

Comment optimiser les compétences d'étudiants utilisateurs de (HP)TLC-MS en libre-service



Lætitia Bailly
laetitia.bailly@insa-rouen.fr
8 novembre 2018

I- Introduction

- Présentation du laboratoire COBRA
- Présentation du tremplin Carnot I2C

II- Chromatographie couche mince

- Un peu de théorie
- Un peu de rappels
- Un peu de CCM

III- Le couplage au labo

- Calcul des masses
- Découverte du détecteur
- Environnement CCM
- Le protocole du thésard
- Quelques exemples

IV- Conclusion



Laboratoire de Chimie Organique, Bioorganique, Réactivité et Analyse

Unité mixte de recherche 6014 CNRS, INSA de Rouen,
Université de Rouen <http://www.lab-cobra.fr/>

140 personnes

11 chercheurs CNRS

51 enseignants-chercheurs

20 personnels techniques et administratifs

4 contractuels techniques et administratifs

70 doctorants et post-doctorants



Normandie Université

5 équipes de recherche

Analyse et modélisation, 16EC H. Oulyadi

Chimie bio-organique, 11EC-3C P-Y- Renard

Synthèse de molécules fluorées, 7EC-3C X. Pannecoucke

Organométalliques et ultra hautes pressions, 4EC-3C J. Maddaluno

Hétérocycles, 13EC-2C V. Levacher





Tremplin Carnot I2C : Innovation Chimie Carnot

8 laboratoires de recherche normands

CERMN ; université Caen Normandie

COBRA ; CNRS, INSA Rouen Normandie, université Rouen Normandie

GlycoMev ; université de Rouen Normandie

LCMT, CNRS, ENSICAEN, université de Caen Normandie

LDM-TEP ; CEA, CNRS, université de Caen

PBS ; CNRS, INSA de Rouen Normandie, université de Rouen Normandie

SMS ; université de Rouen Normandie

URCOM ; université de Havre



synthèse, analyse et formulation polymères

<http://www.instituts-carnot.eu/fr/institut-carnot/i2c>



I- Introduction

- Présentation du laboratoire COBRA
- Présentation du tremplin Carnot I2C

II- Chromatographie couche mince

- Un peu de théorie
- Un peu de rappels
- Un peu de CCM

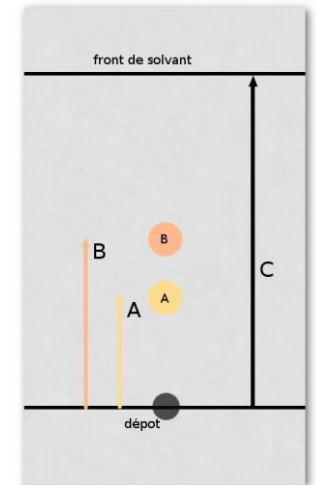
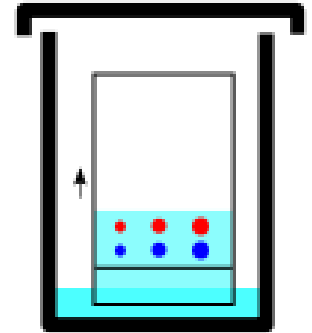
III- Le couplage au labo

- Découverte du logiciel
- Environnement CCM
- Le protocole du thésard
- Quelques exemples

IV- Conclusion

Migration « la théorie »

- Cuve saturée
- Solution à étudier diluée
- Dépôt de taille minimale
- $R_f \sim 0,3-0,4$
- $R_f = \text{hauteur du spot} / \text{hauteur de migration}$
- Mesure de ΔR_f



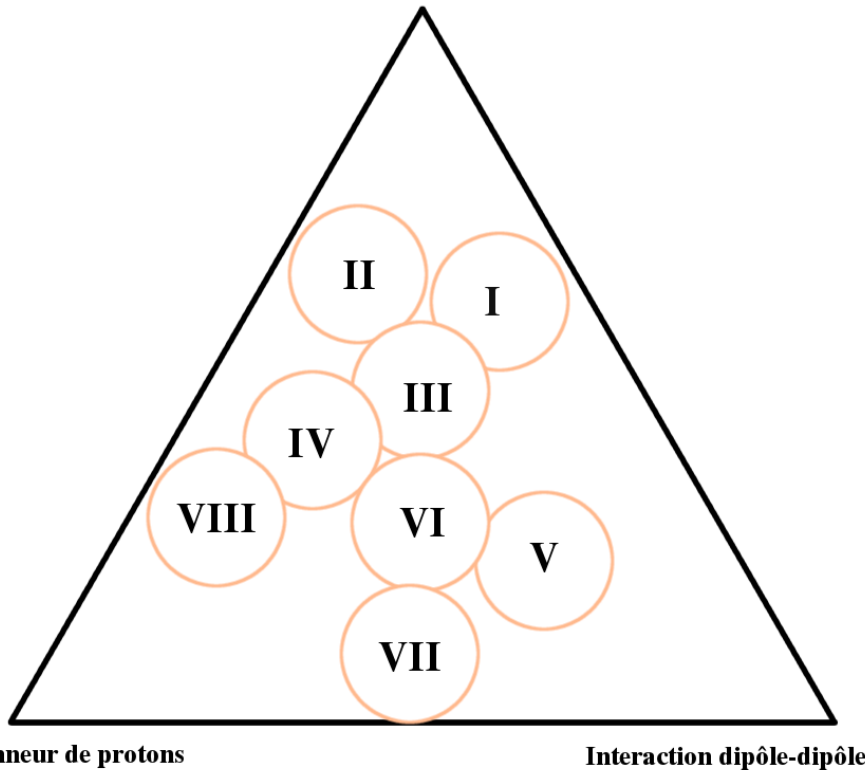
Un peu de théorie

Migration « in real life »

- peu onéreux
- disponible
- recyclable
- plusieurs parfums!



Accepteur de protons



Groupe de Selectivité	Solvant	Indice de polarité p'
	Ether de pétrole (essence G), C5-C6	0,0
	Cyclohexane	0,0
I	Ether de méthyl et tertiobutyle (MTBE)	2,7
I	Ether diéthylique	2,8
II	Propan-2-ol	3,9
II	Propan-1-ol	4,0
II	Ethanol	4,3
II	Méthanol	5,1
III	Tétrahydrofurane (THF)	4,0
III	Diméthylformamide (DMF)	6,4
IV	Acide acétique	6,0
V	Dichlorométhane	3,5
VI	Acétate d'éthyle	4,4
VI	Acétone	5,1
VI	Acétonitrile	5,8
VII	Toluène	2,4
VIII	Chloroforme	4,1
VIII	Eau	10,2

Quelques rappels Force d'éluotion, série éluotropique

Solvant	Force d'éluotion
Méthanol	0,70
Ethanol	0,68
Acétonitrile	0,52
Acétate d'éthyle	0,48
Acétone	0,43
<u>THF</u>	0,35
Dichlorométhane	0,32
Ether diéthylique	0,30
Cyclohexane	0,04
Ether de pétrole (essence G), C5-C6	0,0

Exemple de calcul

Dichlorométhane/Méthanol : 98/2
 $(0,32 \times 0,98) + (0,70 \times 0,02) = 0,33$

Ether de pétrole/ether diéthylique : 90/10
 $(0,0 \times 0,90) + (0,3 \times 0,10) = 0,03$

Ether diéthylique/Acétate d'éthyle : 85/15
 $(0,3 \times 0,85) + (0,48 \times 0,15) = 0,33$

Molécule non polaire

Ether de P/Ether
 Ether de P/ AcOEt
 Ether de P/DCM

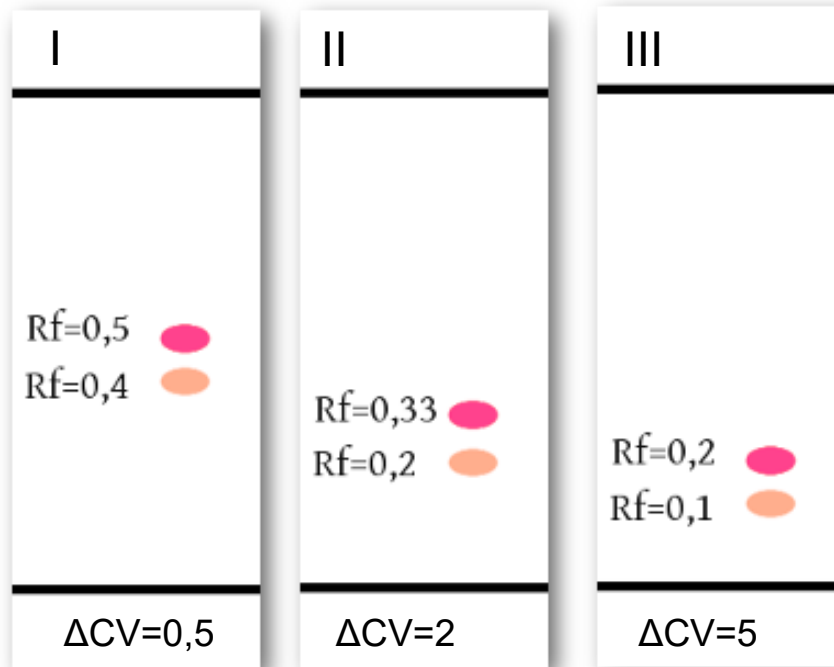
Molécule polaire

AcOEt/MeOH
 Ether/MeOH
 DCM/MeOH
 + additif DEA, TEA...

$$CV = 1/R_f \quad \Delta CV = 1/R_{f1} - 1/R_{f2}$$

- plus le R_f est petit, plus le CV est grand

- placer le composé d'intérêt assez bas



3 exemples de cas

I - peu de rétention, peu de résolution

II – bonne rétention et résolution

III – trop de rétention, résolution élevée

I- Introduction

- Présentation du laboratoire COBRA
- Présentation du tremplin Carnot I2C

II- Chromatographie couche mince

- Un peu de théorie
- Un peu de rappels
- Un peu de CCM

III- Le couplage au labo

- Calcul des masses
- Découverte du détecteur
- Environnement CCM
- Le protocole du thésard
- Quelques exemples

IV- Conclusion

Calcul des masses

- Rappel sur le calcul des masses

- la masse d'une molécule est l'addition des masses molaires atomiques des éléments qui la constitue
- les isotopes, atomes d'un même élément qui contiennent un même nombre de protons mais un nombre différent de neutrons

- exemple du chlore

17 est le numéro atomique

35 et 37 le nombre de masse



Nombre atomique	Nombre de masse	Nombre de neutrons	Masse isotopique	Abondance en %	Abondance relative
17	35	18	34,97	75,8	100
17	37	20	36,97	24,2	32,5

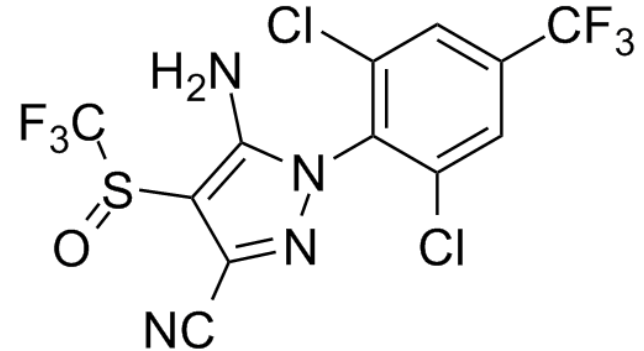
Masse moyenne pondérée du chlore :

$$(0,758 \times 34,97) + (0,242 \times 36,97) = 35,454 \text{ uma}$$

Calcul des masses

- Exemple avec le fipronil

- structure du fipronil
- formule brute
- poids moléculaire, masse moyenne
- massif isotopique



Chemical Formula: $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$

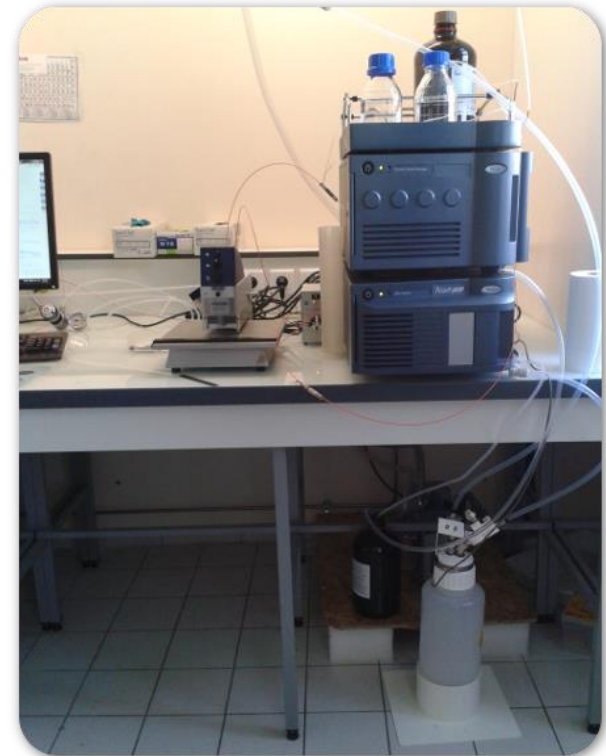
Molecular Weight: 437,1478

m/z: 435,9387 (100,0%), 437,9358 (63,9%), 436,9421 (13,0%), 439,9328 (10,2%), 438,9391 (8,3%),
437,9345 (4,5%), 439,9316 (2,9%), 436,9357 (1,5%), 440,9362 (1,3%)

Découverte du détecteur de masse

Acquity QDa

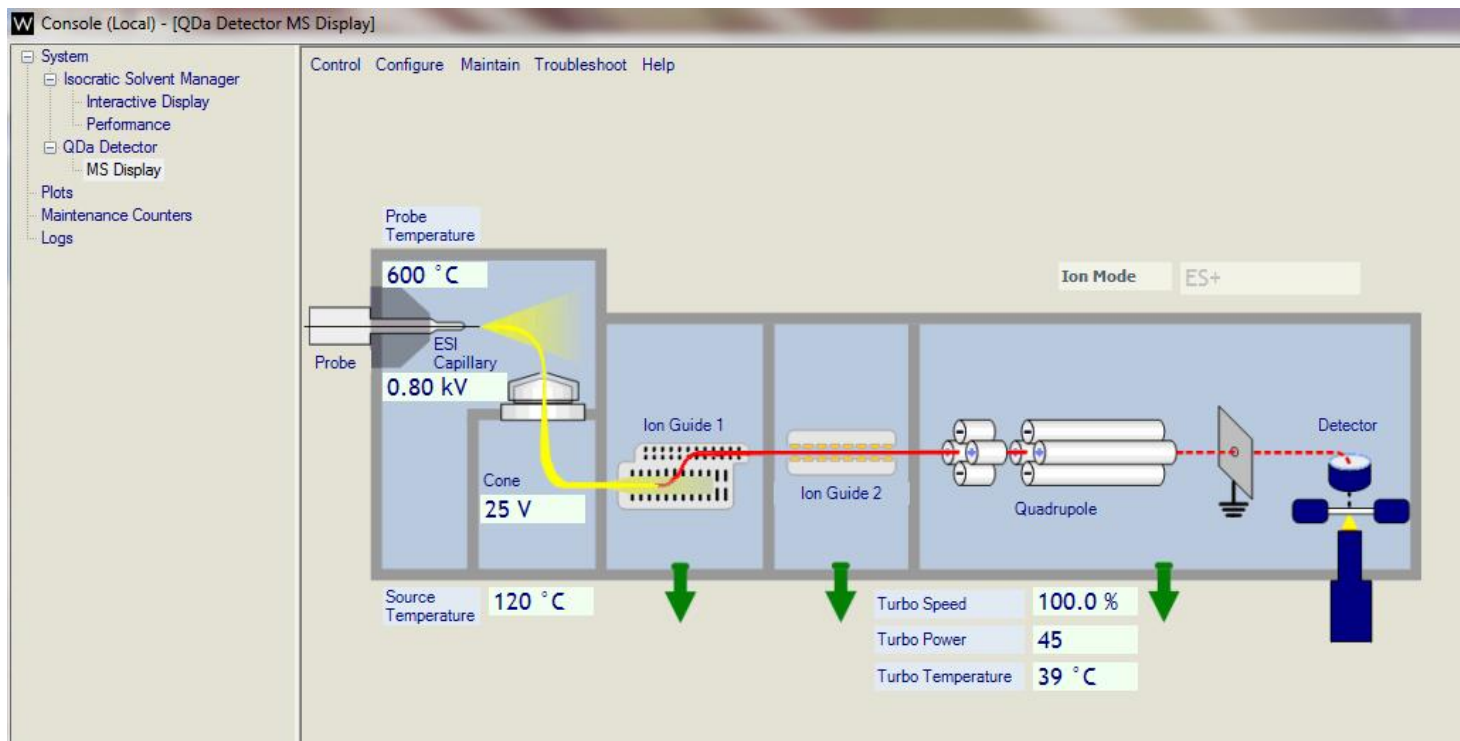
- système Acquity
- modèle « enhanced performance »
- Interface 2 Camag
- logiciel MassLynx



Découverte du détecteur de masse

Schéma du détecteur

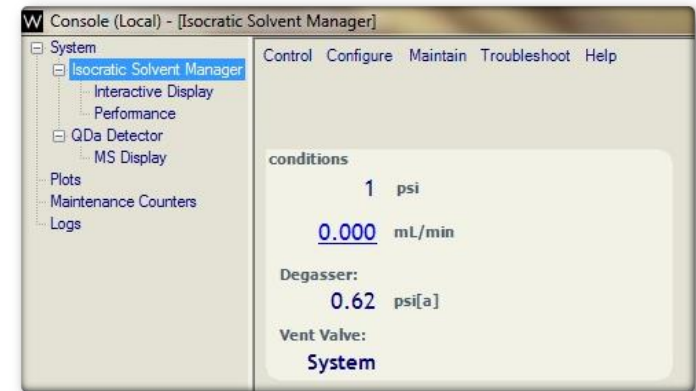
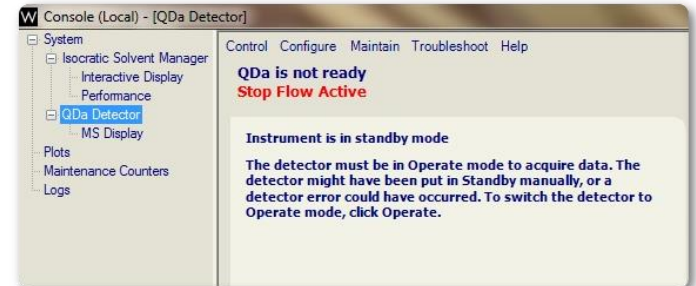
- système Acquity



Découverte et démarrage du logiciel MassLynx

Allumage du matin

- Vérification des gaz
- Ouverture MassLynx et Console
- Mise en « operate » du QDa
- Mise en route de la pompe



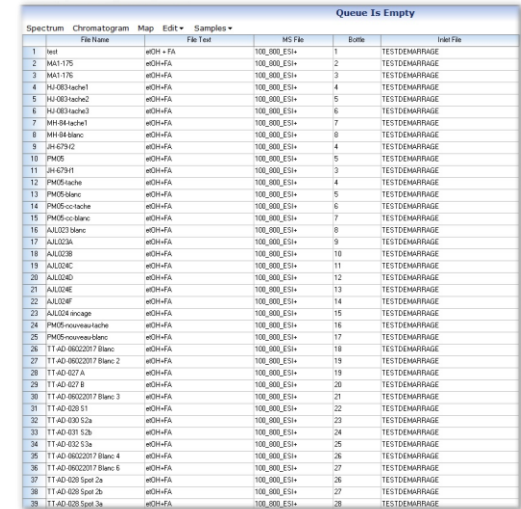
Découverte et démarrage du logiciel MassLynx

- Création de la séquence

- simple et claire, peu de renseignement
- ajouter une ligne dessous
- insérer une ligne dans un groupe

- Création de la méthode

- paramètres facile à comprendre
- gamme de masse
- positif et négatif possible en simultané



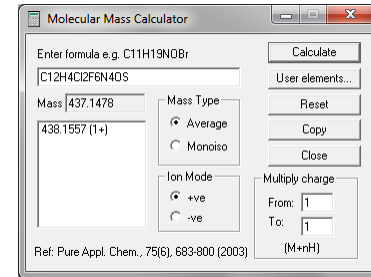
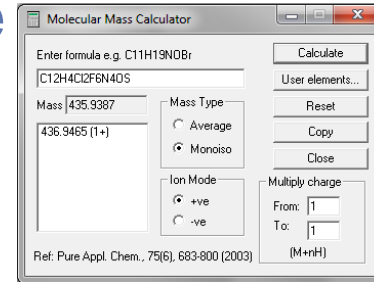
Spectrum	Chromatogram	Map	Edit	Samples	MS File	Bottle	Instr File
1	test	wDH+FA		100_000_ESI+	1	TESTDEMARRAGE	
2	MA1-175	wDH+FA		100_000_ESI+	2	TESTDEMARRAGE	
3	MA1-175	wDH+FA		100_000_ESI+	3	TESTDEMARRAGE	
4	NI-003-tache1	wDH+FA		100_000_ESI+	4	TESTDEMARRAGE	
5	NI-003-tache2	wDH+FA		100_000_ESI+	5	TESTDEMARRAGE	
6	NI-003-tache3	wDH+FA		100_000_ESI+	6	TESTDEMARRAGE	
7	MH4-tache1	wDH+FA		100_000_ESI+	7	TESTDEMARRAGE	
8	MH4-blanc	wDH+FA		100_000_ESI+	8	TESTDEMARRAGE	
9	4-6792	wDH+FA		100_000_ESI+	4	TESTDEMARRAGE	
10	PM05	wDH+FA		100_000_ESI+	5	TESTDEMARRAGE	
11	4-6791	wDH+FA		100_000_ESI+	3	TESTDEMARRAGE	
12	PM05-tache	wDH+FA		100_000_ESI+	4	TESTDEMARRAGE	
13	PM05-blanc	wDH+FA		100_000_ESI+	5	TESTDEMARRAGE	
14	PM05-co-tache	wDH+FA		100_000_ESI+	6	TESTDEMARRAGE	
15	PM05-co-blanc	wDH+FA		100_000_ESI+	7	TESTDEMARRAGE	
16	ALUC2-blanc	wDH+FA		100_000_ESI+	8	TESTDEMARRAGE	
17	ALUC3A	wDH+FA		100_000_ESI+	9	TESTDEMARRAGE	
18	ALUC3B	wDH+FA		100_000_ESI+	10	TESTDEMARRAGE	
19	ALUC3C	wDH+FA		100_000_ESI+	11	TESTDEMARRAGE	
20	ALUC3D	wDH+FA		100_000_ESI+	12	TESTDEMARRAGE	
21	ALUC3E	wDH+FA		100_000_ESI+	13	TESTDEMARRAGE	
22	ALUC3F	wDH+FA		100_000_ESI+	14	TESTDEMARRAGE	
23	ALUC3-incage	wDH+FA		100_000_ESI+	15	TESTDEMARRAGE	
24	PM05-noovear-tache	wDH+FA		100_000_ESI+	16	TESTDEMARRAGE	
25	PM05-noovear-blanc	wDH+FA		100_000_ESI+	17	TESTDEMARRAGE	
26	TT-40-002077-Blanc	wDH+FA		100_000_ESI+	18	TESTDEMARRAGE	
27	TT-40-002077-Blanc 2	wDH+FA		100_000_ESI+	19	TESTDEMARRAGE	
28	TT-40-027 A	wDH+FA		100_000_ESI+	19	TESTDEMARRAGE	
29	TT-40-027 B	wDH+FA		100_000_ESI+	20	TESTDEMARRAGE	
30	TT-40-002077-Blanc 3	wDH+FA		100_000_ESI+	21	TESTDEMARRAGE	
31	TT-40-028 11	wDH+FA		100_000_ESI+	22	TESTDEMARRAGE	
32	TT-40-028 12a	wDH+FA		100_000_ESI+	23	TESTDEMARRAGE	
33	TT-40-028 12b	wDH+FA		100_000_ESI+	24	TESTDEMARRAGE	
34	TT-40-028 12c	wDH+FA		100_000_ESI+	25	TESTDEMARRAGE	
35	TT-40-002077-Blanc 4	wDH+FA		100_000_ESI+	26	TESTDEMARRAGE	
36	TT-40-002077-Blanc 5	wDH+FA		100_000_ESI+	27	TESTDEMARRAGE	
37	TT-40-028 12e	wDH+FA		100_000_ESI+	26	TESTDEMARRAGE	
38	TT-40-028 12e	wDH+FA		100_000_ESI+	27	TESTDEMARRAGE	
39	TT-40-028 12e	wDH+FA		100_000_ESI+	28	TESTDEMARRAGE	



Découverte et démarrage du logiciel MassLynx

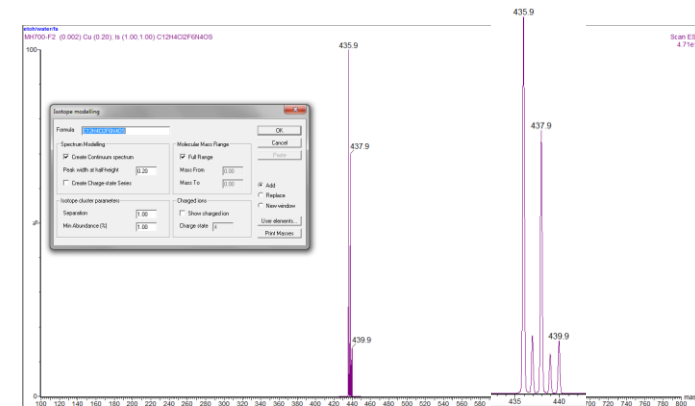
- Simulation de la masse

- calcule la masse moyenne ou exacte
- calcule les multichargés



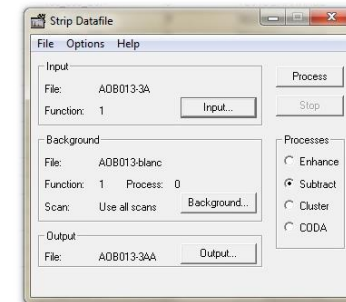
- Modèle isotopique

- tracer un profil isotopique
- possibilité de simuler les adduits



- La fonction « Strip »

- faire un blanc sur la plaque
- soustraction du bruit (solvant + silice)



Le protocole du thésard

RMN

Impossible
à interpréter

OK

Traitement

Abandon

TLC-MS

Produit final

Identification
des composés

Quelques exemples

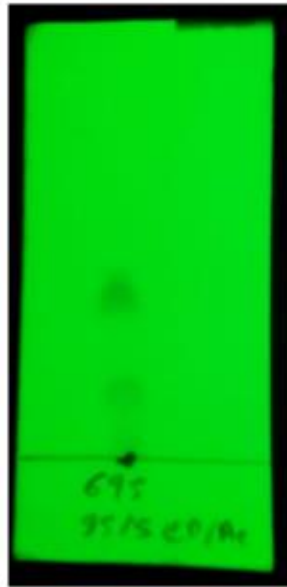
Détermination de sous-produits de réaction

- RMN pas concluante
- Pas de différenciation en CCM

CCM : 95/5 EP/AcOEt 3h de réaction :



CCM Marquée



Révélation UV



Révélation Ninhydrine



Révélation KMnO₄

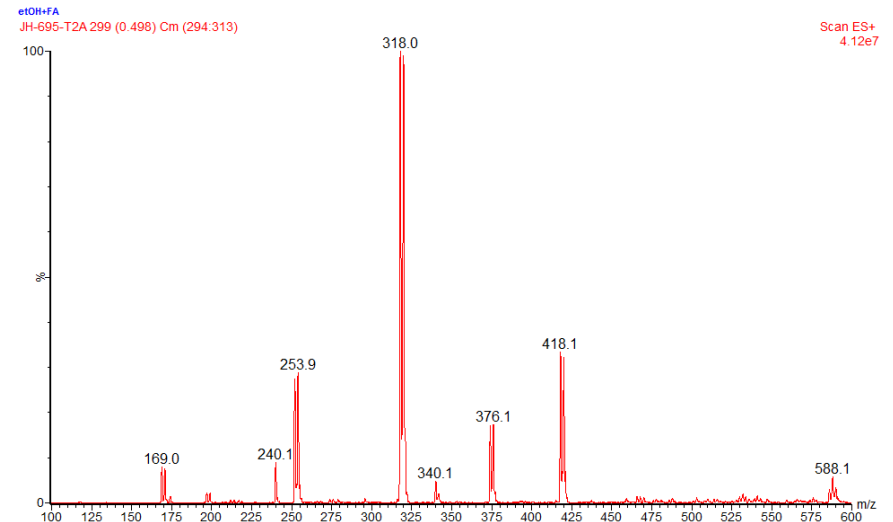
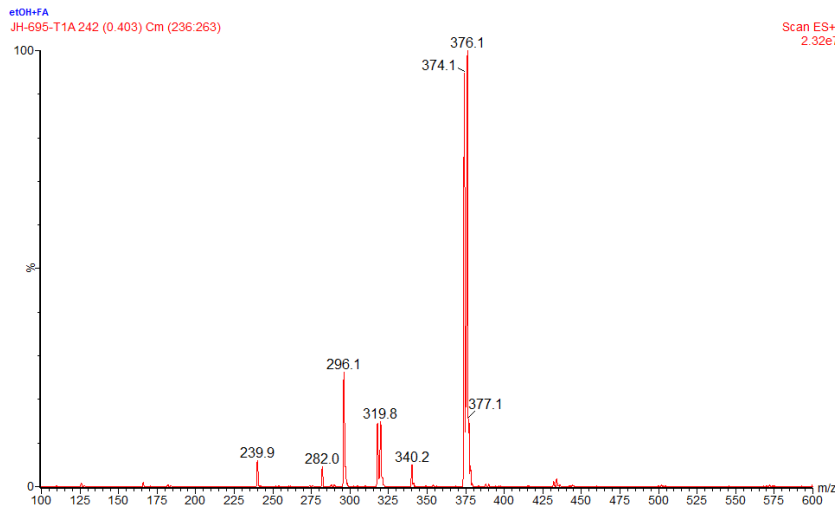
Quelques exemples

Détermination de sous-produits de réaction

2 taches analysées

Tache 1 : composé d'intérêt, élue en premier

Tache 2 : composé inconnu, ne sera pas purifié



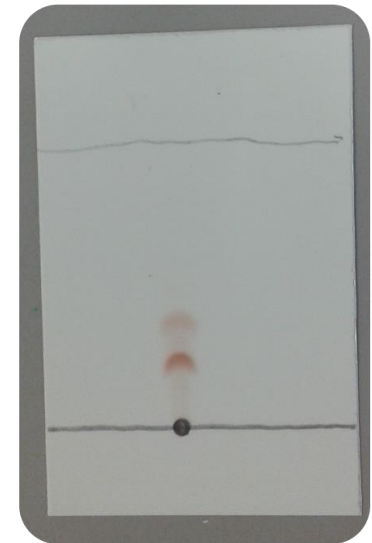
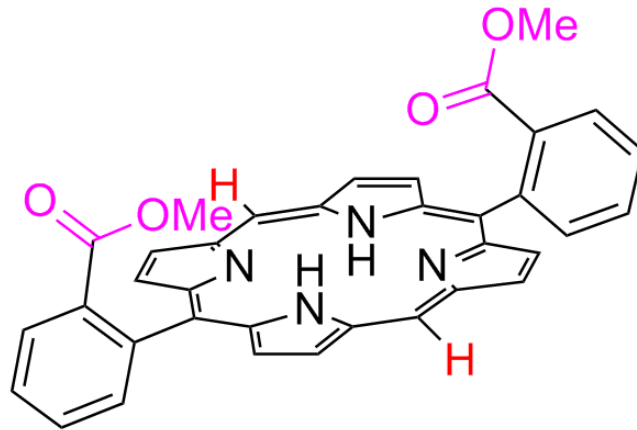
Quelques exemples

Composés non solubles dans solvant RMN

2 taches en CCM

1 composé identifié en RMN

1 insoluble inconnu

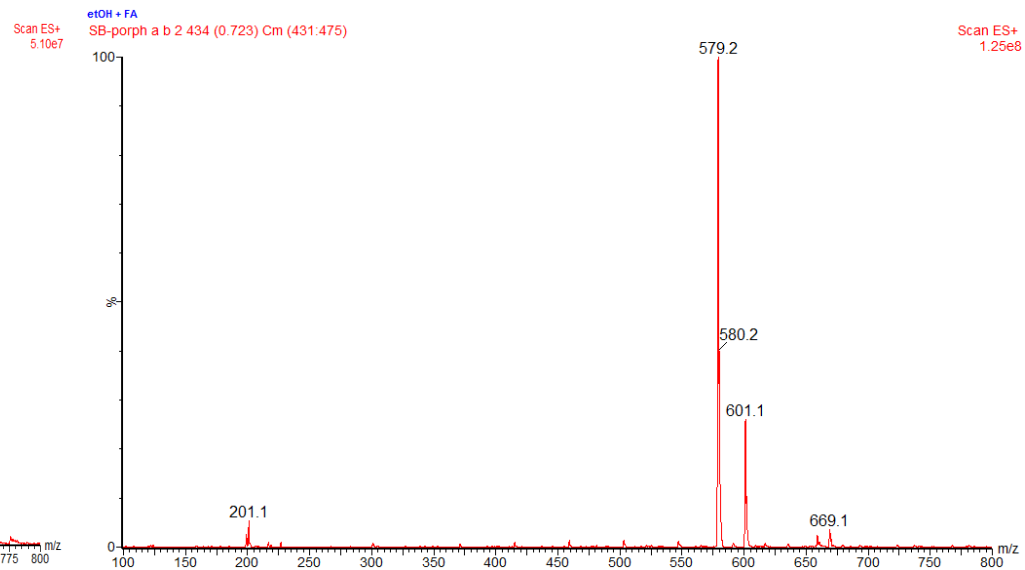
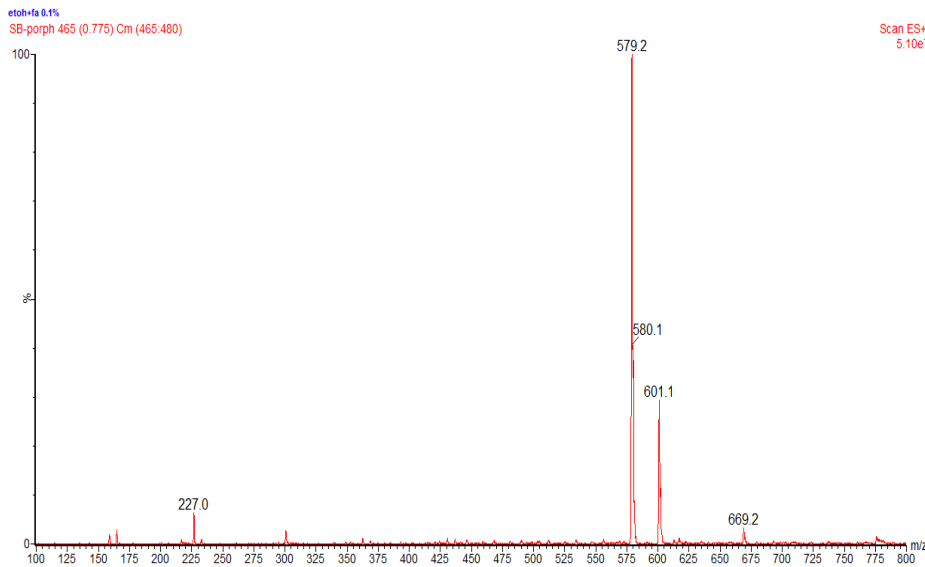


Quelques exemples

Composé non identifié en RMN

2 taches analysées, même masse

Après moults réflexions → atropoisomères



Quelques exemples

De la CCM à la préparative

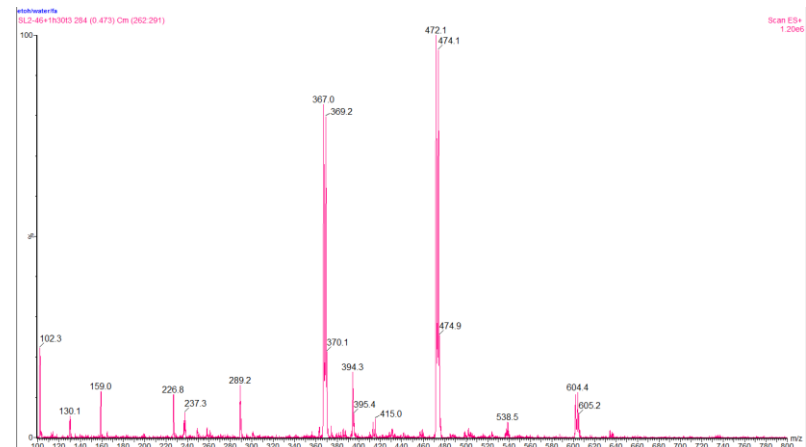
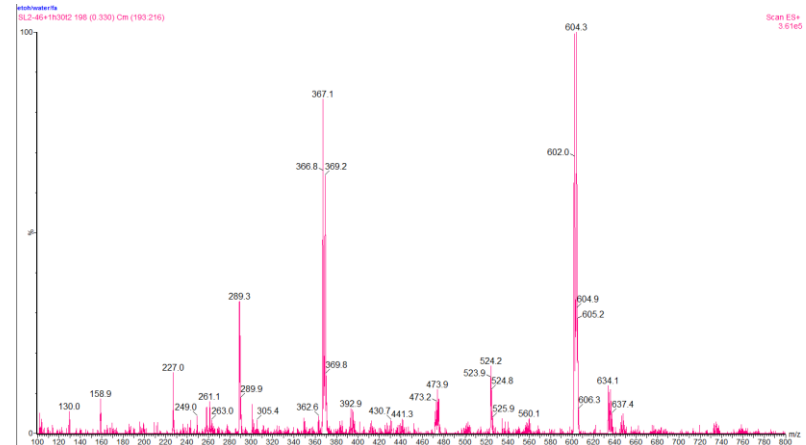
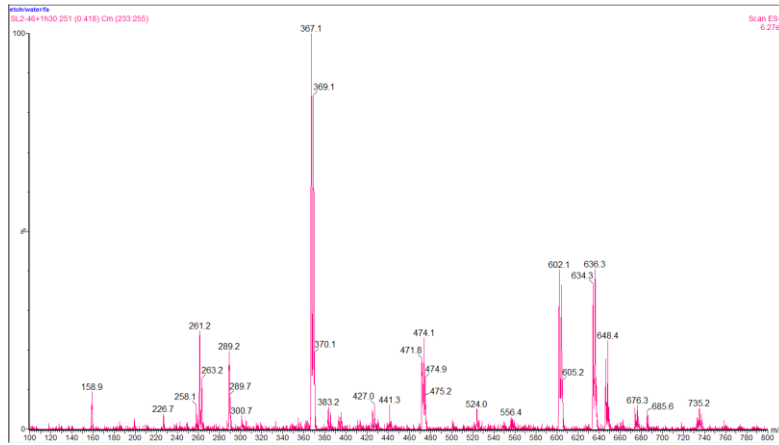
- Manip ayant déjà été faite...et abandonnée
- composé sensible
- RMN → forêt de pics
- CCM sur silice pas concluante



Quelques exemples

De la CCM à la préparative

- analyse des taches en TLC-QDa



Quelques exemples

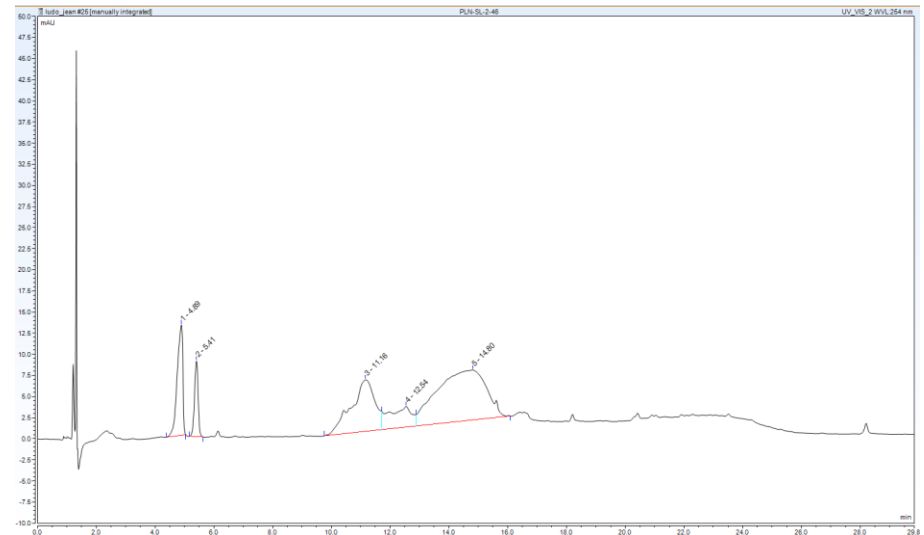
De la CCM à la préparative

- CCM en C18



- HPLC en phase inverse

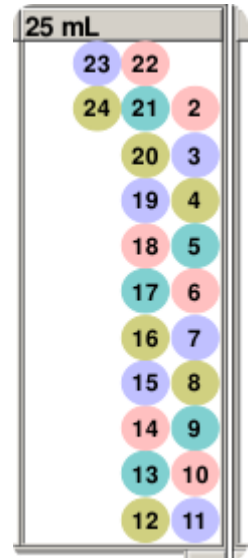
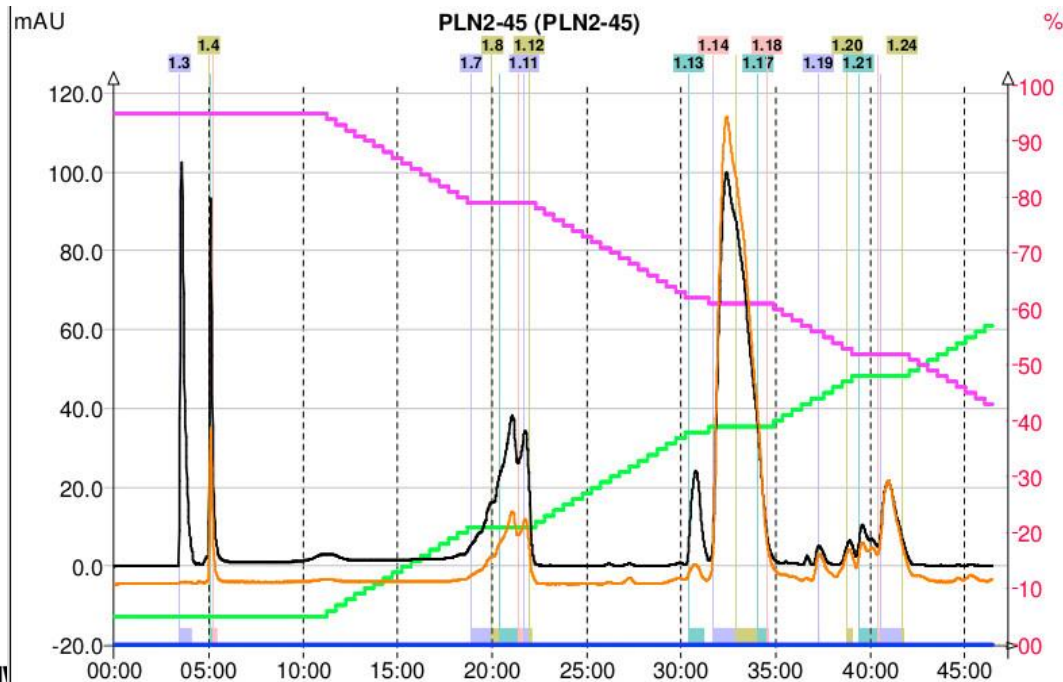
colonne Thermo scientific Synchronis C18



Quelques exemples

De la CCM à la préparative

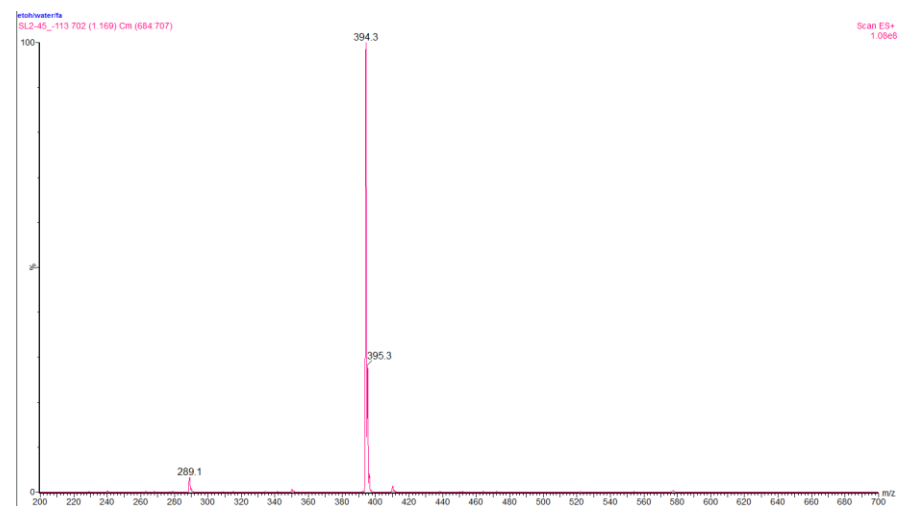
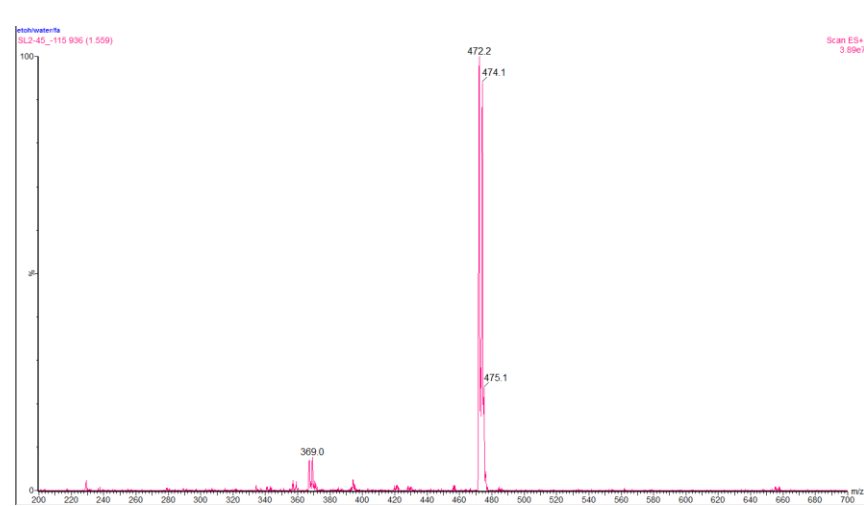
- système Interchim Puriflash 4250, colonne 21×250mm ; 5µm
- même phase qu'en analytique, acétonitrile/acétate d'ammonium 20mM, gradient 2 % par minute en acétonitrile
- maintien du mélange en collecte



Quelques exemples

De la CCM à la préparative

- analyse des tubes



I- Introduction

- Présentation du laboratoire COBRA
- Présentation du tremplin Carnot I2C

II- Chromatographie couche mince

- Un peu de théorie
- Un peu de rappels
- Un peu de CCM

III- Le couplage au labo

- Découverte du logiciel
- Environnement CCM
- Le protocole du thésard
- Quelques exemples

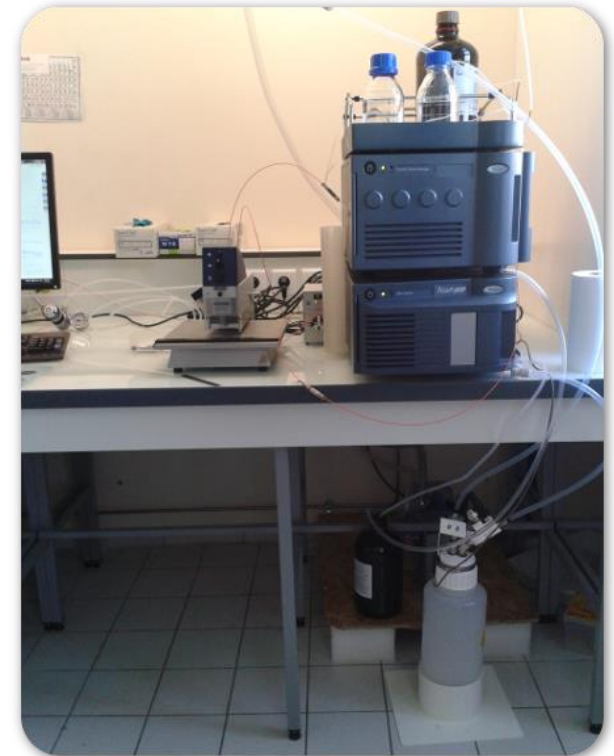
IV- Conclusion

Conclusion

Conclusion

- Facile à utiliser
- Non spécialiste autorisé
- Rapidité de l'analyse
- Pas de préparation de l'échantillon
- Attention au marquage des plaques !!!

- Bouchage des frittés sur l'interface
- bouchage de l'aperture sur la masse
- Pile du laser à changer





Remerciements

Un grand merci

Émilie, ma fidèle binôme

Françoise et Patricia, le team purif & CCM

Jonathan, doctorant convaincu par le TLC-QDa

Sophie, doctorante « galère la RMN »

Les chercheurs du laboratoire SMS et COBRA

La région Haute Normandie

La société Waters

La société Chromacim



Merci de votre attention

