

Programme de formation HPTLC - Théorie et pratique

Niveau 1 - Durée : 2 jours

Objectifs

Connaître et comprendre les principes de base de la chromatographie couche mince haute performance. Être capable de réaliser les différentes étapes d'une analyse conformément à une méthode décrite (monographie, SOP, publication). Connaître les paramètres critiques et les maîtriser. Avoir des notions de transfert de méthodes. Être initié au choix du solvant de séparation et à la stratégie de développement de méthode. Être capable de faire face aux principaux problèmes qui peuvent limiter la conformité ou la performance d'une analyse. Disposer de l'essentiel de la bibliographie en HPTLC.

Partie théorique

Introduction

Présentation des intervenants et du Laboratoire Chromacim. Attentes des stagiaires.

Présentation générale

Chromatographie Liquide sur plaque ou sur colonne, analogies, spécificités de la CCM et de l'HPTLC.

Les plaques

Les différentes plaques, Silice, Silice greffées. Le choix de la plaque et son utilisation. Précautions d'emploi.

Le dépôt

Différents types de dépôts et modalités en manuel et en automatique. Pourquoi il est important de maîtriser cette étape cruciale.

Comment réaliser un dépôt de qualité et reproductible. Que faire dans les cas extrêmes (échantillons aqueux, visqueux, polaires, ou riches en matrice).

La migration

Données générales sur la séparation sur plaque par capillarité. Quels sont les différents types de cuves et les modes de migrations. Comment agir en fonction du mélange de solvant considéré. Dans quels cas saturer ou conditionner la cuve, comment.

Quelles forces font migrer les produits sur la plaque, les séparent; introduction aux notions complémentaires de force éluante et de sélectivité. Utilisation des schémas théoriques tels que le triangle de Snyder pour le choix du solvant de séparation.

Comment éviter les artéfacts de migration. Comment obtenir une migration reproductible quelles que soient les conditions extérieures et l'opérateur.

La révélation

Quelles possibilités existent sur plaque. Vaporisation, ou immersion, comment choisir la méthode de révélation la mieux adaptée et réussir à tous les coups sa mise en œuvre. Différents types de révélateurs, bibliographie.

La détection et l'évaluation

Bien comprendre le lien entre l'observation et la mesure. Absorbance et fluorescence, caractéristiques, principes et limites. Différents modes de mesure d'une quantité sur la plaque avant ou après révélation. La densitométrie et l'image, les spectres UV et les couleurs visibles sur la plaque.

L'ensemble des paramètres importants de l'évaluation en vue d'identification par empreinte digitale ou de quantification seront étudiés, la qualité de la plaque à examiner devant être adaptée et restant primordiale.

La validation

Réglementation actuelle, et son application à l'HPTLC. Importance de l'incertitude, du calcul de la LOQ, et de la linéarité d'une méthode dont le détecteur ne répond pas de manière linéaire. Exemple concret de validation qualitative et quantitative.

Partie pratique

Introduction

Présentation des différents instruments à disposition des stagiaires, et de leurs logiciels.

Le logiciel VisionCATS :

Comment programmer le logiciel pour créer une méthode et une analyse répondant à la demande. Principales fonctions du logiciel et en particulier enregistrement, impression et sauvegarde des données sur la base de données visionCATS.

Dépôt sur la plaque

Positionnement et taille du dépôt, nombre de dépôts, protocoles standardisés. Comment définir et déposer une gamme d'étalonnage de la limite de quantification (LQ) à la saturation

pour encadrer la concentration de travail. Etude pratique de cas particuliers selon le type d'échantillon.

Migration développement avec ou sans saturation

Utilisation des différents types de cuves isocratiques manuelles ou automatiques : ADC2, cuve horizontale, cuve double bac, cas particulier du gradient AMD2.

Révélation-dérivation post-chromatographique

Essais comparatifs des différents modes de révélation, manuels ou automatiques. Utilisation du Derivatizer et du système d'immersion automatique.

Acquisition d'image

Prendre une photo de plaque correctement documentée et GMP si nécessaire dans les différentes conditions d'éclairage: visible, UV à 254nm, Fluo à 366nm. Quelles possibilités et limitations de quantification peut-on attendre d'un enregistrement de chromatogramme issu d'une image prise dans des conditions parfaitement reproductibles. Bruit de fond de plaque sur une image, comment s'en débarrasser.

Densitométrie

Enregistrement de densitogrammes à différentes longueurs d'ondes et en fluorescence. Enregistrement de spectres UV et visible. Analyse multi-longueur d'ondes. Résolution, vitesse de lecture, taille de la fente et largeur de piste, retour à la ligne de base et quantités déposées. Possibilités avant ou après révélation. Comment calculer en pratique la limite de quantification, et donner un résultat dans une gamme donnée. Comment choisir la régression la mieux adaptée. Possibilités de calculs par le logiciel.

Comparaison avec les résultats obtenus à partir d'une image, en absorbance et en fluorescence.

Edition des rapports

Comment éditer un rapport standard. Aperçu des possibilités de personnalisation du rapport, et d'exportation des résultats.

Récapitulatif des choses à savoir du logiciel visionCATS

Le logiciel WINCATS :

Session question-réponses des utilisateurs de l'ancienne version du logiciel.

Evaluation

Vérification des acquis de la formation et réponses aux questions en suspens.

Agenda - déroulement du stage

Mercredi 12 Décembre 2018

9h30 accueil des participants

9h50 introduction

10h00 partie théorique première partie (plaques, dépôt)

12h30 déjeuner (offert) sur place

13h30 partie théorique seconde partie (migration, révélation)

15h45 pause

16h00 partie théorique troisième partie (évaluation, quantification, bibliographie)

17h50 questions diverses et conclusion de la partie théorique

18h00 fin

Jeudi 13 Décembre 2018

8h30 partie pratique première partie (choix et manipulation de la plaque, dépôt)

10h30 pause

10h45 partie pratique seconde partie (migration et révélation)

12h30 déjeuner (offert) sur place

13h30 partie pratique troisième partie (évaluation et quantification)

15h45 pause

16h00 partie pratique quatrième partie (ajustement éventuel des paramètres et rapports)

16h50 questions diverses et conclusion

17h00 fin

Coût 1300€ ht hors hébergement

(exemple d'hôtel à proximité <http://www.hoteldesfrenes.fr/>)