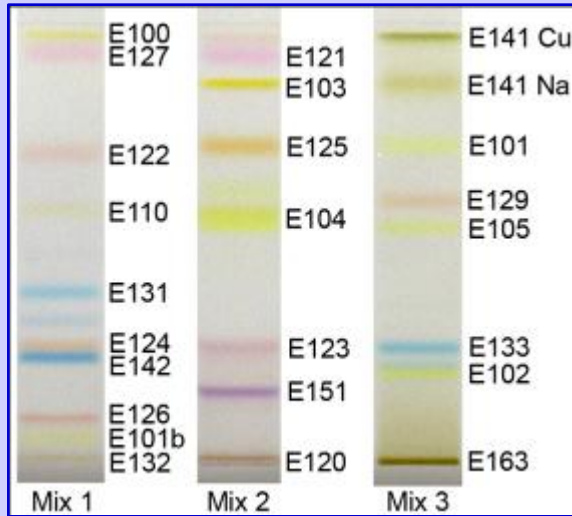
Une pratique courante est de faire une rapide évaluation (HTS screening) en CCM ou HPTLC et de passer ensuite à l'UHPLC (/MS) quand cela devient sérieux.

Si c'est très compliqué on passe même à la LC 2D ce qui ne simplifie rien, au contraire.

Exemple classique à suivre utilisant les deux méthodes (peu d'interactions avec la GC si ce n'est le cannabis ...)



Analyse de colorants alimentaires





Complémentarité méthodes

HPTLC = screening

UPLC = dosage des positifs



Sample	Dyes found	Concentration calculated	%RSD (n=2)	Identity	
				Spectra correlation (400–800 nm) of standard and sample	Mass signal(s) (full scan, m/z 100–900)
Bakery ink formulation	122	66.4 g/L	0.0	≥ 0.99996	228 [M-2Na] ²⁻
	124	13.3 g/L	2.1	≥ 0.99957	279 [M-2Na] ²⁻
					178 [M-3Na] ³⁻
Energy drink 1	133	9.1 mg/L	0.1	≥ 0.99964	373 [M-2Na] ²⁻
Energy drink 2	122	76.2 mg/L	3.6	≥ 0.99958	228 [M-2Na] ²⁻

Pourquoi s'arrêter là?



Complémentarité méthodes ?

Ou
concurrence

...

Operating costs/run (€)	HPLC ¹	HPTLC ²
Mobile phase	0,58	0,003
Stationary phase	0,64	0,11
Disposal	0,04	0,0001
Sum	1,26	0,11
		=> 11 x lower

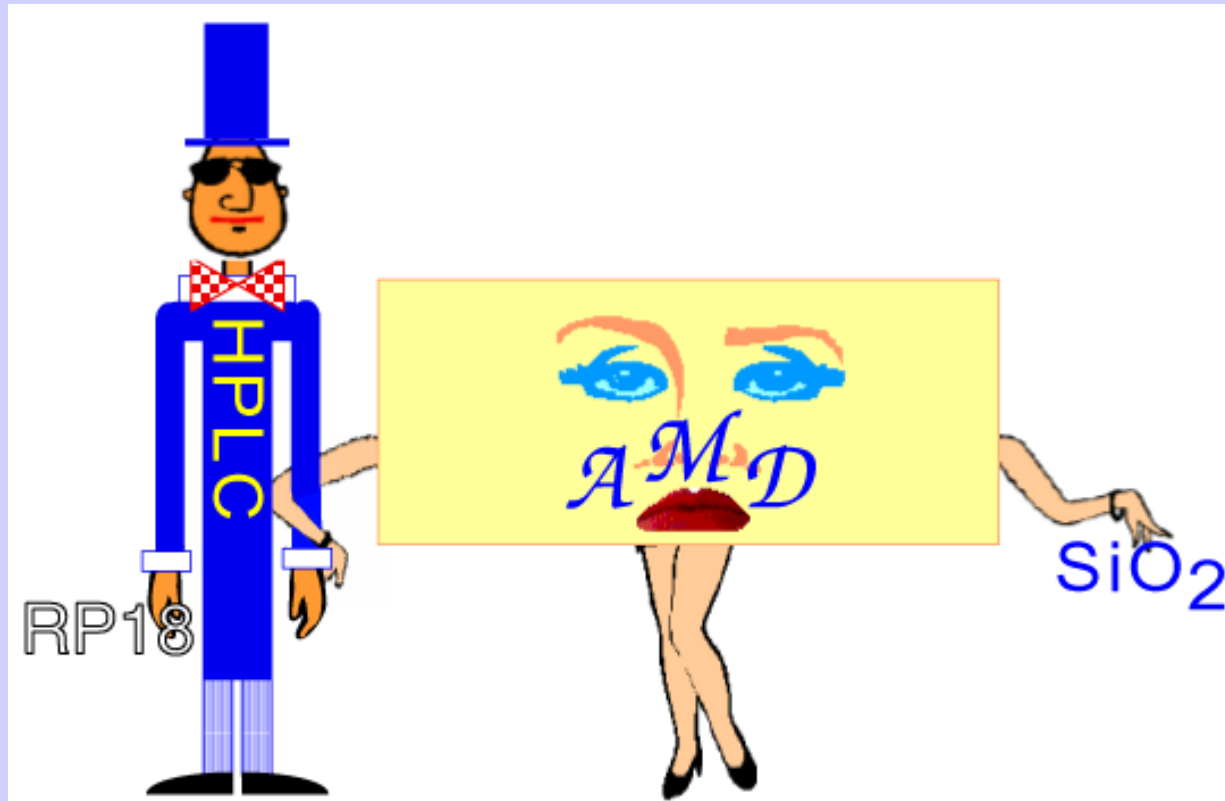
Time/run (min)	HPLC	HPTLC
Application/Injection		0,50
Run time	43	0,20
Detection		0,10
Sum	43	0,80
		=> 54 x faster

labor time/40 runs	none	5 min
--------------------	------	-------

¹K. Miniotti et al., *Anal Chim Acta* 583 (2007) 103–110

²G. Morlock, C. Oellig, *J AOAC Int* 92 (2009) 547-554

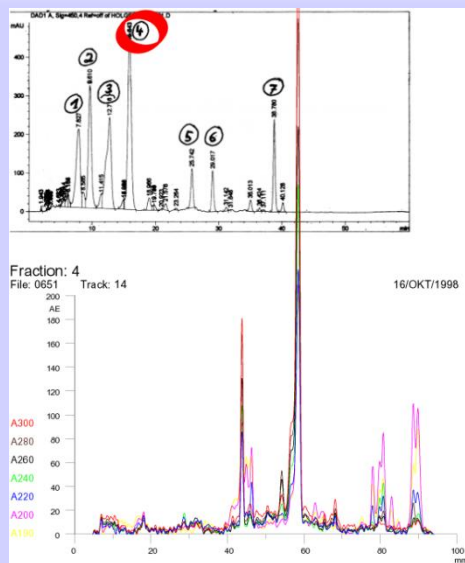
Et le couplage ?



la Silice est aussi **complémentaire** de la RP grâce à l'AMD
(Klaus Burger, DuoChrom Camag, 1990')



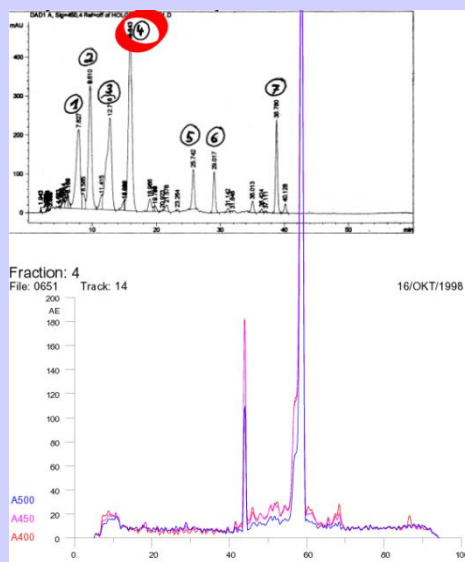
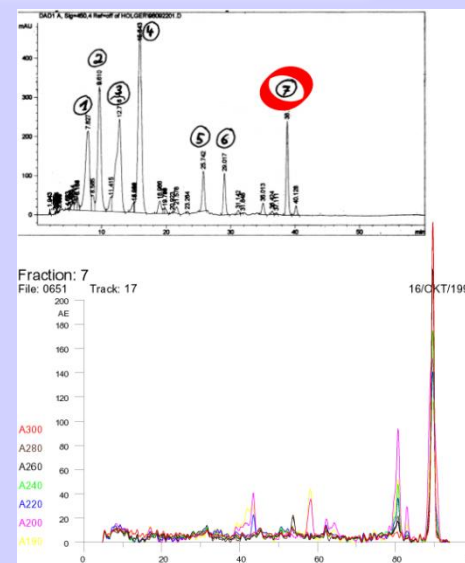
L'HPTLC pour vérifier les pics HPLC



HPLC gradient RP18

HPTLC AMD Silice

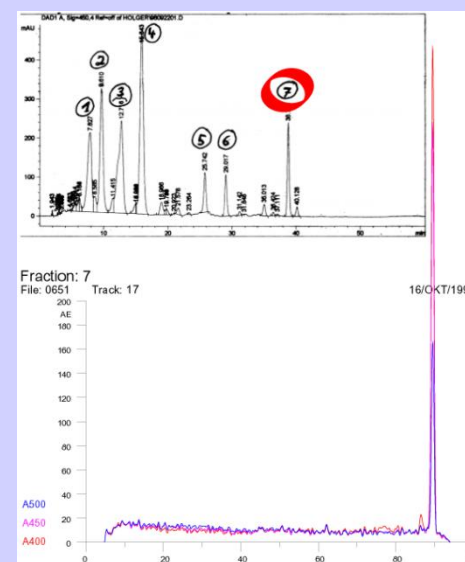
UV



HPLC gradient RP18

HPTLC AMD Silice

Visible



(from Klaus Burger
Private communication)

Le choix répondant à la question



Dans certains cas le choix est trivial mais pas toujours évident à imposer... selon la culture analytique de l'entreprise

Dans d'autres cas le choix est imposé réglementairement

Méthode imposée , mais attention / screening préalable / orthogonalité

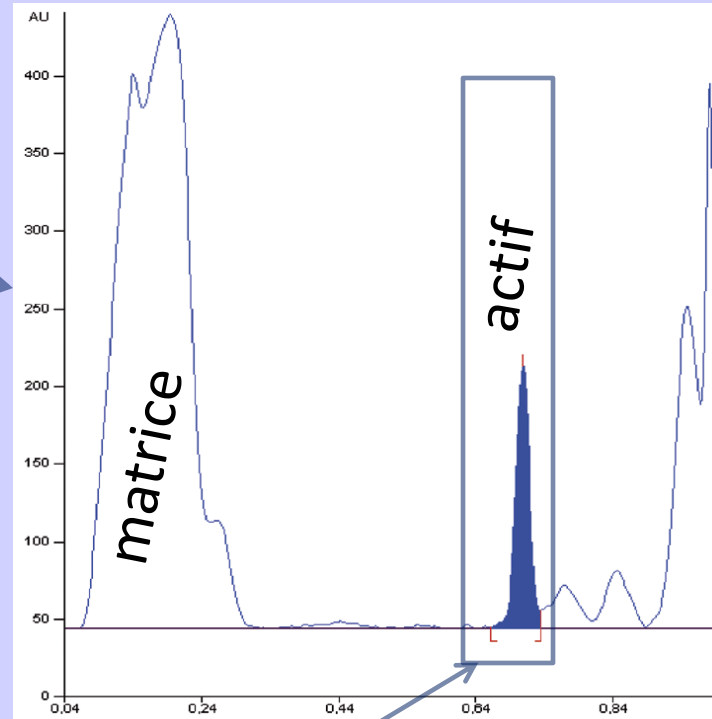
Pas d'HPTLC par principe, et on passe tout en UPLC MS car :
1 c'est plus rapide, et 2 on voit tout (sans commentaires)

Dosage d'un actif dans un extrait naturel de plantes, avec :

en haut, le densitogramme de la **sève d'un rhizome de ginseng brésilien (*Pfaffia glomerata*)**, obtenue par simple pressage à froid.

et **en bas**, la courbe de **calibration entre 40 et 200 ng de β -ecdysone témoin** (sdv=1,6%).

Les standards sont représentés par des **x** et les essais par des **+**

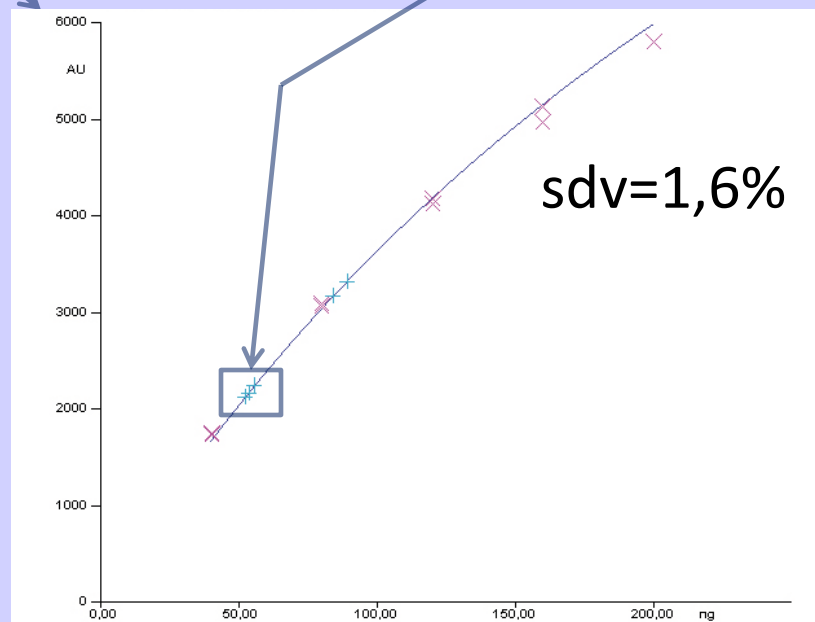


> pas de problème avec la matrice, donc **pas de traitement d'échantillon**, et pas de risque de perte d'échantillon ;

> **détection** du β -ecdysone un stéroïde, facilitée par la **révélation par immersion** à l'anisaldéhyde sulfurique ;

> **méthode rapide, sélective et reproductible** donne une teneur de β -ecdysone entre 0,8 % et 1,2% de l'extrait sec de ginseng

référence : CBS 100, Mme S. Leclere, Bioeurope



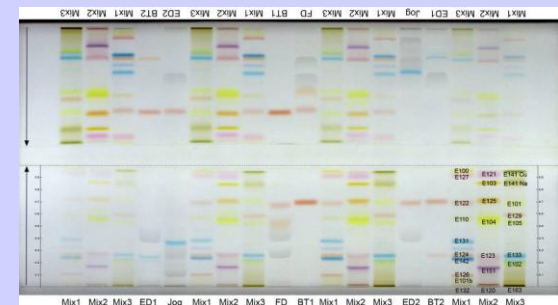
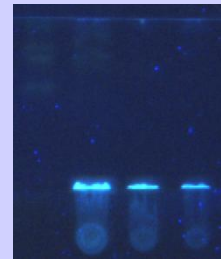
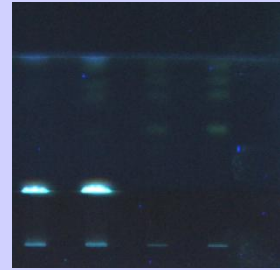
Réglementaire ?

Si l'analyse est **réglementaire**, le choix est limité à la méthode prescrite , ...

Exemple SULFAMIDES dans la viande par JP Abjean, ANSES, car limite de quantification basse, mais seulement 1000/an/France.

Parfois un **screening préalable** à une analyse quantitative, pour identification, comme par exemple les colorants alimentaires.

l'utilisation de l'HPTLC en **méthode orthogonale** serait toujours un plus.

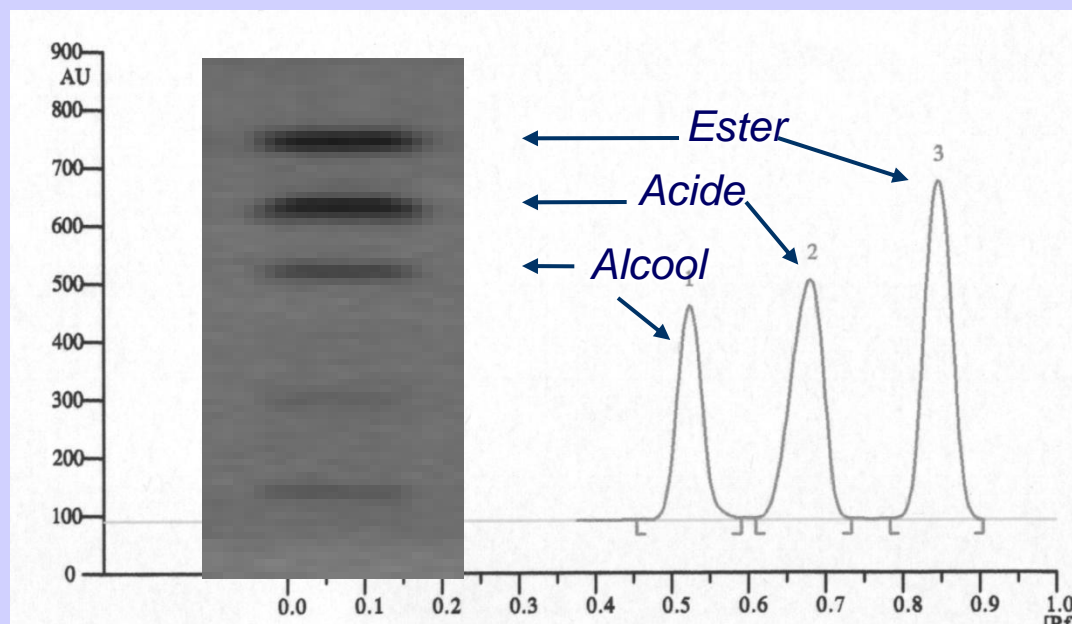


*G. Morlock, C. Oellig, J AOAC Int
92 (2009) 547-554*



Le choix répondant à la question

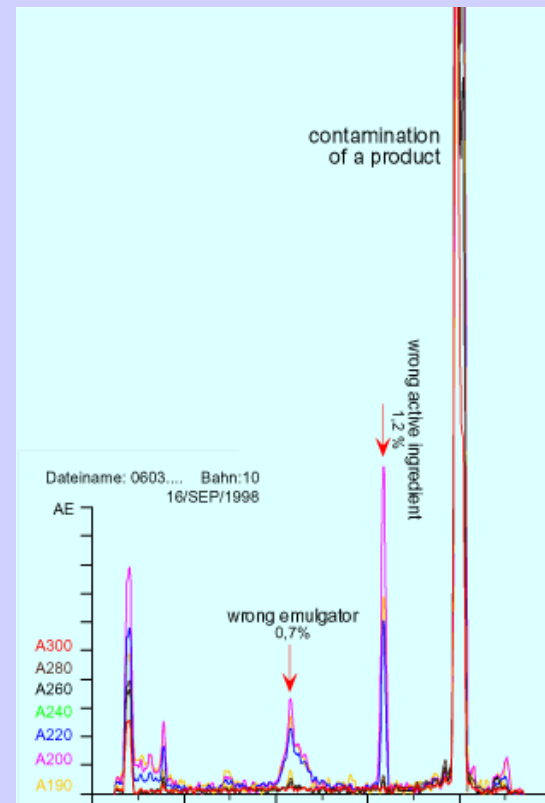
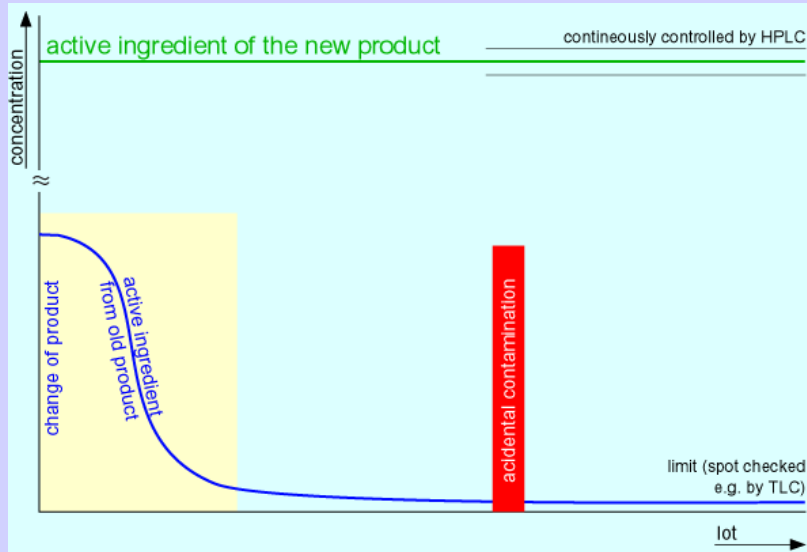
Dans de nombreux choix l'HPTLC serait envisageable, ... ne serait-ce que pour réduire les temps de réponse, et donc les coûts...



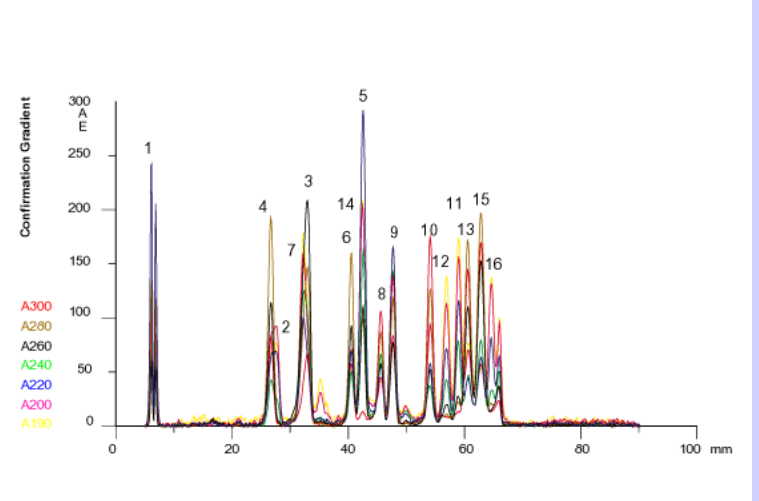
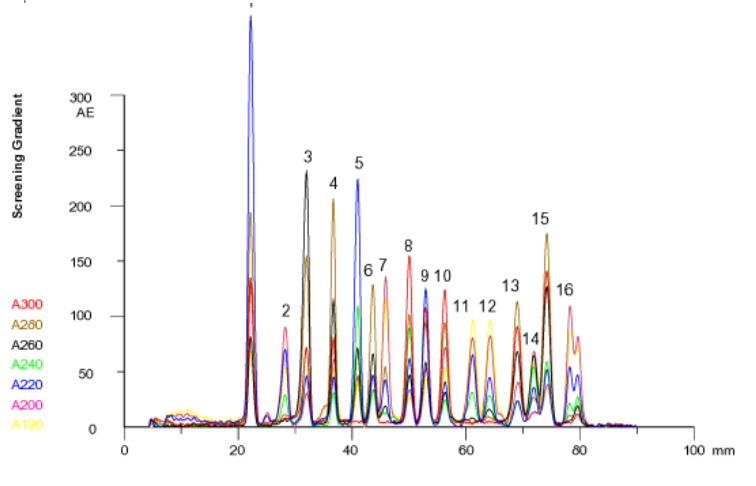
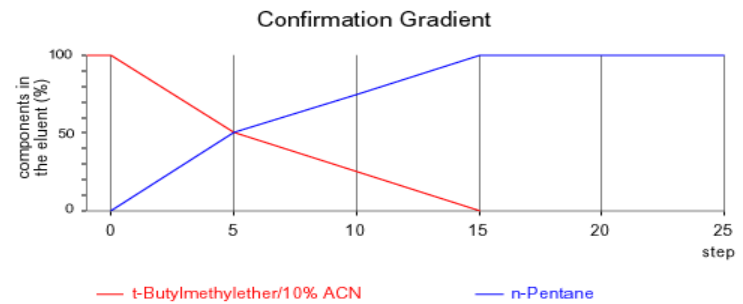
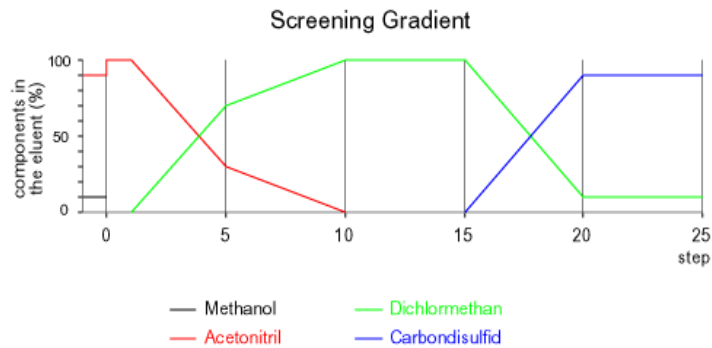
bilan d'estérification plaque CN (Louise Vicard, LAPS, Sanofi Neuville sur Saône)



...un non choix qui peut coûter cher



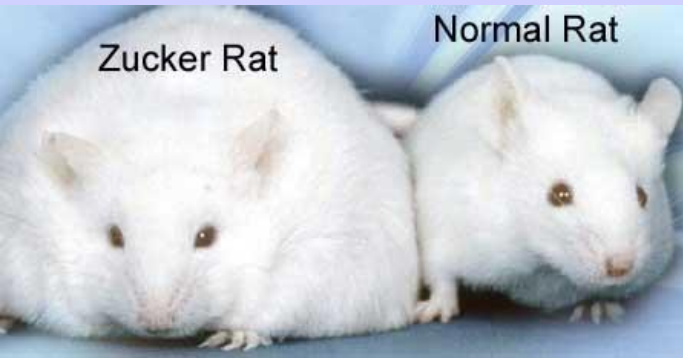
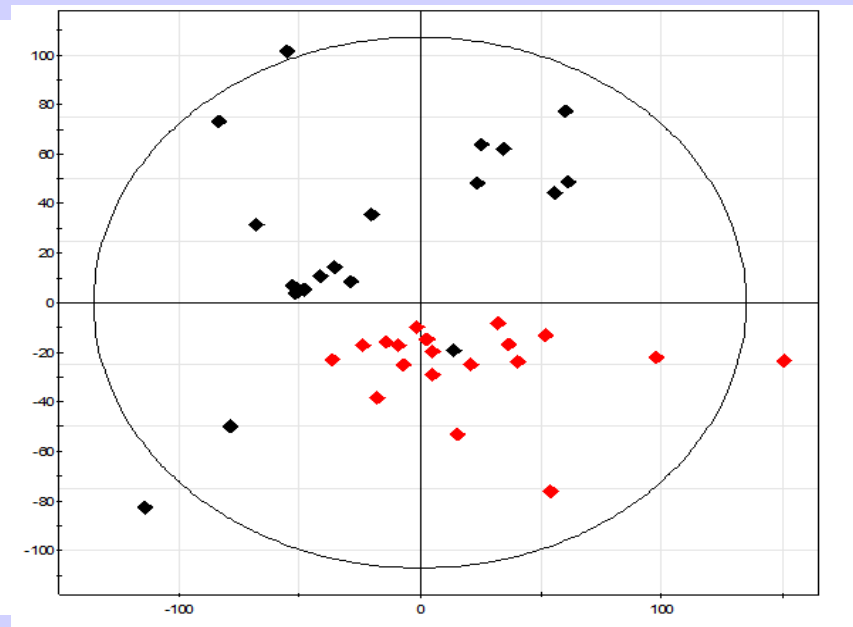
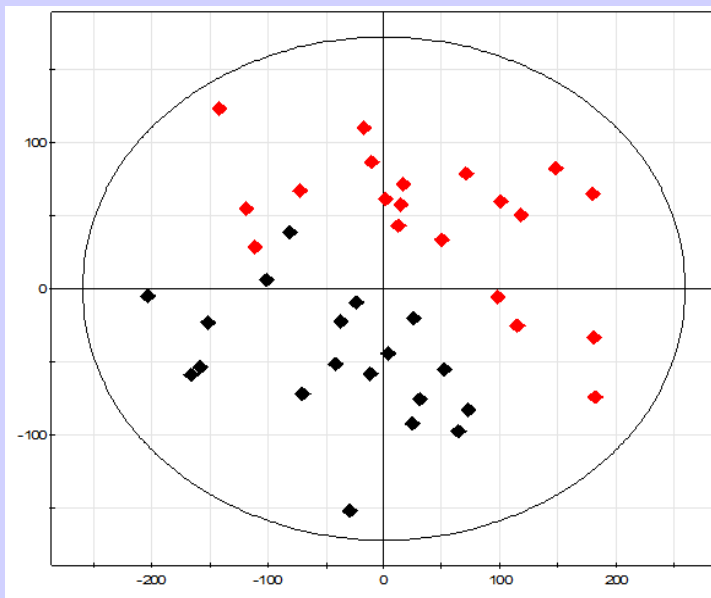
... et une solution made in Germany.





HPTLC:question simple réponse simple

PCA of Zucker rats ... Red = (fa/fa) obese Black = normal



Gika H.G. et al *J. Sep. Sci.*, **32** (2008) 1598

Choix ou pas ? quels domaines ?



API :

Inclus dans Drug Master File ou pas

Largement diffusé pour impuretés, et suivi

Validation de nettoyage

Contrôle en-cours

Mise au point purification

Contrôle de fractions de purification

En général pas de quantification pas de couplage masse
réservé à l'U/HPLC sans raison technique

Mais attention aux dosages PA 100% (HPTLC +/- 2%) OK
pour faibles teneurs

Choix ou pas ? quels domaines ?



BOTANICAL FINGERPRINT:

Méthode de référence

USP : General Chapter <203> « High-Performance Thin-Layer Chromatography

procedure for identification of articles of botanical origin »
et General Chapter <1064> « Identification of articles of botanical origin by High-Performance Thin-Layer Chromatography ».

Littérature abondante (HPTLC association, Application Notes, CBS)

Attention: pas vraiment chromato => à adapter pour la quantification

Choix ou pas ? quels domaines ?



HPTLC est largement diffusée auprès de ceux qui connaissent

COMPETENCES et DIFFUSION de l'information

LIPIDES = phospholipides ad minima

SUCRES = méthode de choix jusqu'à un poids élevé

AUTRES

Sélectivité par détection spécifique (explosifs Griess)

Echantillons avec matrice (bitumes)

Cas particuliers et moutons à 5 pattes (screening HTS / matrice / détections)

Pour quels échantillons à traiter?



Certains échantillons ne sont pas faciles à traiter.
Dans presque tous les cas l'HPTLC apporte un plus

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (1998) 59(6), 363-369
© 1998 Harcourt Brace & Co. Ltd

Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids from human diabetic small arteries and veins by a new TLC method

M. Lecomte,^{1*} M. Claire,^{2*†} M. Deneuille,² N. Wiernsperger¹

¹The Diabetic Microangiopathy Unit, LIPHA-INSERM U352, INSA-Lyon, 69621 Villeurbanne Cedex, France

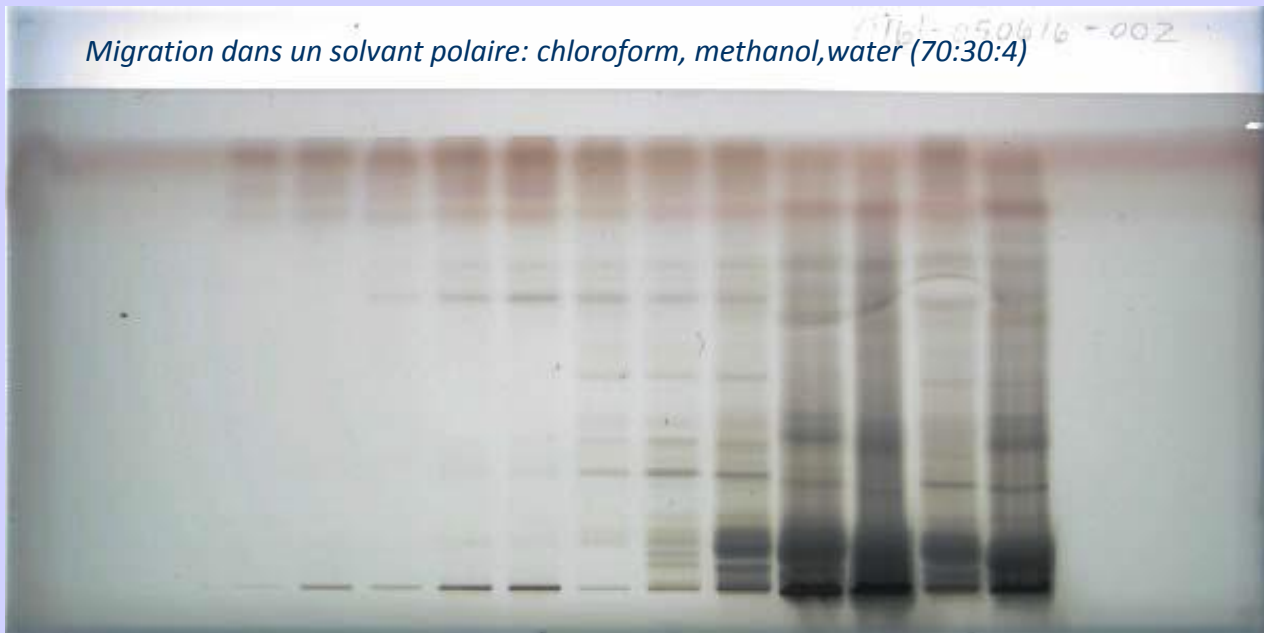
²INSERM U359, CHRU, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

Summary It has been suggested that lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) may play a role in the pathogenesis of diabetic complications. To test this hypothesis, we aimed to compare PUFA composition of small arteries and veins (< 500 μ m diameter) obtained from diabetic or non-diabetic Guadeloupean patients undergoing arterio-venous shunt surgery before renal dialysis.

Small forearm subcutaneous vessels were analysed by a new TLC method which involved inclusion of vascular biopsies directly in alveoles made in the TLC gel and lyophilization onto the plate. The TLC plate was then chromatographed and lipids were both extracted and eluted during this step. Fatty acid composition of phospholipid and neutral lipid fractions were determined. Similar fatty acid composition was obtained for arteries and veins from diabetic or non-diabetic subjects. In phospholipids from diabetic vessels, major changes consisted of a 20% decrease of arachidonic acid (20:4 n-6), a 40% decrease of its elongation product 22:4 n-6 and 30% increase of 18:2 n-6. In neutral lipids, 20:4 n-6 was also diminished by 60% whereas oleic acid increased by 15%.

This loss of arachidonic acid in small diabetic vessels suggests impaired Δ 6-desaturase forming 20:4 n-6 or alternatively increased peroxide formation, in the vascular wall of small vessels in diabetic patients.

L'extraction est importante



NE L'OUBLIONS PAS !

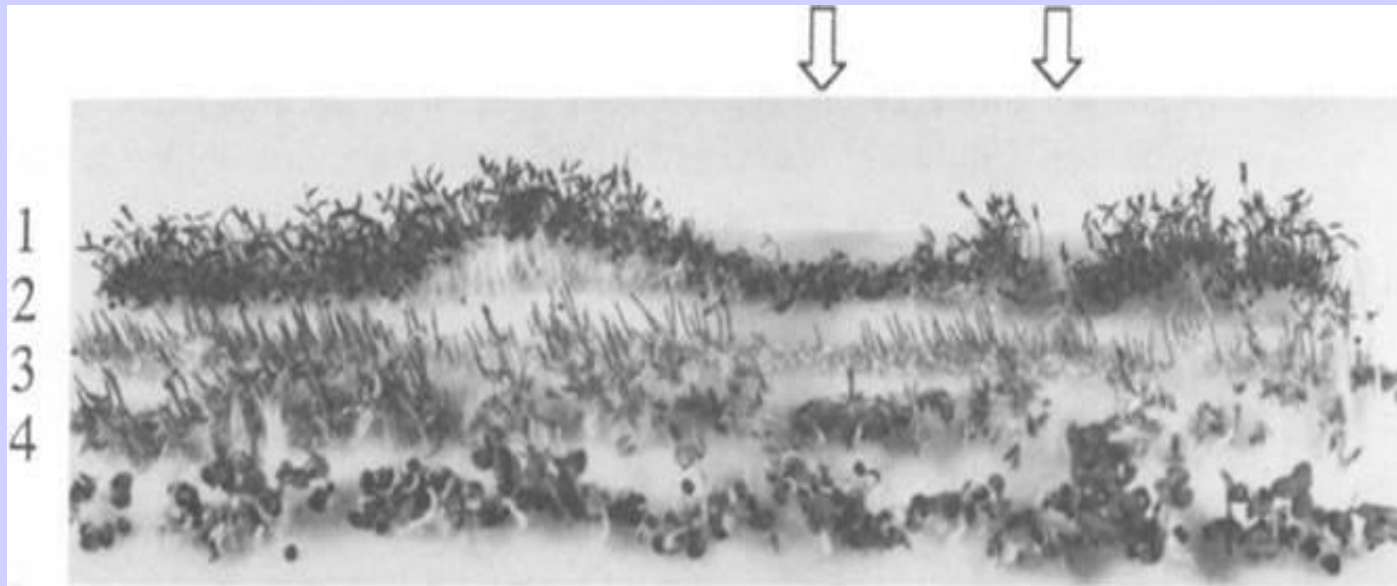
Solvants d'extraction: 1: heptane; 2: toluene; 3: MTBE; 4: DCM; 5: chloroform; 6: acetone; 7: ethanol; 8: methanol; 9: ethanol-water(7:3); 10: methanol-water (8:2); 11: methanol-acetic acid (9:1); 12: methanol-ammonia 25% (8:2).

(que l'échantillon soit connu, ou pire inconnu !...)



Et l'imagination aussi...

anthraquinone and naphthoquinone derivatives proved to be potent germination inhibitors using this TLC bioassay (Meyer & coll. 2007)



Growth inhibition TLC bioautographic assay of fractions from *Polygonum sachalense* (5 days). Arrows point to areas of inhibited plant activity. (1) green amaranth, (2) timothy grass, (3) crab grass, (4) Chinese cabbage.

Les compétences les équipements

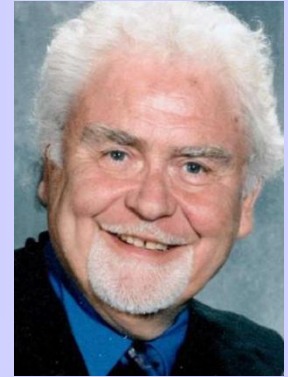
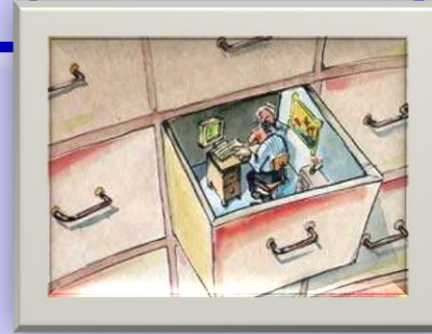


Toujours un facteur considérable (le clou et le marteau)

Malheureusement dans les deux cas les freins sont nombreux

Faisable, possible ou pas (A.Hyaluronique, colorants gas-oil)

Les compétences les équipements



“Most people approach TLC with feeling rather than with knowledge, with the inevitable consequence of haphazard results and disorientation about TLC’s real potential.”

F.Geiss, Fundamentals of TLC (1987)

“... Modern developments in this area, and the accuracy and precision obtainable in TLC are not well known to many workers in the field...”

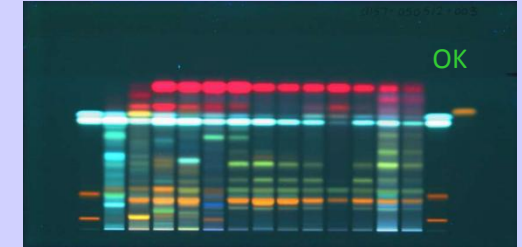
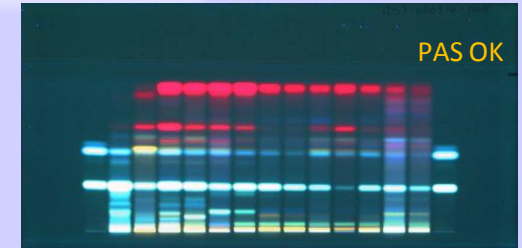
*U.A.Th.Brinkmann
TrAC8(1989)*

Compétences et méthodologie

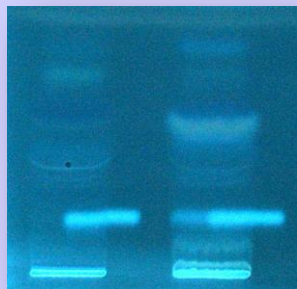


S'il s'agit de répondre à une question...
la **méthodologie** et les **compétences**
sont déterminantes !

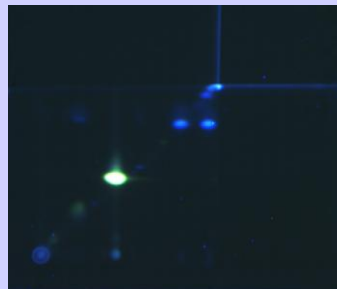
- 1 détection sélective ou universelle
- 2 gamme de travail correspondante
entre LOQ (Eurachem) et perte de sensibilité
- 3 sélectivité de séparation avec ou sans AMD
- 4 certaines vérifications simples



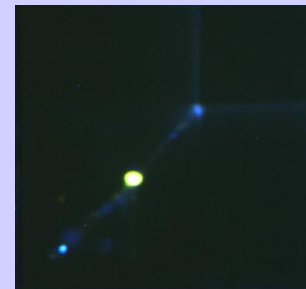
*Eike Reich, CAMAG Laboratory
pour le Club de CCM, Avril 2015*



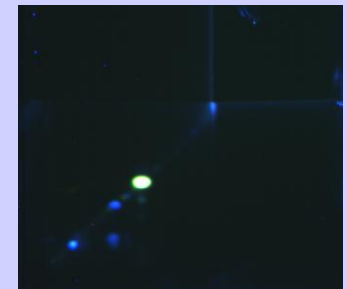
*G. Morlock, C. Lemo J. Chromatogr.
A 1324 (2014) 215–223*



*Pharmacopée
Chinoise*

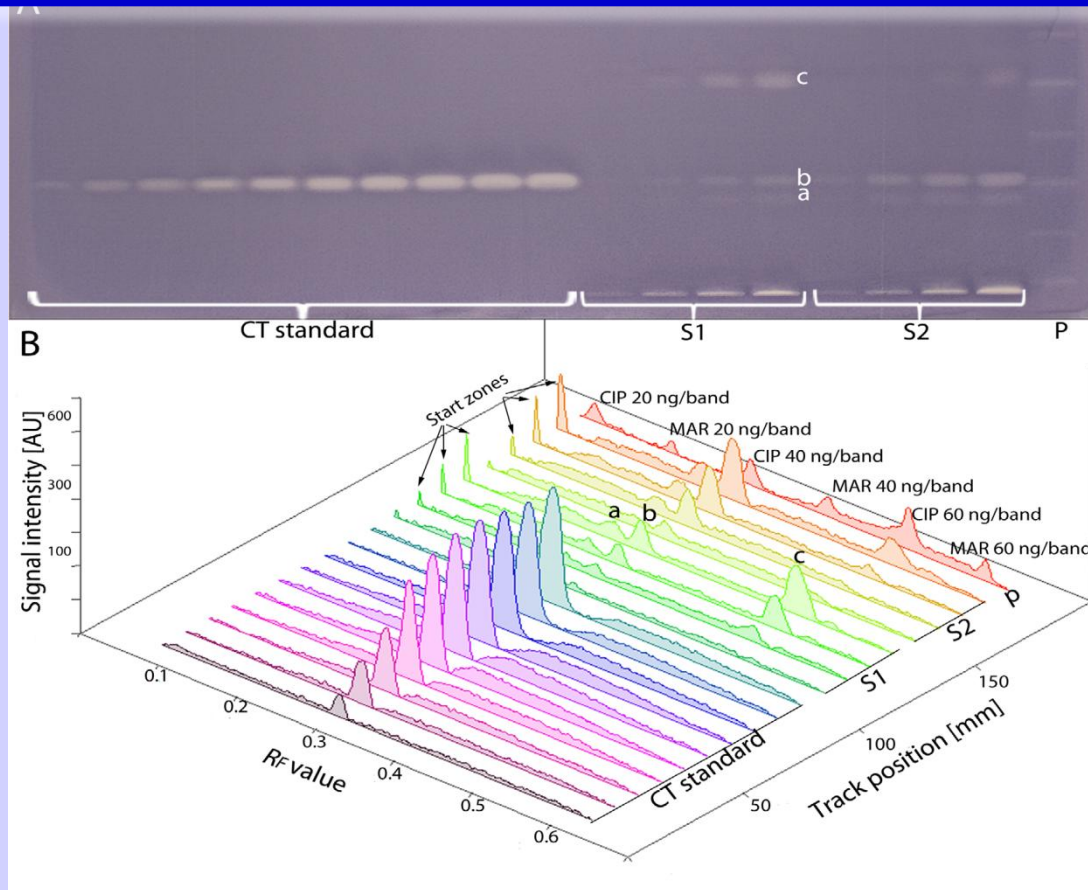


Méthode CAMAG



Pharmacopée US

Importance des compétences !



HPTLC-B. subtilis bioautograms documented under white light illumination (A) for the bioprofiling of substances a–c in the two different *S. multiarrhiza* samples (S1, S2), CT standard (20–200 ng/zone), and a positive control pattern of ciprofloxacin (CIP) and marbofloxacin (MAR) (20, 40, and 60 ng/zone each) applied on the edge track (P); respective biodensitograms recorded by inverse scanning at 546 nm (B).

Importance des compétences !



Sur les inhibiteurs d'AchE: comparaison de quelques nanogrammes de références extraites de *Peucedanum ostruthium L.* à gauche et quelques picogrammes de témoins d'organochlorés ci-dessous



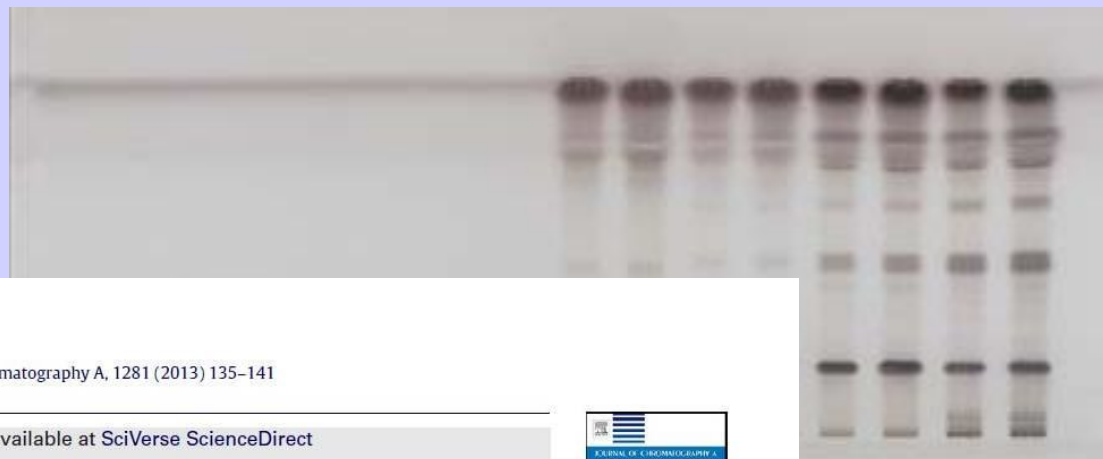
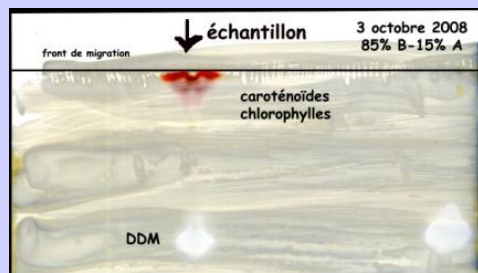
Akkad R., Schwack W., *Journal of Planar Chromatogr.* 21 (2008) 411-415

(avec un facteur d'environ 1000 en sensibilité)



On est là pour ça...

Lipides pariétaux de complexe RCLH1 PufX, monomère et dimère de protéine membranaire de bactérie pourpre (CEA, Colette Jungas)



Journal of Chromatography A, 1281 (2013) 135–141



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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



A new high-performance thin layer chromatography-based assay of detergents and surfactants commonly used in membrane protein studies

Laurie-Anne Barret^{a,b,c,d,e}, Ange Polidori^{d,e}, Françoise Bonneté^{d,e}, Pierre Bernard-Savary^f, Colette Jungas^{a,b,c,*}

^a CEA, IBEB, Lab Bioenerget Cellulaire, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France

^b CNRS, UMR 7265 Biol Veget & Microbiol Environ, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France

^c Aix-Marseille Univ, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France

^d Université d'Avignon et des pays du Vaucluse, Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, 33 rue Louis Pasteur, F 84000 Avignon, France

^e Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS-Universités Montpellier 1&2, 15 avenue Charles Flahaut, F-34093 Montpellier Cedex 05, France

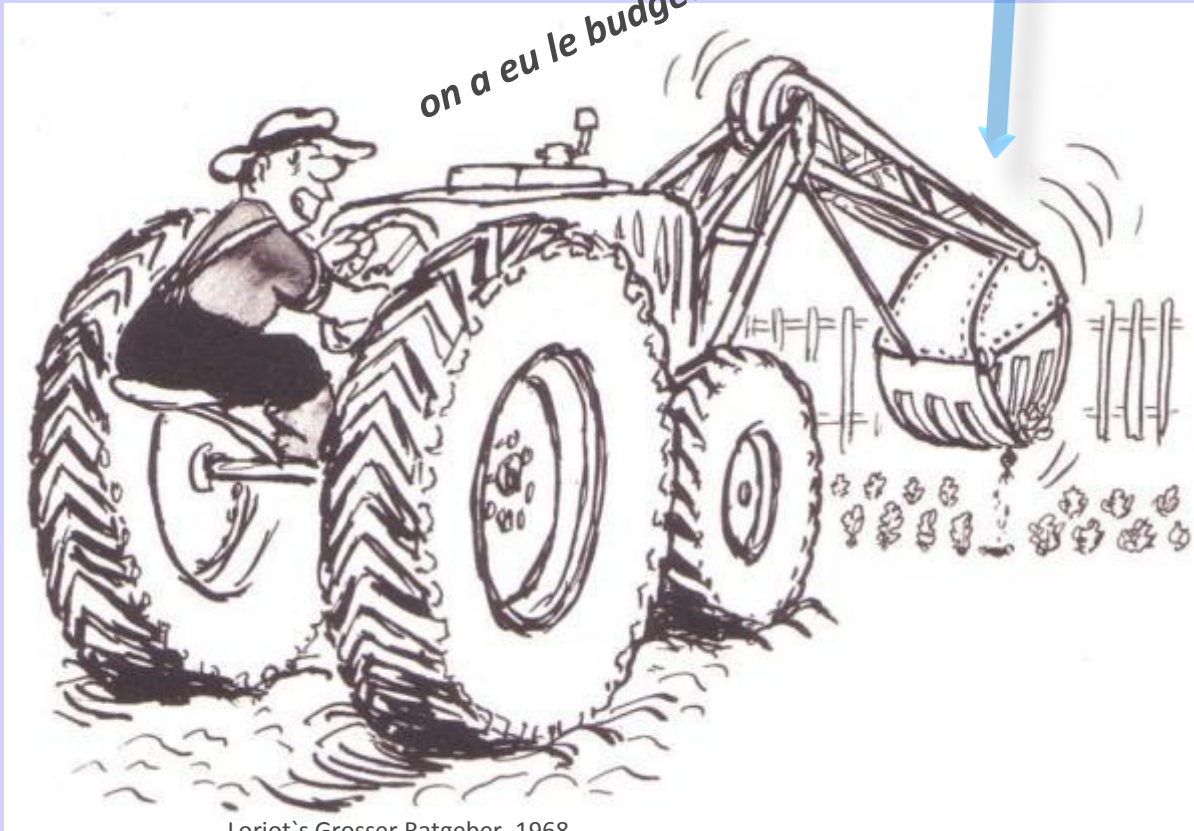
^f Chromacim SAS, l'Ancienne église, F-38340 Pommiers la Placette, France



Matériel : pas n'importe quoi !

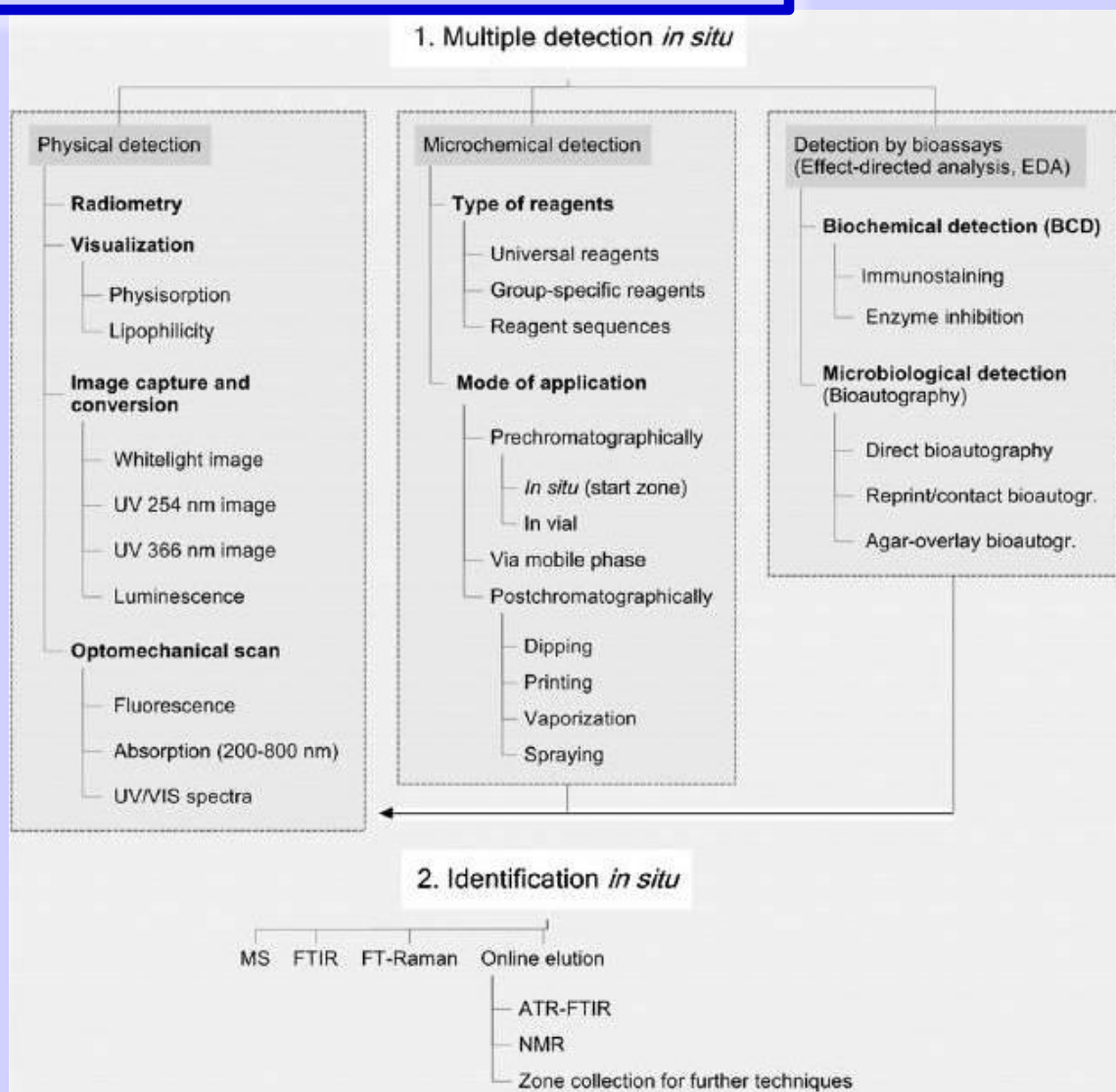
Pour des radis ???

on a eu le budget !!!



Loriot's Grosser Ratgeber, 1968

quels couplages HPTLC





Review

Hyphenations in planar chromatography



- 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].

Gertrud Morlock*, Wolfgang Schwack

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

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 20 May 2010

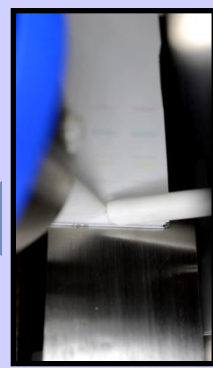
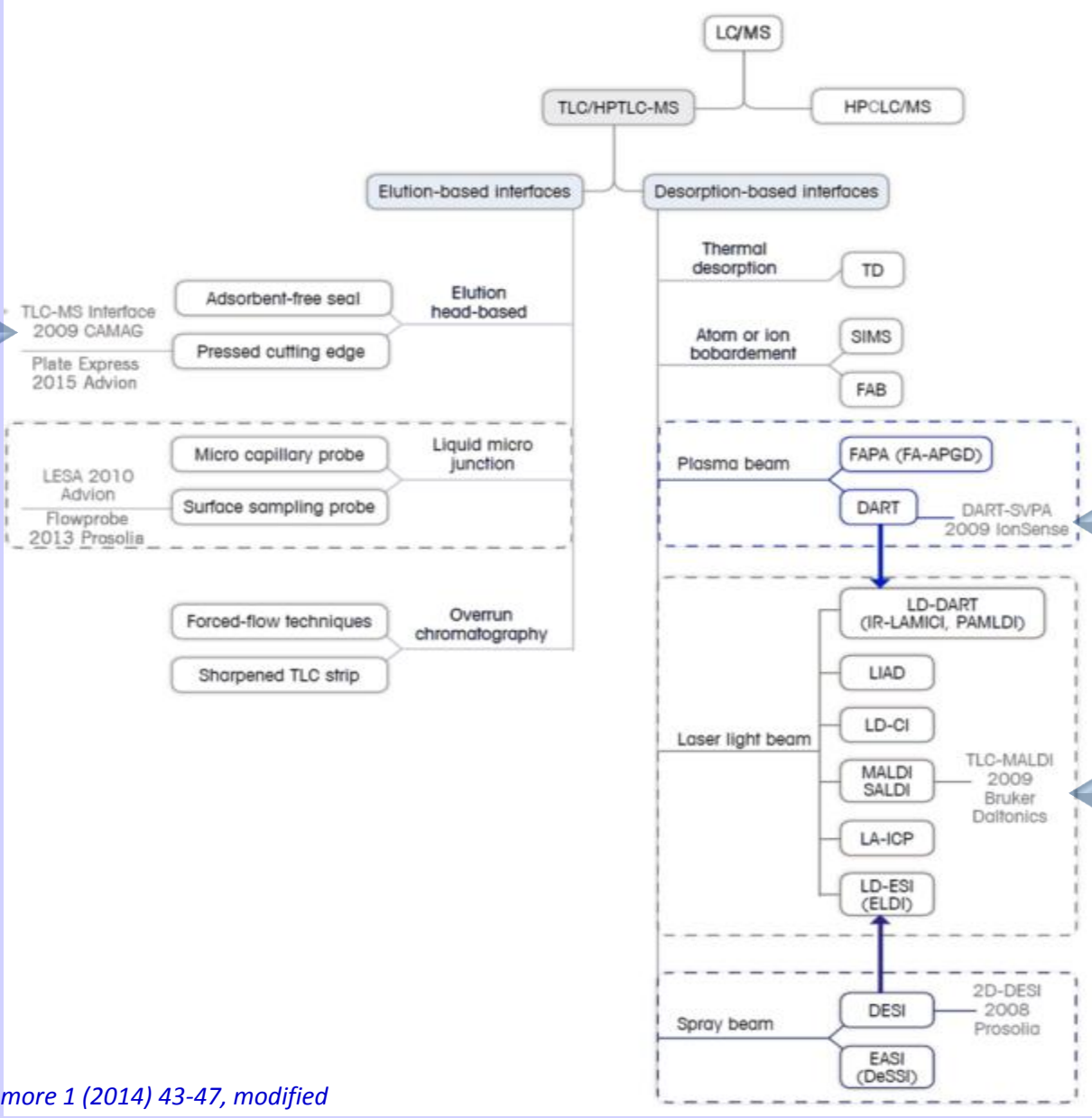
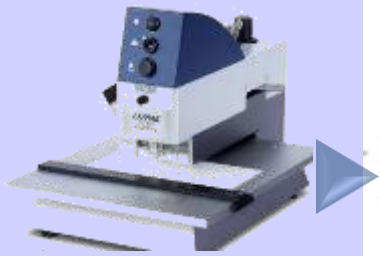
Keywords:
Mass spectrometry
High-performance thin-layer chromatography
Effect-directed analysis
Bioassays
Cost-effective analysis
High-throughput system

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 planar format valuably assist separation scientists.

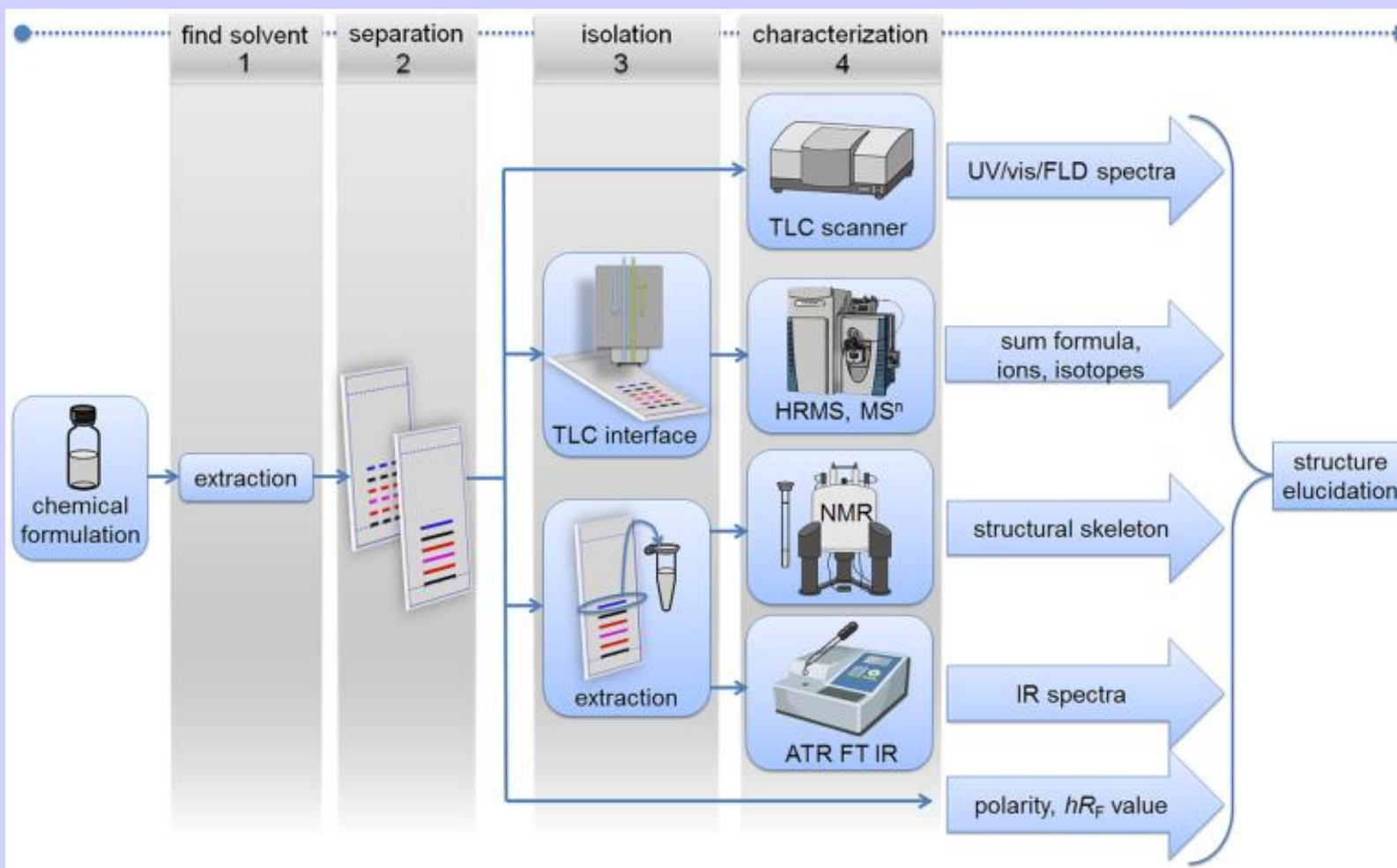
© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

*“with U/HPLC, after separation, samples go to the waste; with HPTLC, after separation, samples remain on the dried plate”
(G.Morlock, HPTLC’11)*





Elucidation structurale en 2 plaques





En conclusion

Questions : dans quels cas utilise-t-on l'HPTLC, l'U/HPLC, la GC /... /avec MS RMN EDA ... ?

-avec un équipement dans le labo

-à partir de quel critère (bon ou mauvais) la méthode est-elle choisie ? 1ère ou 2ème intention. Donne rapidement une réponse simple, fiable et économique.

-sans équipement dans le labo

-à partir de quelle durée d'amortissement peut-on envisager un investissement ? Classiquement 5 ans, en pratique 2 ans, souvent beaucoup moins car règle un problème immédiatement.



Pour en savoir plus :

**HPTLC
2017**

INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR HIGH-
PERFORMANCE THIN-LAYER
CHROMATOGRAPHY
JULY 4-8th
BERLIN GERMANY
www.hptlc.com

info@hptlc.com

CLUB de CCM à PARIS 18-19 Octobre 2017
HPTLC ASIA à BANGKOK 28-30 Novembre 2018
HPTLC USA à BOULDER Co 26-28 Septembre 2019
HPTLC Europe à LUBJIANA Slovénie

Et bien-sûr, Forum Labo Lyon, ...nous y serons !

CBS
CAMAG BIBLIOGRAPHY SERVICE

119
SEPTEMBER 2017

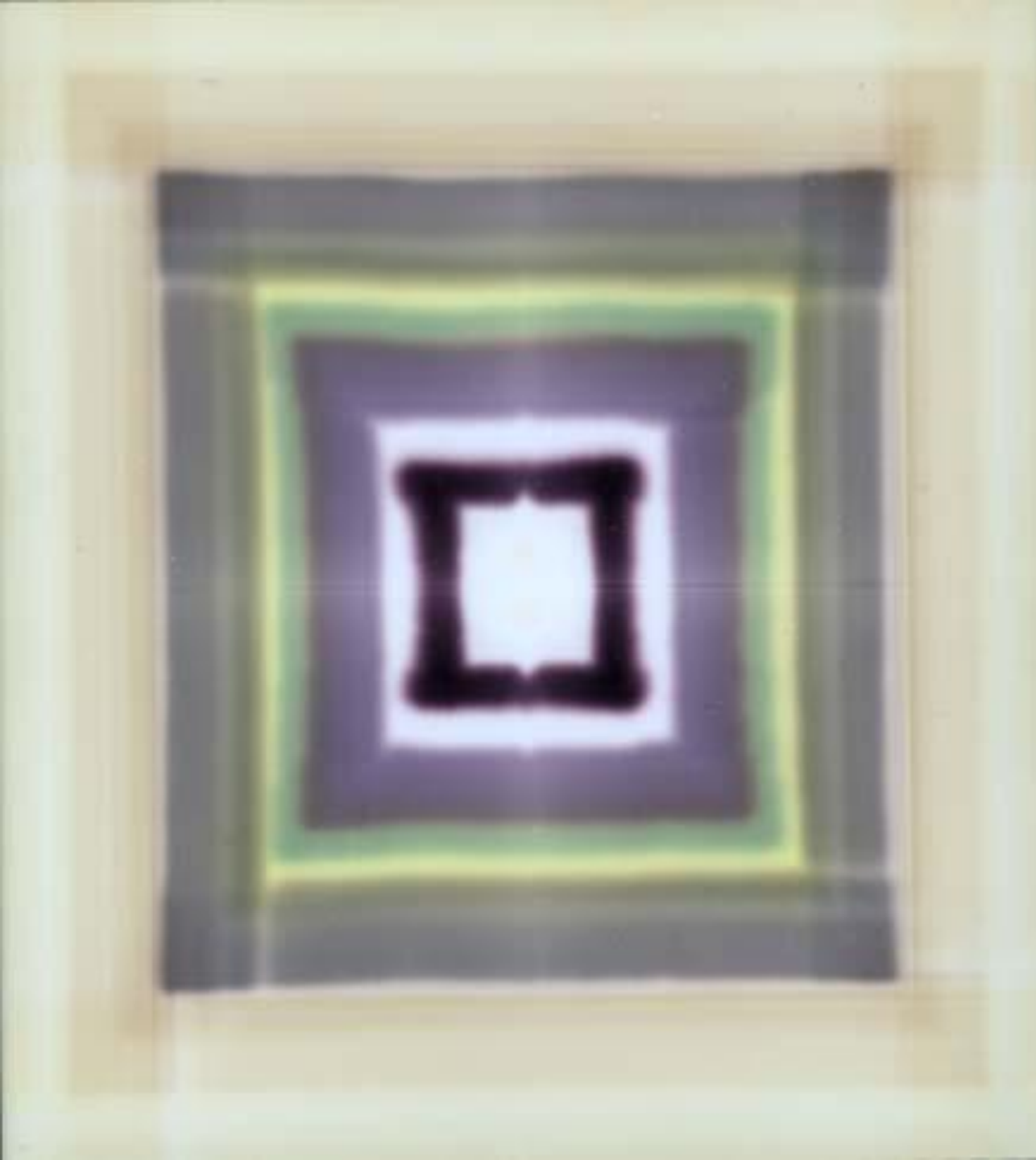
CBS 119 • SEPTEMBER 2017

CAMAG BIBLIOGRAPHY SERVICE PLANAR CHROMATOGRAPHY

Comparison of different derivatization techniques

Other topics of this issue:
Ricinic acid as marker for *Secale comutum* impurities
Quantification of steviol glycosides
Bitter acids in hops
Tetrahydrocannabinol in Cannabis

CAMAG® WORLD LEADER IN PLANAR CHROMATOGRAPHY



“Chromart” by Herbert Halpaap in 1986-1987