



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires .

■ *Par F. Bretin (1) ; H. Gangloff (2) et F. Maquin (1).*

(I) : Sanofi-Aventis R&D ; Vitry sur Seine.

(II) SEDERE sas ; Alforville.



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires.

a) Soit par une méthode « off line » : l'utilisateur sélectionne ; gratte ou découpe la ou les taches CCM qui l'intéressent.

➤ **On met en solution dans un solvant (DMSO ; MeOH ; chlorofome ; dichorométhane).**

➤ **On filtre cette suspension soit avec filtre seringue (0,2 µm) soit avec un vial Whatman de type Uniprep (0,2 µm) ...**

➤ **La solution est analysée par SM : EI ; MALDI ; APCI ; FAB ; Electropay....**

(N.B : cette procédure n'a à priori pas de facteur limitant pour le mode d'ionisation utilisé en spectrométrie de masse).

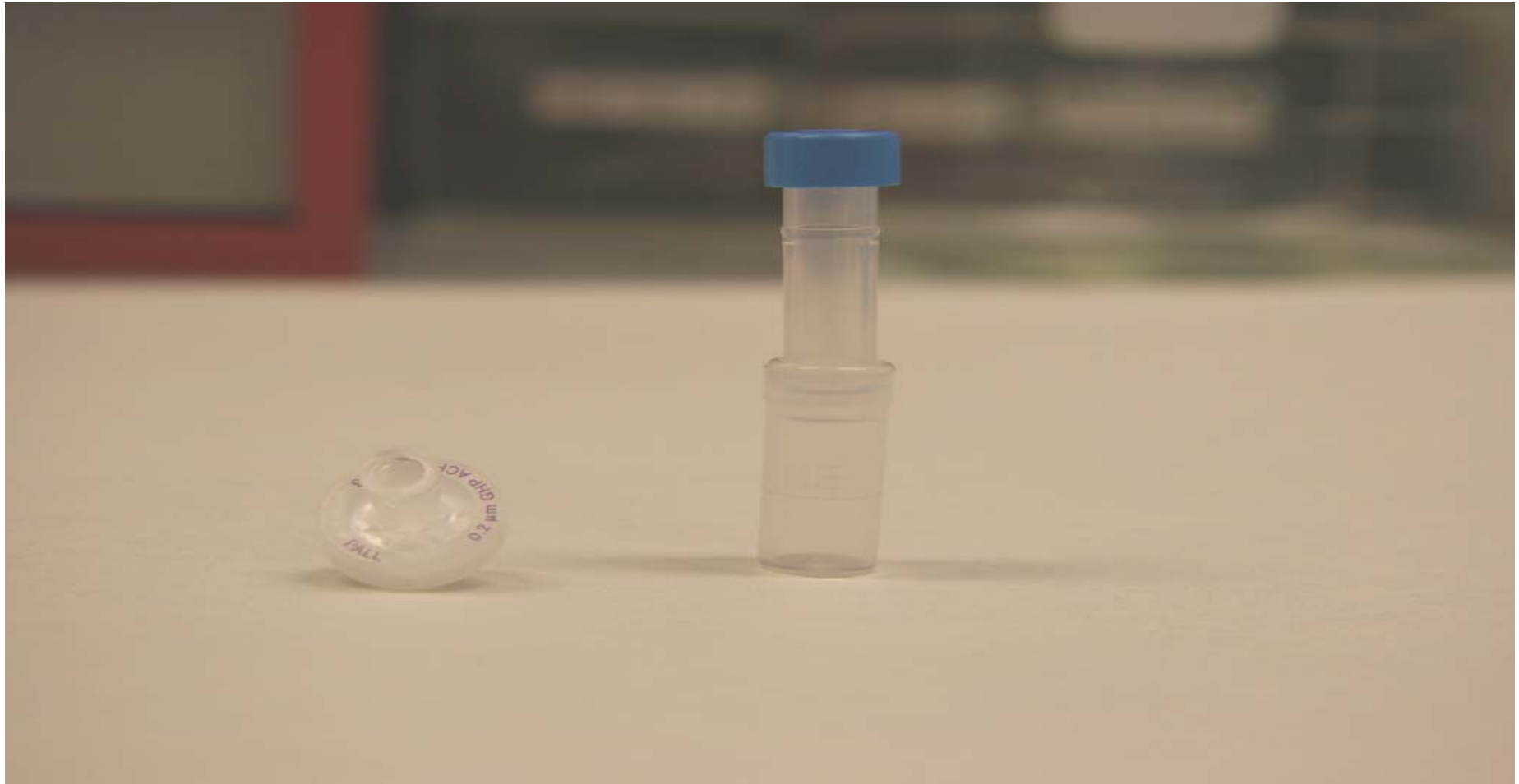


Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires.





Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires.





Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires.

b) Soit avec une méthode « on line » : couplage CCM-SM (ou TLC-MS).

- **Le couplage CCM(TLC) – SM(MS) a été introduit dans les années 80 associant différents modes d'ionisation : SIMS ; FAB ; MALDI ; ESI ; APCI ...**



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires.

Pour une présentation détaillée du couplage CCM-SM dans les années 80-90 voir la thèse « Thin-Layer Chromatography with Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection : From Preparative-Layer to Miniaturized Ultra-Thin-layer Technique ; P. Salo ; Academic Dissertation ; Helsinki 2007 » .

- En 2004-2007 Jeol a proposé une interface CCM associée à un spectromètre TOF sous l'appellation JEOL AccuTOF DART (DART=Direct Analysis in Real Time...)**



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires .





Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires.

- **Inconvénients (du point de vue CCM) ; cout de l'appareillage AccuTOF DART ; dimension plaque CCM ; contamination possible de la source DART via des particules de silice....**
- **Similairement à l'interface DART (JEOL) Prolosia (US) a développé une interface DESI (Desorption Electrospray Ionization) : compatible avec SM-Waters-Thermo-Agilent ... mais à priori pas de note d'applications associant la CCM...**



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires.

- **Camag Ag (Muttenez, Suisse) en collaboration avec Dr H. Luftmann ; Dr G. Morlock ont étudié et commercialisé une interface CCM-SM compatible avec SM-electrospray (SM mono, triple quad ; TOF ; Q/TOF, ion trap...).**
- **Cette interface CAMAG TC-MS peut être aussi utilisée en « stand alone » : isolement de spots pour IR ; RMN....**



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires.

- **Au Sein du groupe Sanofi-Aventis France, 3 interfaces de ce type sont présentes : Montpellier ; Neuville ; Vitry sur Seine.**
- **En étroite collaboration avec Mr F. Bretin (Med Chem Oncology) nous avons cherché à faire « évoluer » cette interface « stand alone » vers une configuration Self Service-Chimie Médicinale-CCM (Self Service Chimie Médicinale).**
- **Le chimiste vient avec sa plaque CCM qui contient les taches qui l'intéressent et fait les analyses avec un minimum de manipulation possible, sans avoir à connaître le logiciel d'acquisition et de traitement de données SM et ... retrouve ces résultats sur son ordinateur (le logiciel associé au CCM-SM-ELSD assurant le traitement ; transfert des données vers le PC du chimiste).**



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

- **Compte tenu que l'on cherche à rendre accessible la CCM–SM à tous, les questions qui nous viennent à l'esprit sont les suivantes :**

- ⊖ **Comment s'assurer de la manière la plus simple possible que l'interface Camag et/ou le spectromètre de masse (ionisation : electrospray +/-) fonctionne correctement ??**

- ⊖ **La ou les taches CCM (Spots CCM) sont-elles assez concentrées ??**

- ⊖ **Si tout du point de vue interface Camag / spectromètre de masse est parfait, comment s'assurer que la structure à identifier s'ionise bien en electrospray (mode positif ; négatif)...**



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

■ Pour répondre aux questions précédentes il est évident que l'on doit disposer en parallèle à la spectrométrie de masse (SM) d'un autre détecteur avec par exemple :

- Détecteur UV (fixe ; variable)
- Détecteur UV a barettes de diodes (DAD)
- Détecteur à diffusion de lumière (ELSD)
- Détecteur Corona (Charged Aerosol Detector)
- Détecteur à azote par chimiluminescence (CLND)



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

- Le choix de ce détecteur additionnel doit tenir compte des paramètres spécifiques de l'interface CCM-Camag :
 - ① L'éluant sera du type méthanol, méthanol / acétonitrile, (l'eau est exclue : incompatible avec une bonne étanchéité de l'ensemble plaque CCM-piston interface CAMAG).
 - ② Le débit de l'éluant dans l'interface CCM-Camag est de l'ordre de 0,25-0,5 mL/minute (si ce détecteur additionnel est placé en parallèle du détecteur SM il doit pouvoir travailler avec un débit de l'ordre de 150-350 μ L/minute et ceci avec une sensibilité la meilleure possible). On exclut par avance l'ajout de solvant additionnel « make up » ...



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

③ Ce détecteur additionnel doit pouvoir travailler durant les heures d'ouverture des selfs SM Chimie Médicinale avec un minimum de maintenance et de suivie des paramètres expérimentaux.

⇒⇒⇒ les détecteurs Corona et CLND ne sont pas retenus.

Compte tenu que l'on va essayer d'être le plus « universel » possible dans la détection, on ne retiendra pas non plus UV fixe et variable...



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

→→→ Deux détecteurs additionnels sont possibles :

a) Détecteur à barettes de diodes (DAD) : comme ce détecteur est de type non destructif 3 configurations sont possibles :

CCM-CAMAG-DAD-SM (SS split)

CCM-CAMAG-DAD-split-SM/égout

CCM-CAMAG-split-DAD/SM

b) Détecteur à diffusion de lumière (ELSD) : comme ce détecteur est de type destructif une seule configuration est retenue :

CCM-CAMAG-split-ELSD/SM



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

- **Après différentes analyses de taches CCM-SM (structures organiques, domaine de masse : 100-900) le détecteur à diffusion de lumière (ELSD) est le choix le plus évident :**
 - ① **Sensibilité du signal dans notre configuration CCM-SM-...: dans quasi tous les cas on caractérise le profil d'extraction CCM-SM.**
 - ② **« Universalité » de la détection de la structure présente dans une tache / spot CCM : certaines structures absorbent peu ou pas sous UV ; même avec des structures semi volatiles l' ELSD est supérieur quant au rapport S/N...**



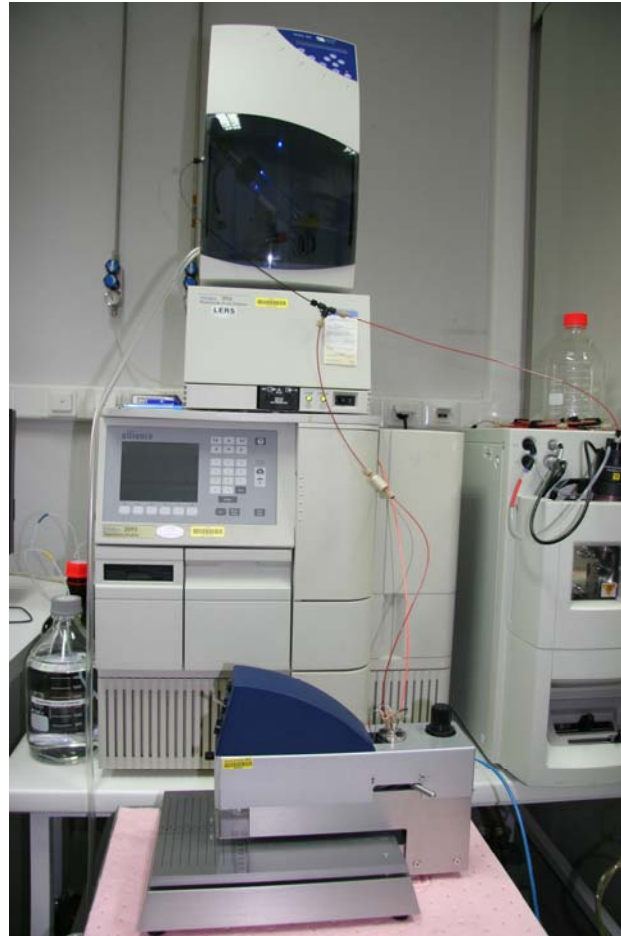
Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

La configuration que nous retenons est CCM-CAMAG-split-ELSD/SM :





Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires





Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

➔ Pour le couplage CCM-SM-ELSD voici un aperçu des conditions expérimentales :

- Durée d'une acquisition CCM-SM-ELSD : 1, 5 minutes.
- Eluant : méthanol / acétonitrile (95/5)
(pour maintenir un rendement d'ionisation electrospray optimal utiliser de préférence solvant qualité LC-MS ; eau Millipore).
- Débit éluant en sortie pompe LC-Waters-Alliance : 0,5 mL/minute (valeur compatible : 0,3-0,5 mL/minute).
- Pression LC associée débit 0,5 mL/minute : 11 - 15 bars (l'augmentation pression/perte de charge est un bon indicateur de l'entraînement de silice en sortie de l'interface CAMAG (au-delà de P=40 bars changement du fritté Upchurch conseillé).
- ELSD Sedere : gaz de nébulisation : azote ; pression de nébulisation = 3,7 bars ; température d'évaporation = 32°C-35 °C .



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

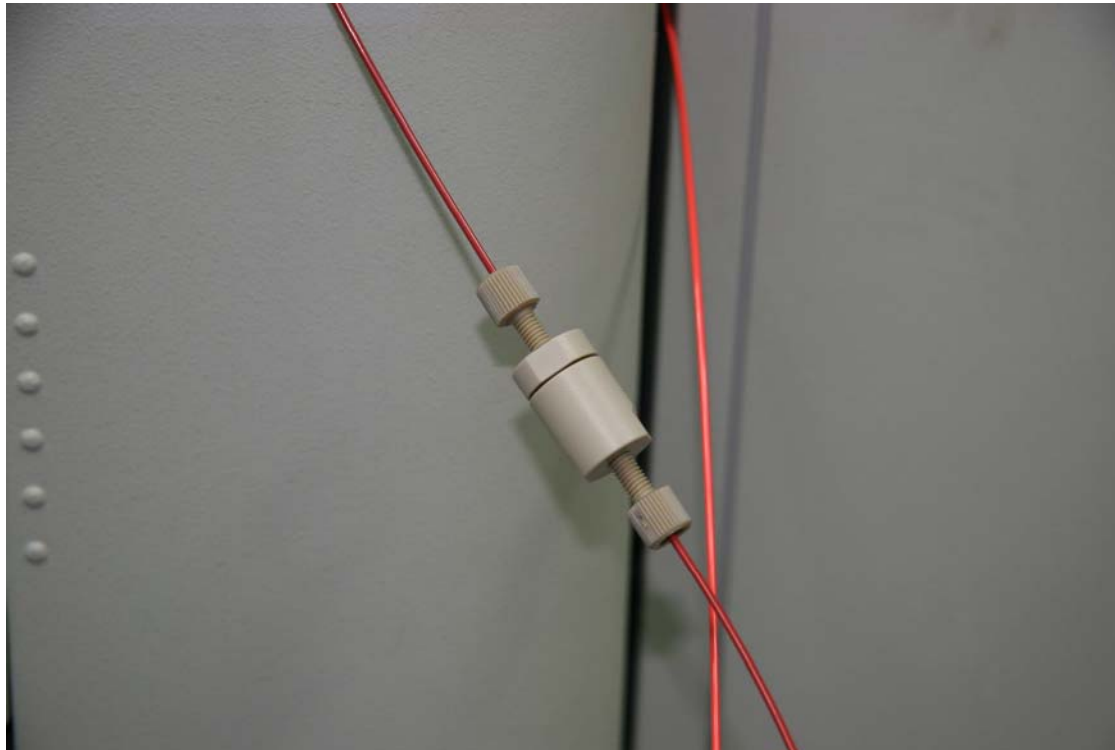
→ Remarques sur tube peek (Upchurch/IDEX) conseillé pour le couplage CCM-SM-ELSD :

- ① Couleur « Natural » (25 μm ; 65 μm) : déconseillé avec CCM-SM-ELSD (ref Idex 1559,1560) .
- ② Couleur « Black » (100 μm) : déconseillé avec CCM-SM-ELSD (ref Idex 1561) .
- ③ Couleur « Red » (125 μm et diamètre au-delà) : compatible avec le couplage CCM-SM-ELSD(réf. Idex 1535 ;1562 ; 1536;...).



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

Filtre Upchurch/IDEX en sortie de l'interface CCM-SM-ELSD : réf IDEX A 356 (avec peek frit 0,5 μm A 701). Pour une filtration optimale de la silice en sortie CCM-Camag on conseille de travailler avec titanium Frit A 504 (0,2 μm) :





Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

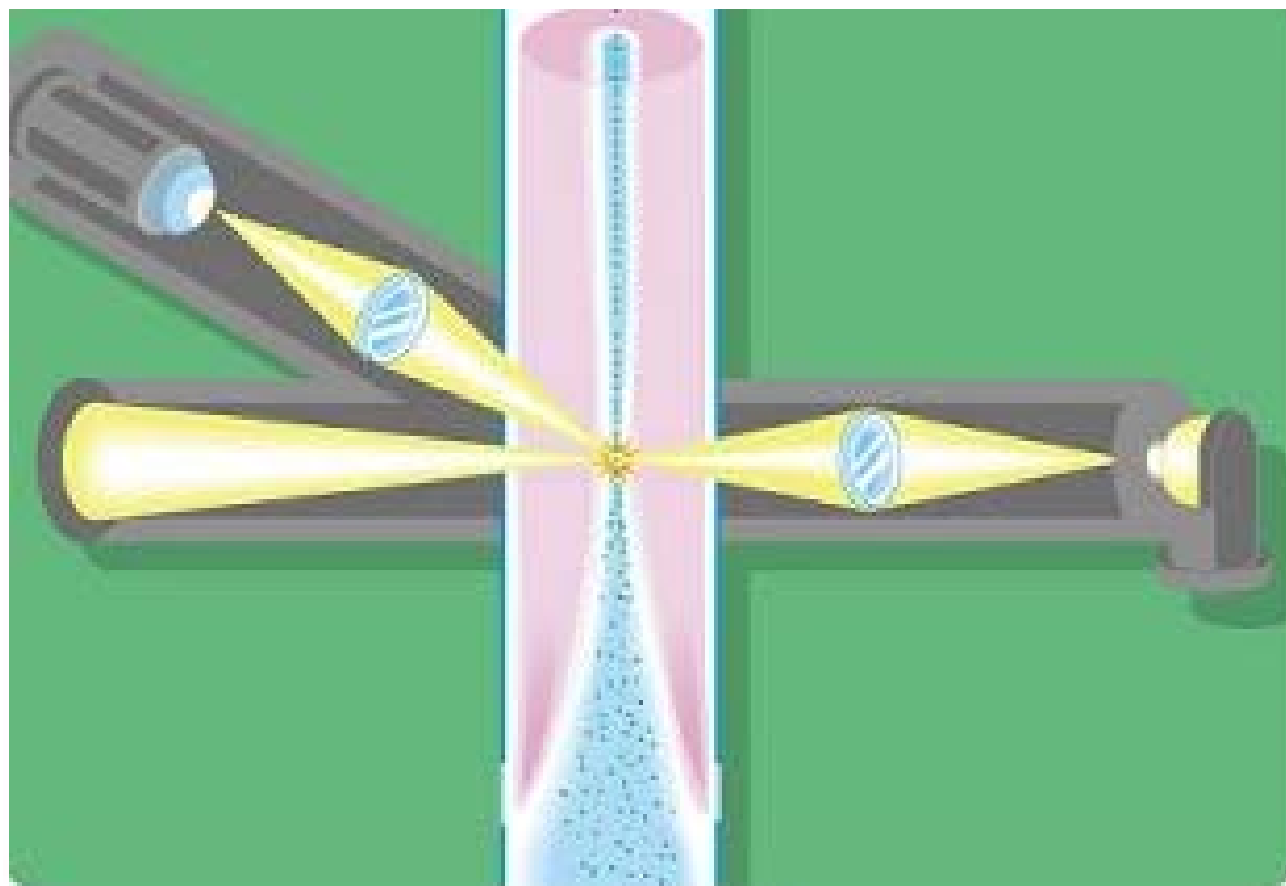
Split en sortie CCM-CAMAG : IDEX P-727 Tee





Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

3 STEPS **ONLINE DETECTION** TECHNOLOGY





Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

« Automatisation » du couplage CCM-SM-ELSD :

Ce qui est possible :

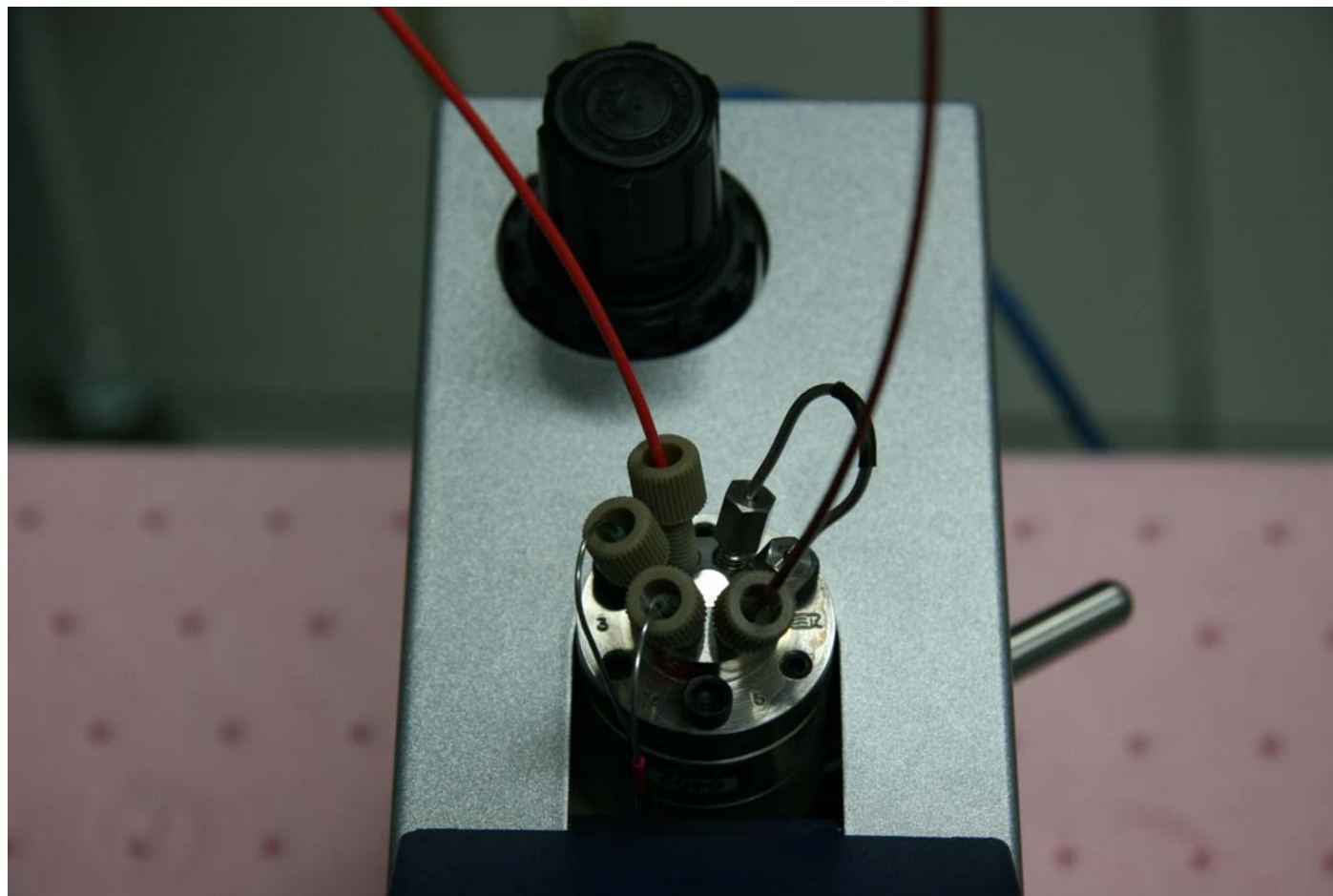
- ① Automatisation du logiciel d'acquisition et traitement de données : Mass Lynx/ Open Lynx (logiciel Waters). La durée d'une acquisition CCM-SM... est de 1, 5 minute : si nécessaire on peut dans un même run faire l'analyse de 2 taches/spots CCM...
- ② La vanne de commutation bypass/extraction CCM-Camag (vanne rheodyne manuelle) peut être remplacée par une vanne rheodyne motorisée de type MX Series : un système de câble électrique (relai/contact closure) entre SM/soft Waters/vanne rheodyne MXP-7900 assure la commutation automatique Bypass/extraction CCM-Camag. Avec les automatisations ① et ② on ne peut analyser qu'une seule tache/spot CCM pendant la durée de l'acquisition .

Ce qui n'est pas possible :

Positionnement de la plaque CCM sur l'interface CAMAG ; centrage du spot CCM avec le laser ; nettoyage tête d'extraction par jet d'azote...



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires





Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires



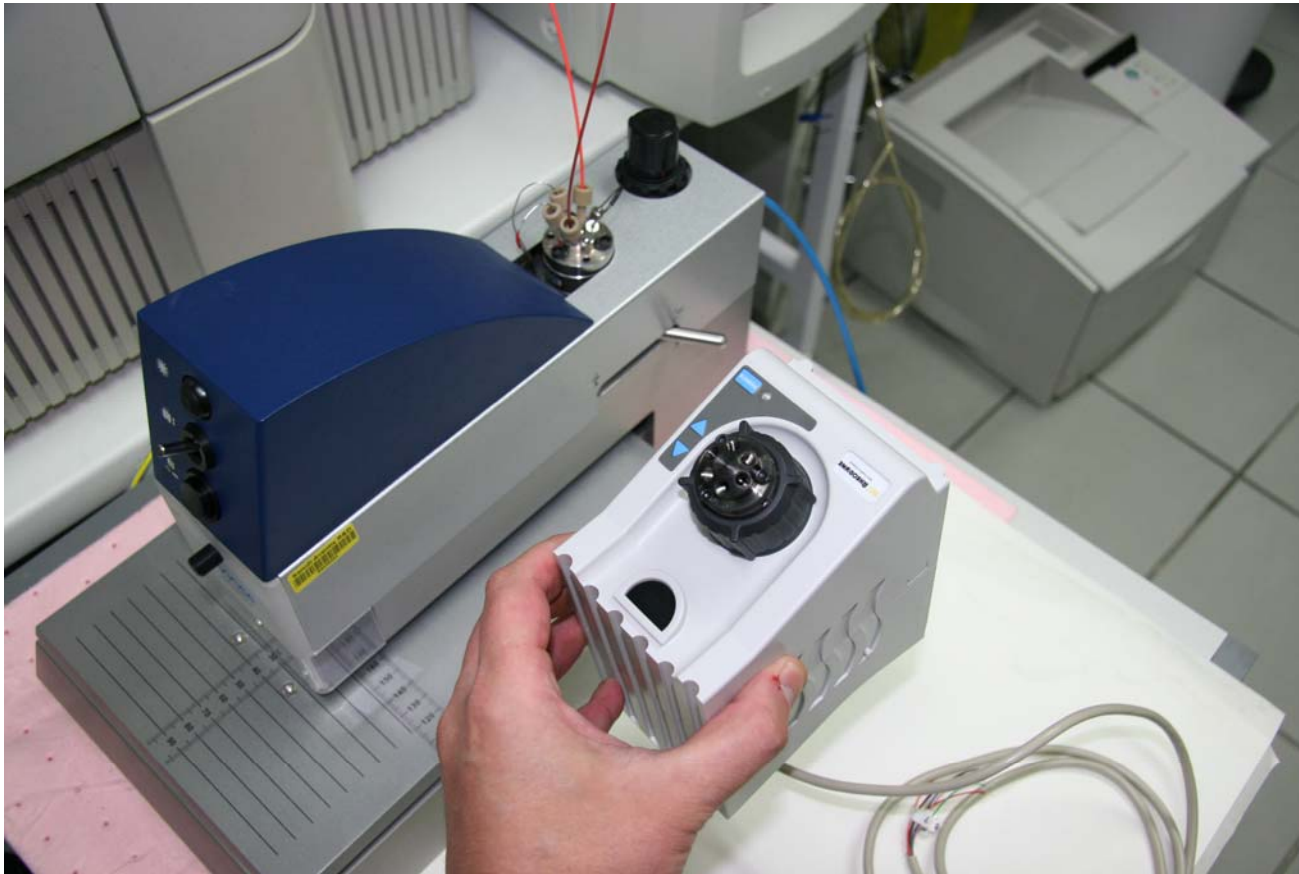


Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires



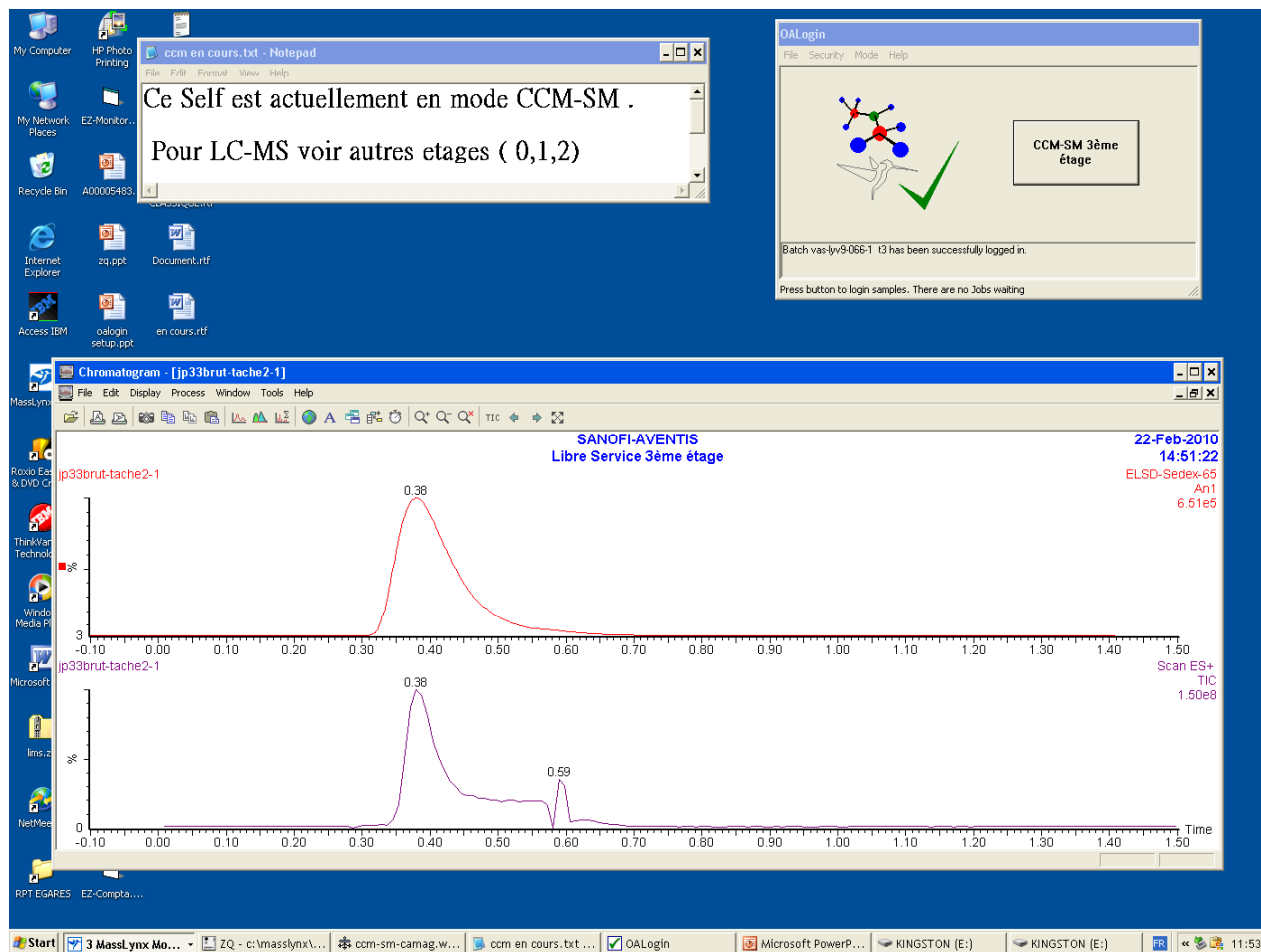


Nouveaux Développements du couplage CCM- SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires



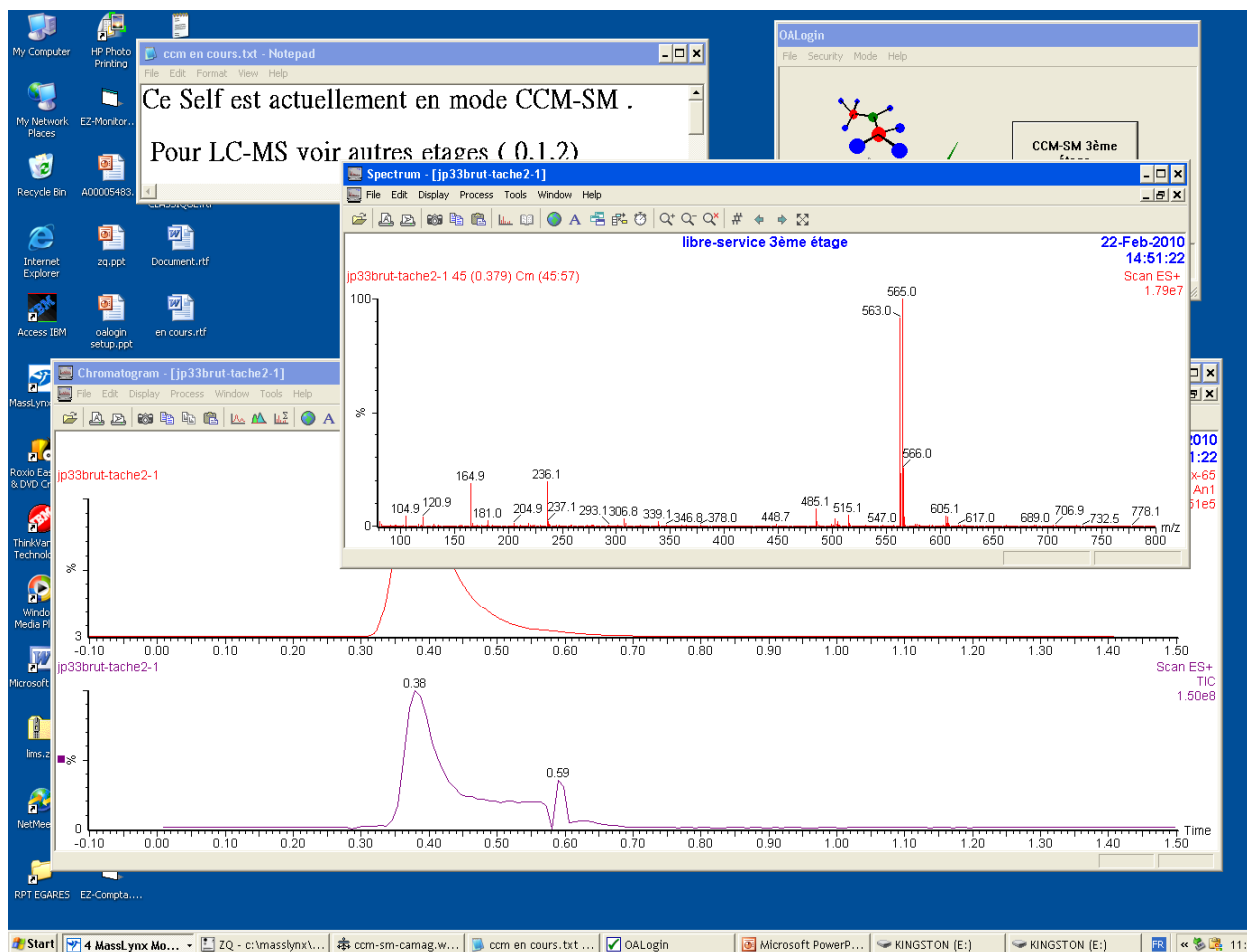


Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires





Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires





Nouveaux Développements du couplage CCM- SM-ELSD : retour d'expérience; commentaires

Remerciements :

Club de chromatographie CCM : Mme Louse Vicard; Mr Pierre Bernard-Savary (chromacim-Camag France).

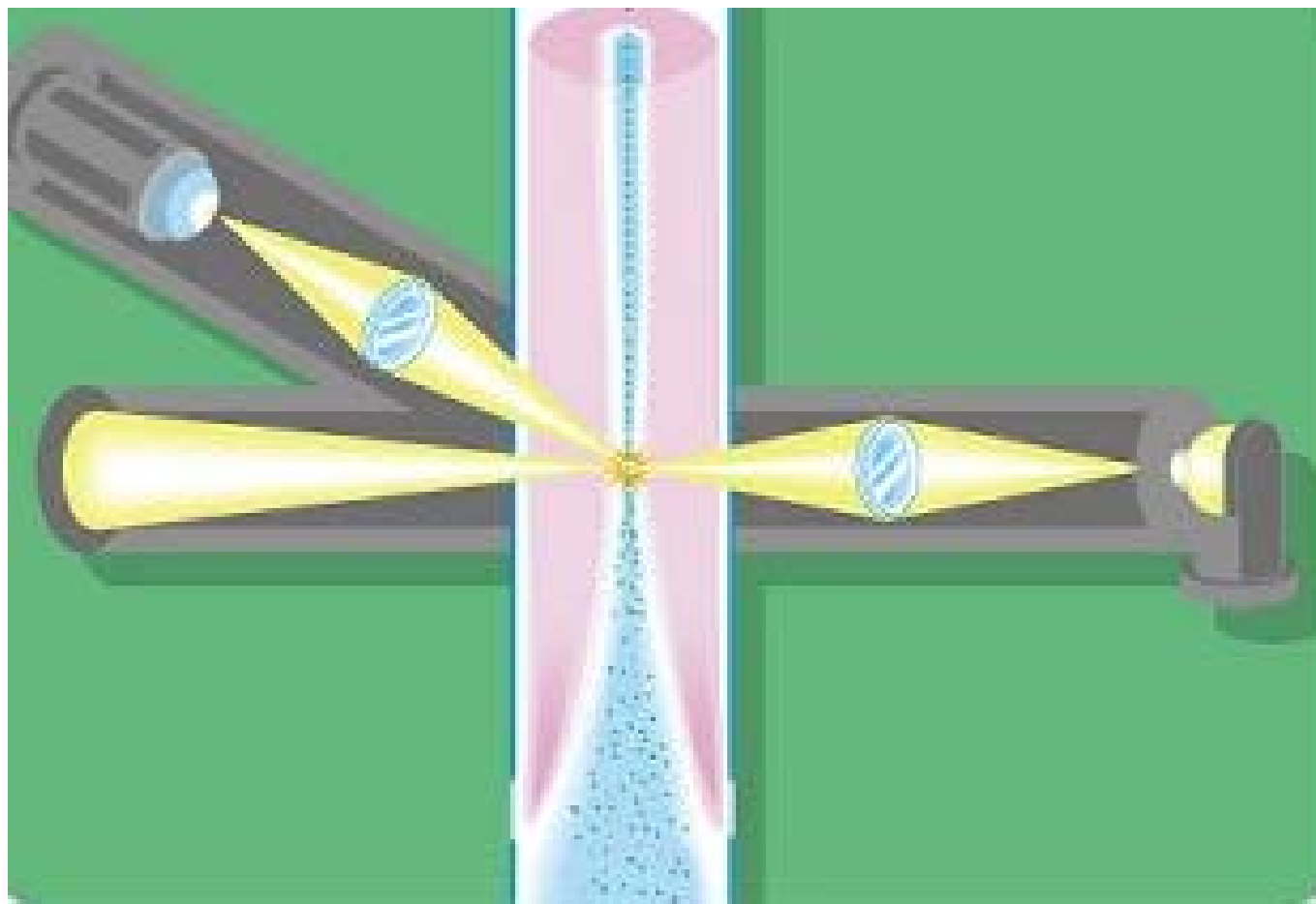
Mr Francois Bretin ; Chimie Medicinale Oncologie ; Sanofi-Aventis ; Vitry sur Seine .

Mrs Bertrand Monegier et Claude Kugel ; Analytical Sciences Paris ; Sanofi-Aventis; Vitry sur Seine .

SEDEX LT-ELSD Technology

SEDEX **LT-ELSD**[™]

3 STEPS OF SEDEX **LT-ELSD** TECHNOLOGY



SENSITIVITY
FLEXIBILITY
EXPERIENCE

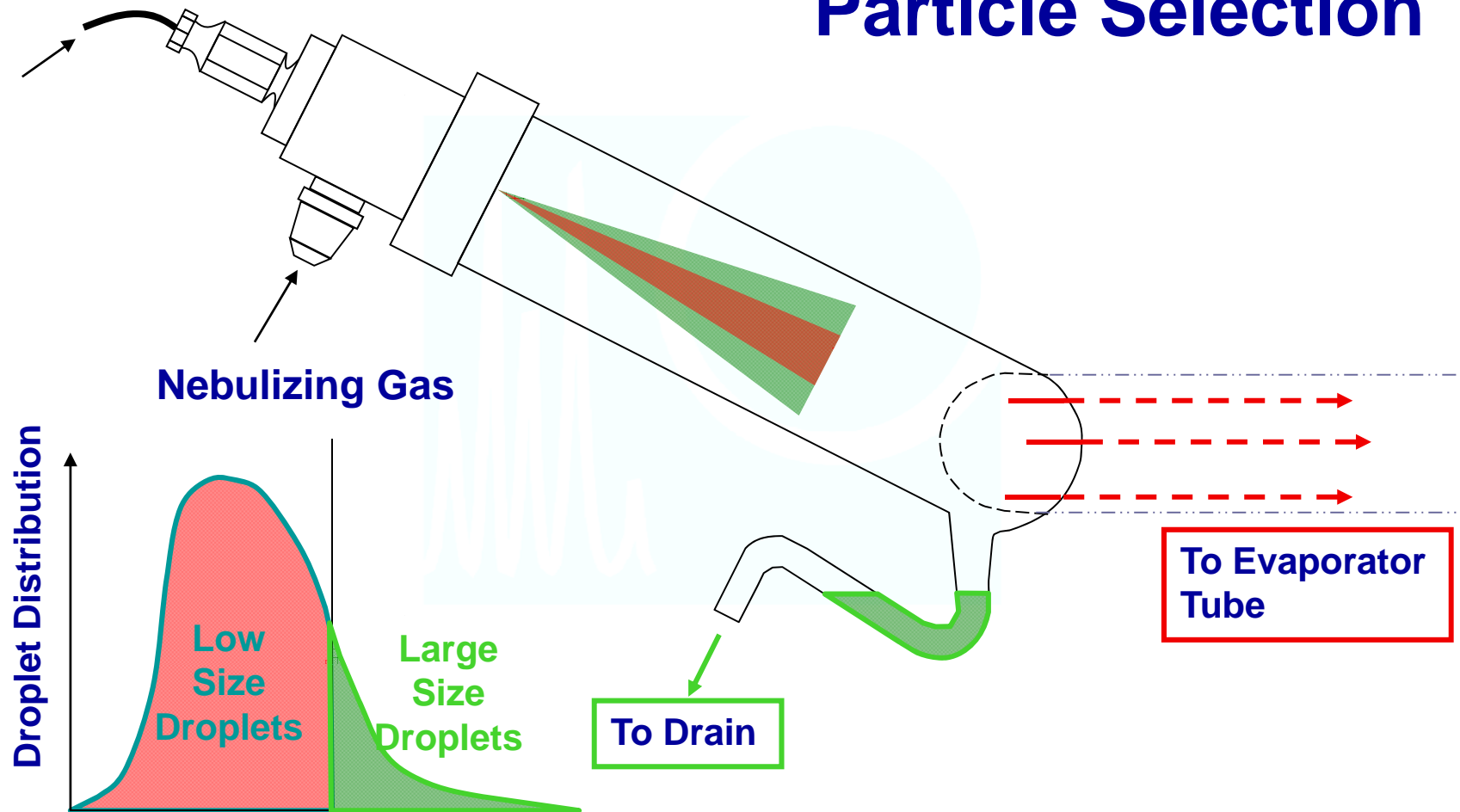
SEDERE S.A.S.

9 rue parmentier – Parc Volta - BP 27
94141 Alfortville Cedex - France

Application Manager
+33 (0)2 38 66 84 47
applications@sedere.com

Mobile Phase

Particle Selection



SENSITIVITY
FLEXIBILITY
EXPERIENCE

SEDERE S.A.S.

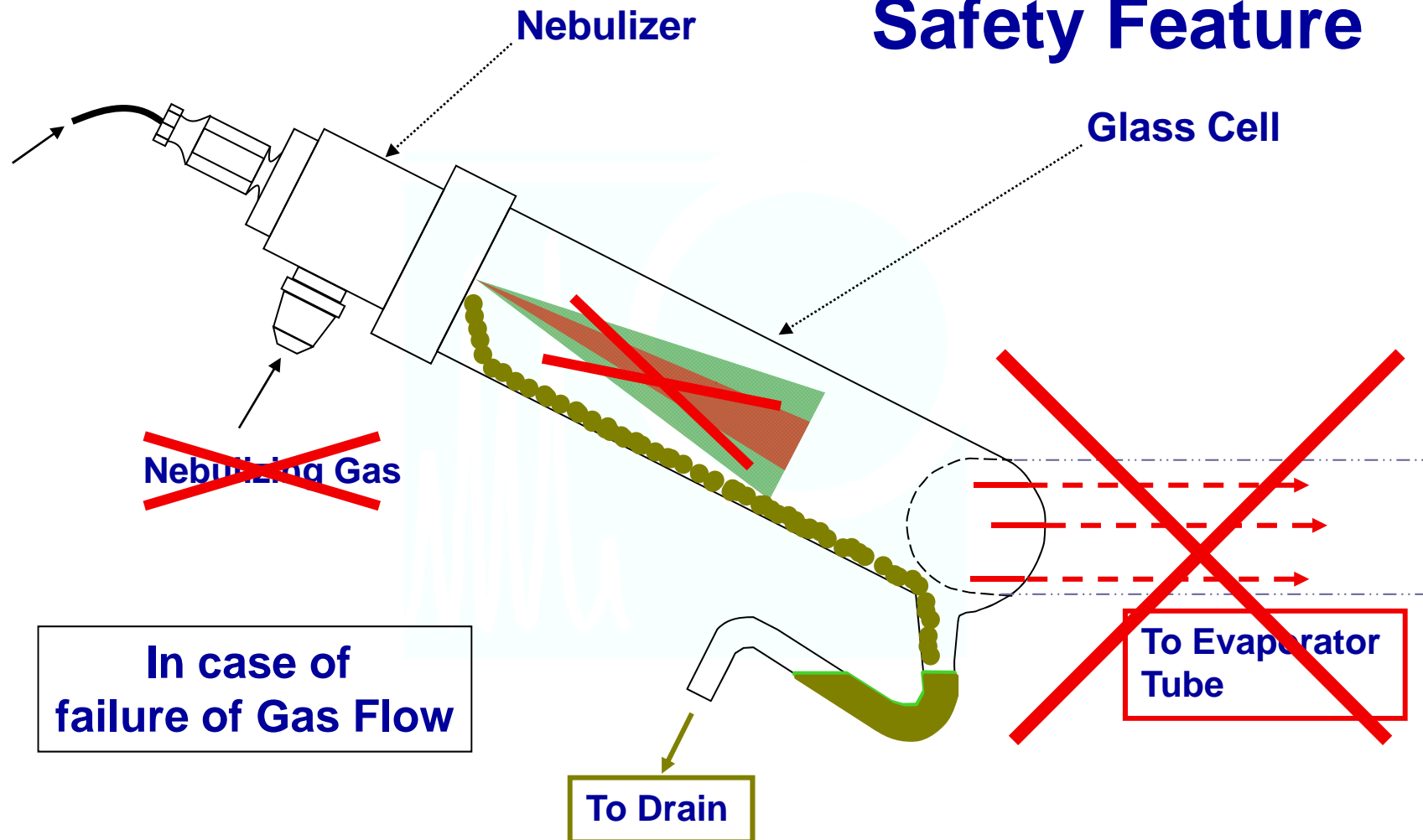
9 rue parmentier – Parc Volta - BP 27
94141 Alfortville Cedex - France

Application Manager
+33 (0)2 38 66 84 47
applications@sedere.com

SEDEX LT-ELSD Technology



Safety Feature

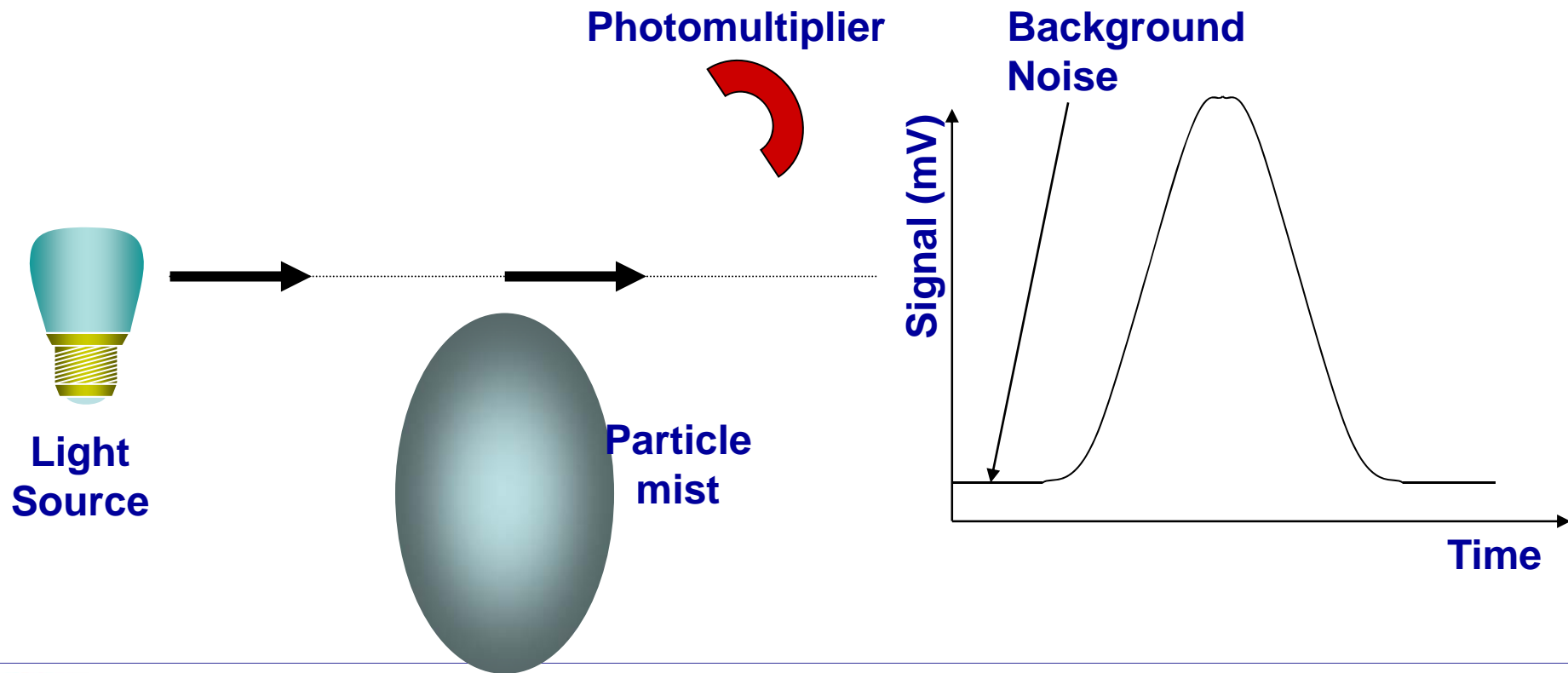


SENSITIVITY
FLEXIBILITY
EXPERIENCE

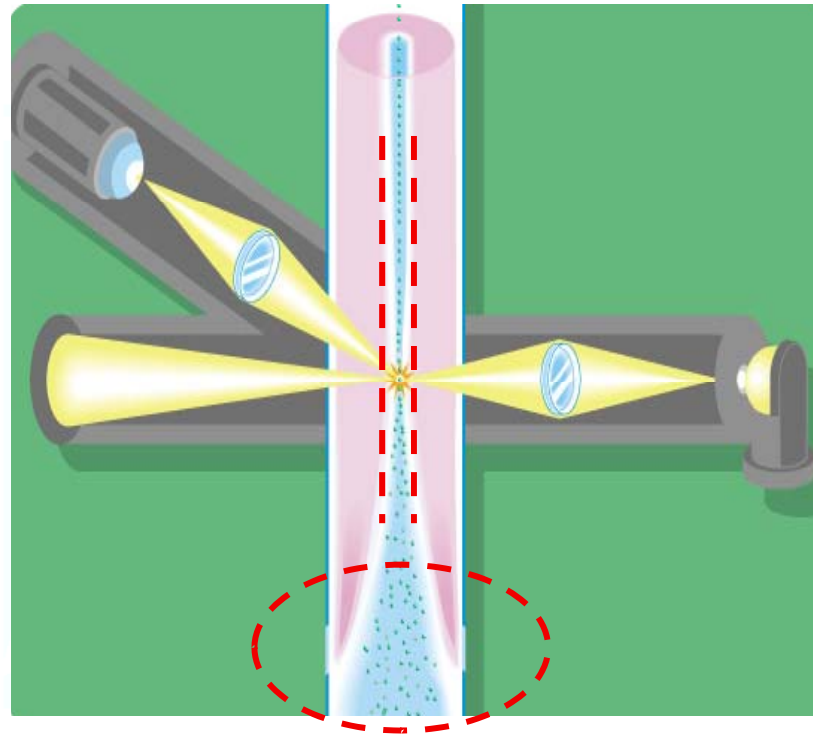
SEDERE S.A.S.
9 rue parmentier – Parc Volta - BP 27
94141 Alfortville Cedex - France

Application Manager
+33 (0)2 38 66 84 47
applications@sedere.com

Detection

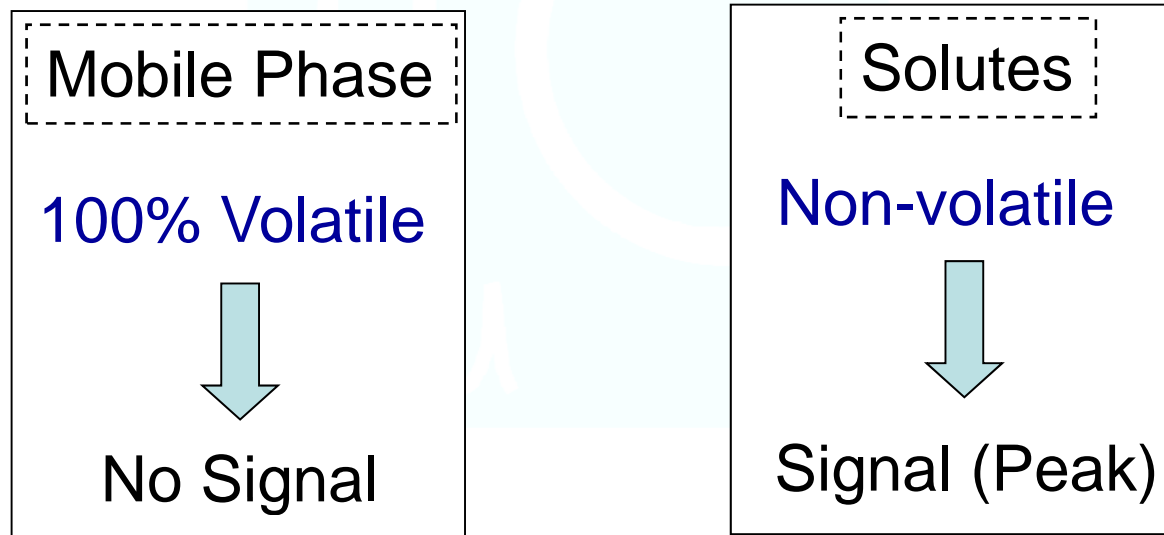


Auxiliary Gas: Gas Supported Focusing

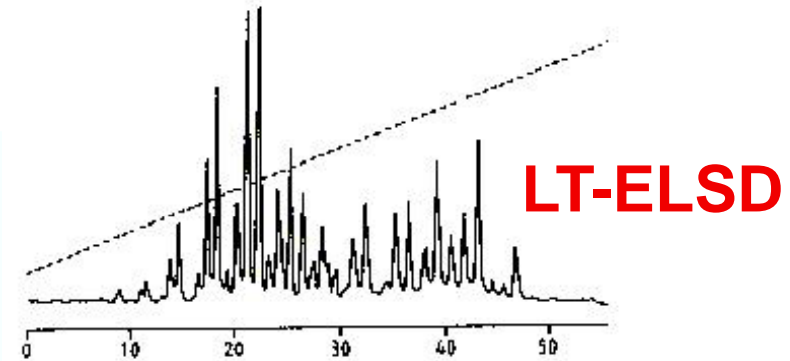
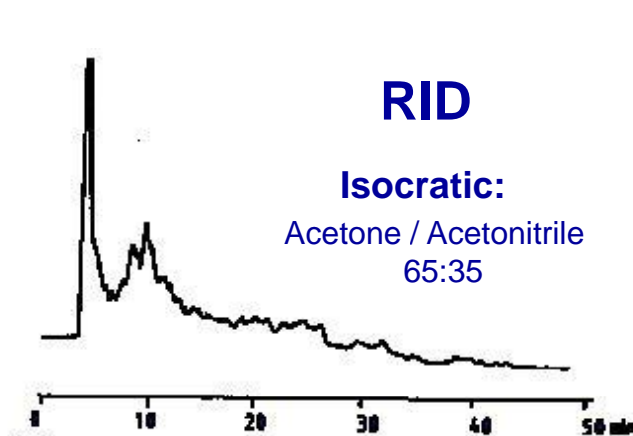


- **Microparticle Beam Focusing.**
- **No Contamination of the Optical Head.**

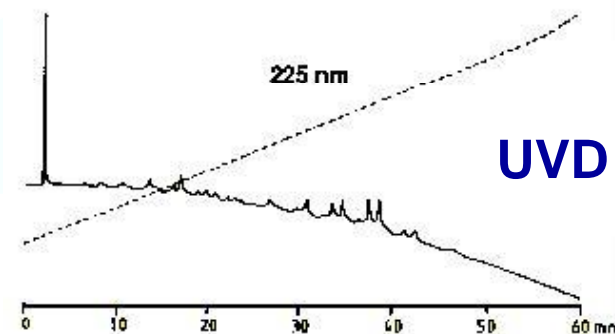
The signal is only generated by non-evaporated compounds:



ELSD ADVANTAGES



Gradient:
Ethanol / Acetonitrile
20 to 100% Ethanol in 55 minutes
Flow rate: 1.5mL/min
Spherisorb ODS-2
15µL butter (acetone 8.5%)



Triacylglycerols analysis in butter



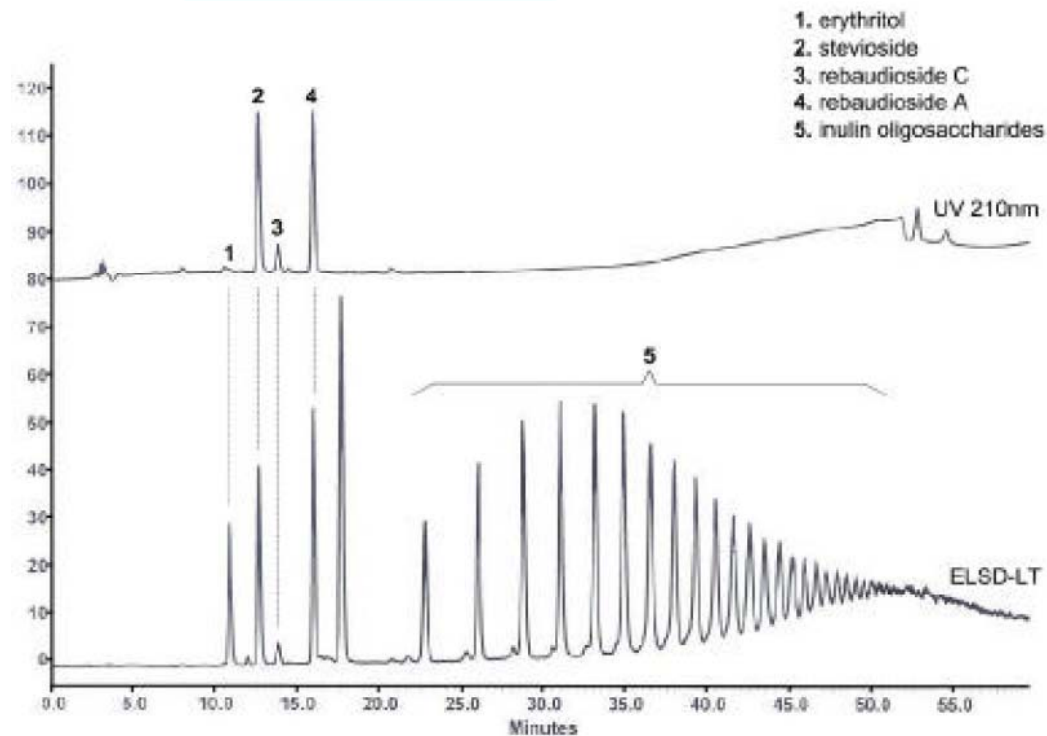
SENSITIVITY
FLEXIBILITY
EXPERIENCE

SEDERE S.A.S.

9 rue parmentier – Parc Volta - BP 27
94141 Alfortville Cedex - France

Application Manager
+33 (0)2 38 66 84 47
applications@sedere.com

Simultaneous UV (210nm) and ELSD Chromatograms obtained for Stevia Product Containing Erythritol, Steviol Glycosides and Inulin Oligosaccharides



ELSD ADVANTAGES

- **Nearly Universal (Ideal for Unexpected Analyte Detection).**
- **Compatible with Gradients (vs. RID).**
- **Mass Response Detector.**
- **Simple and Robust (Ideal for Method Development).**
- **Optimized for U-HPLC: Peak widths < 1s (SEDEX 85LT).**

LIMITATION

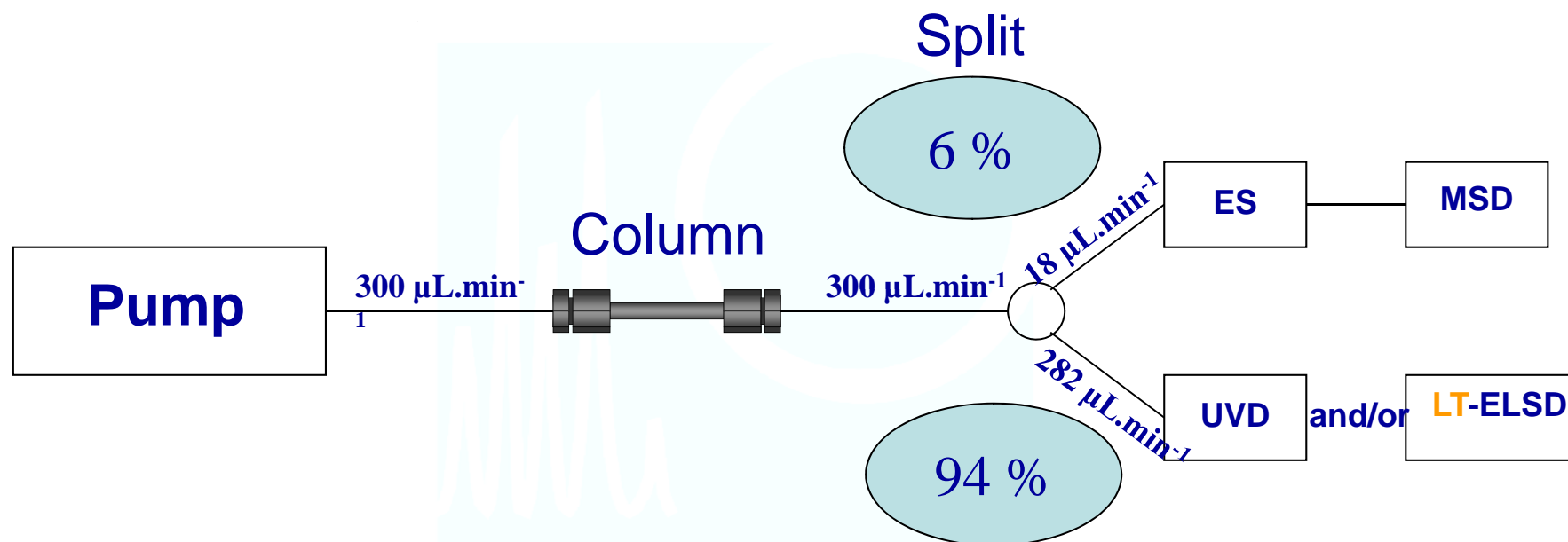
ELSD

- **Mobile Phase without Dry Residue (R.A.E. Preferably below 1ppm).**
- **Sample Volatility.**

UV

- **Mobile Phase without UV Chromophore (Cut-Off).**
- **Sample Chromophore.**

3 detectors (ELSD, UVD, MSD): 2 in series (UVD and LT-ELSD)
and MSD in parallel



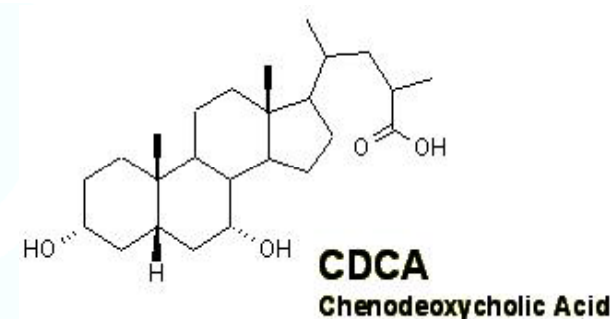
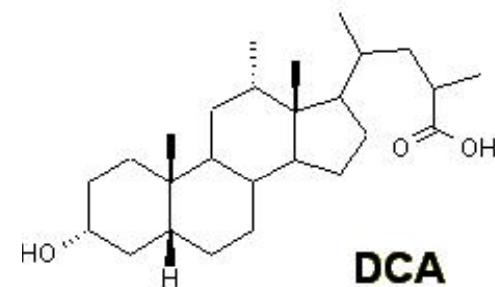
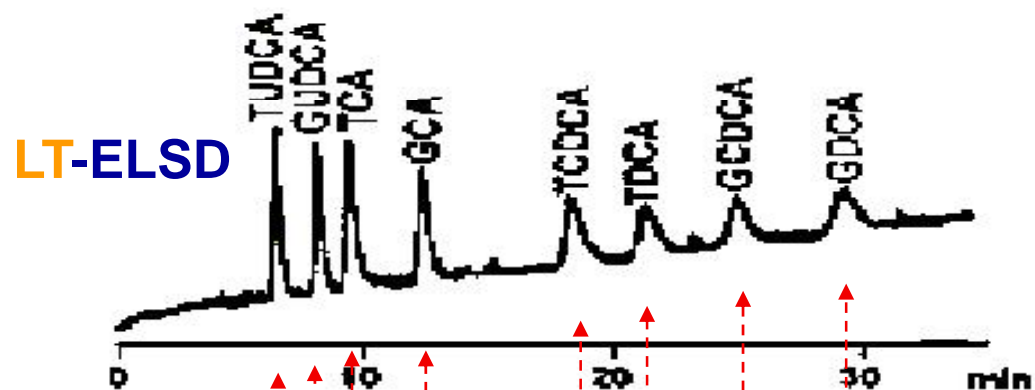
Conditions:

Column: Ultrasphere XL C18, $3 \mu\text{m}$, $70 \times 4.6 \text{mm}$

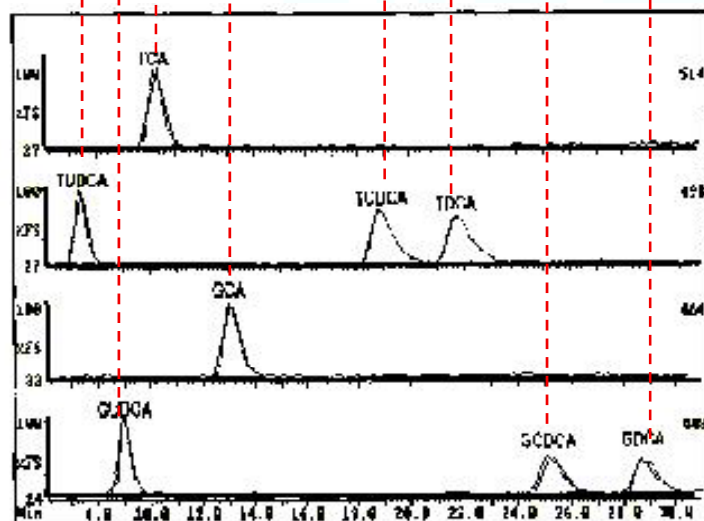
Mobile Phase: MeOH - 15mM pH 5.38 ammonium acetate (66:34)

SEDEX LT-ELSD

SEDEX **LT-ELSD**[™]



MSD



SENSITIVITY
FLEXIBILITY
EXPERIENCE

SEDERE S.A.S.

9 rue parmentier – Parc Volta - BP 27
94141 Alfortville Cedex - France

Application Manager
+33 (0)2 38 66 84 47
applications@sedere.com

Response factor

	UV (192 nm)	RID	ELSD
Ribose	1.76	0.43	1.07
Xylose	1.13	0.81	1.12
Fructose	4.30	0.97	1.10
<i>Glucose</i>	<i>1.00</i>	<i>1.00</i>	<i>1.00</i>
Galactose	1.01	0.48	0.94
Sucrose	0.95	1.05	1.15
Lactose	0.54	0.79	0.97
Maltose	0.02	0.12	1.09
C.V. (%)	97	46	7

LT-ELSD

Pharmaceuticals

Cosmetic, Food...

Molecules

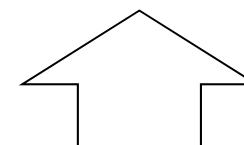
Techniques

Glycerides
Lipids and Phospholipids
Carbohydrates and Polyols
Amino Acids (underivatized)
Peptides, Proteins
Natural compounds
Surfactants
Inorganic ions...

Detectors in series or parallel:
UV + LT-ELSD, MS + LT-ELSD...

Method Development
U-HPLC
Combinatorial Chemistry
Quality Control
Preparative HPLC, Micro HPLC...

Fields



3 or 6 Nebulizers



SENSITIVITY
FLEXIBILITY
EXPERIENCE

SEDERE S.A.S.

9 rue parmentier – Parc Volta - BP 27
94141 Alfortville Cedex - France

Application Manager
+33 (0)2 38 66 84 47
applications@sedere.com

Amino acids do not possess any chromophore.

They are usually detected using pre- or post-column derivatization and Fluorimetric detection.

Since such compounds are not volatile, Evaporative Light Scattering Detection is possible **without any derivatization.**



SENSITIVITY
FLEXIBILITY
EXPERIENCE

SEDERE S.A.S.

9 rue parmentier – Parc Volta - BP 27
94141 Alfortville Cedex - France

Application Manager
+33 (0)2 38 66 84 47
applications@sedere.com

LC / LT-ELSD Determination of Underivatized Amino Acids

Standard mixture: 1. TAU (LOD: 4.8mg/L), 2. SER (LOD: 5.5mg/L), 3. ASP (LOD: 5.8mg/L), 4. GLN (LOD: 11.1mg/L), 5. GLU (LOD: 5.3mg/L), 6. THR (LOD: 5.4mg/L), 7. Gaba (LOD: 2.4mg/L), 8. CYS (LOD: 6.2mg/L), 9. ORN (LOD: 5.1mg/L), 10. LYS (LOD: 7.6mg/L), 11. PRO (LOD: 8.8mg/L), 12. HIS (LOD: 7.6mg/L), 13. THE (LOD: 16.2mg/L), 14. ARG (LOD: 7.1mg/L), 15. VAL (LOD: 9.4mg/L), 16. MET (LOD: 7.9mg/L), 17. TYR (LOD: 9.9mg/L), 18. ILE (LOD: 1.0mg/L), 19. LEU (LOD: 2.7mg/L), 20. NLE (LOD: 3.5mg/L), 21. PHE (LOD: 2.3mg/L), 22. TRY (LOD: 1.1mg/L).

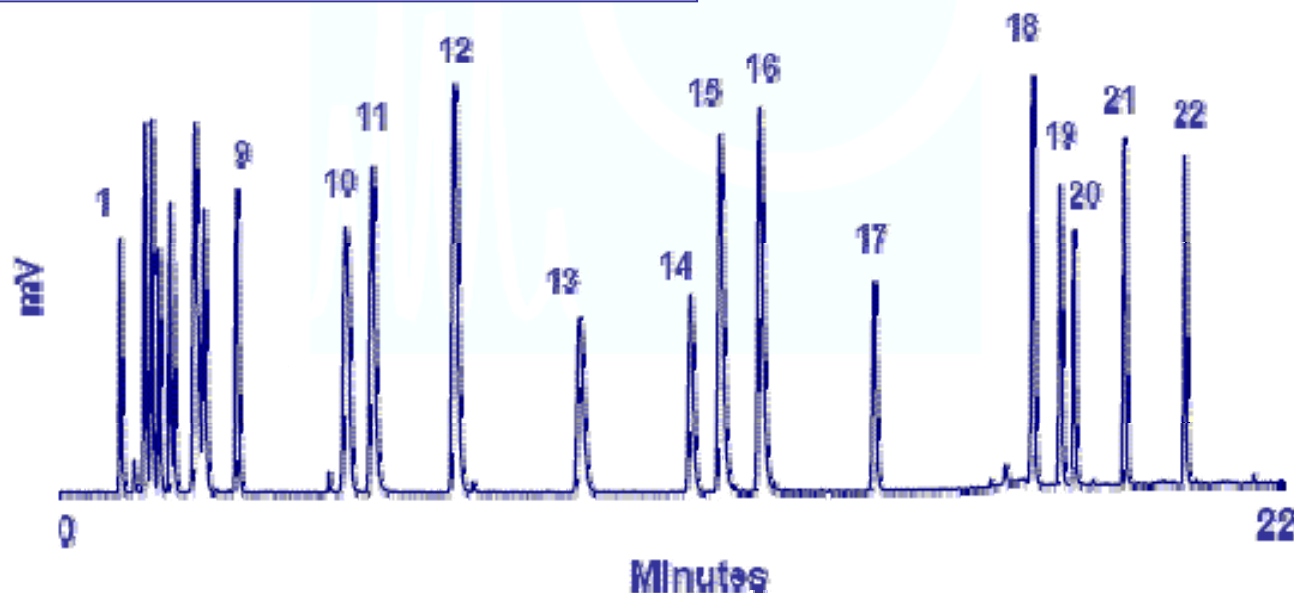
Injection: 2 μ L

Column: Zorbax SB-C18, 2.1x150mm, 1.8 μ m

Eluent: H₂O + 0.5% TFA + 0.3% HFBA (A) / CH₃CN (B), Gradient

Flowrate: 0.3mL/min

Detector: SEDEX 85LT, 40°C, 3.5Bars



Simultaneous LC / LT-ELSD Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins

Standard mixture: B1 (LOD: 1.9mg/L), C (LOD: 1.5mg/L), B6 (LOD: 1.0mg/L), B5 (LOD: 2.8mg/L), B9 (LOD: 3.2mg/L), Caffeine (LOD: 3.8mg/L), B12 (LOD: 4.5mg/L), B2 (LOD: 1.8mg/L), B7 (LOD: 1.9mg/L), A (LOD: 1.4mg/L), D2 (LOD: 13.1mg/L), D3 (LOD: 9.1mg/L), E (LOD: 21.0mg/L), K1 (LOD: 26.3mg/L), in DMSO.

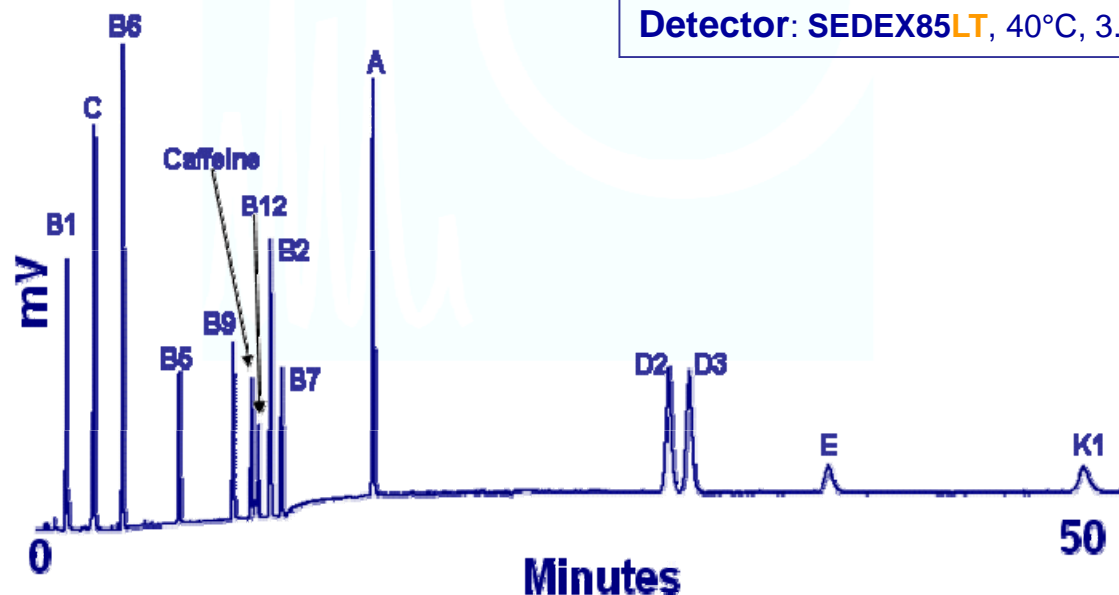
Injection: 10µL

Column: TSKgel ODS 100-Z, 4.6x150mm, 5µm

Eluent: H₂O + 0.5% HCOOH (A) / CH₃CN (B), Gradient

Flowrate: 1mL/min

Detector: SEDEX85LT, 40°C, 3.5Bars



Simultaneous LC / LT-ELSD Determination of Inorganic Anions and Cations

Standard mixture: 1. NO₃ (LOD: 2.6mg/L), 2. Cl (LOD: 2.3mg/L), 3. K (LOD: 5.1mg/L), 4. Na (LOD: 0.9mg/L), 5. PO₄ (LOD: 15.8mg/L), 6. SO₄ (LOD: 2.4mg/L), 7. Mg (LOD: 0.3mg/L), 8. Ca (LOD: 0.7mg/L).

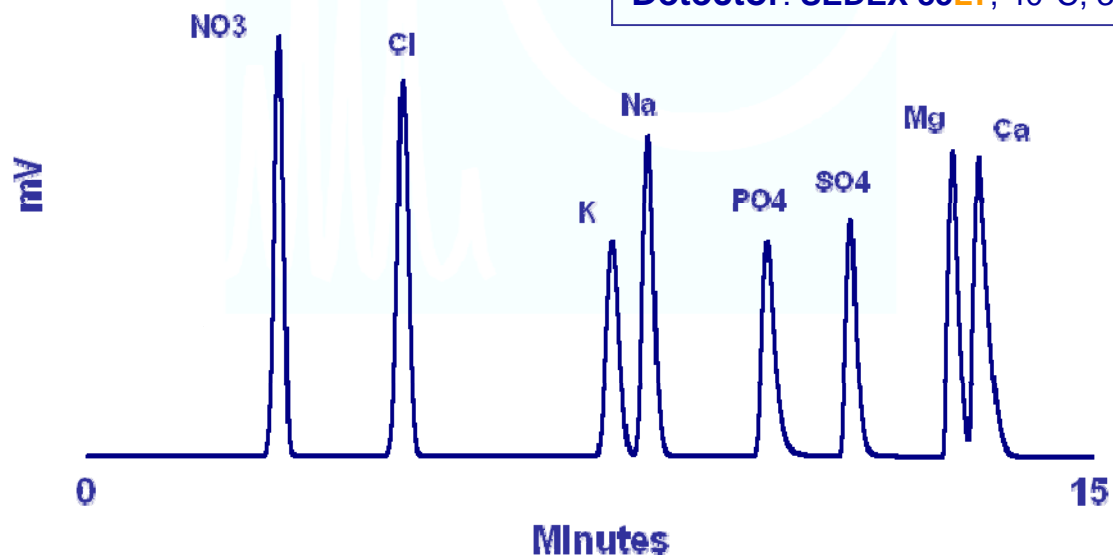
Injection: 2µL

Column: SeQuant ZIC-HILIC, 2.1x150mm, 3.5µm

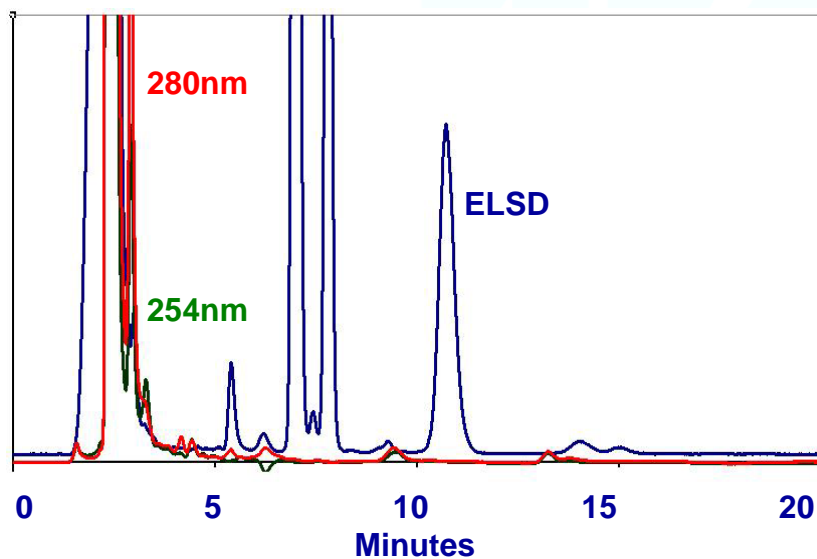
Eluent: CH₃CN (A) / H₂O (20mM Ammonium Formate, pH3) (B) , Gradient

Flowrate: 0.3mL/min

Detector: SEDEX 85LT, 40°C, 3.5Bars



Green Tea Leaf Extract



Injection: 10 μ L

Column: Shodex AsaHipak, NH2P-50 4E
(4.6x250mm, 5 μ m)

Eluent: H₂O / CH₃CN, Gradient

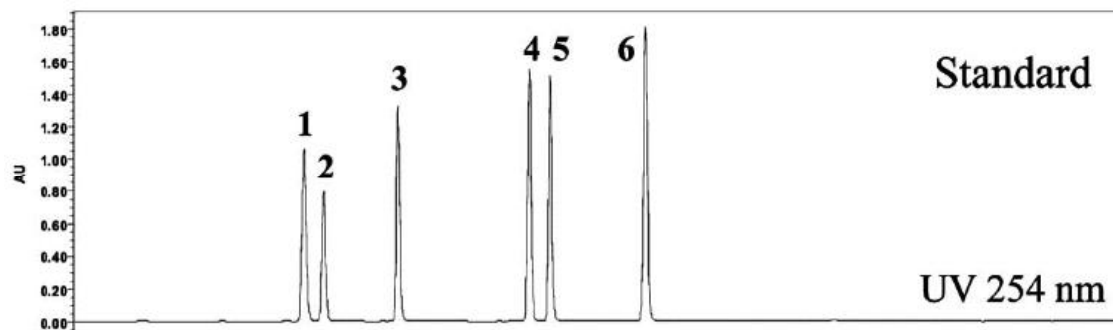
Flowrate: 1mL/min

Detector: SEDEX 85LT, 30°C, 3.5bars

LC / LT-ELSD Analysis of Biologically Active Compounds from Soya

Isoflavones:

- 1.Daidzin
- 2.Glycitin
- 3.Genistin
- 4.Daidzein
- 5.Glycitein
- 6.Genistein



Saponins:

- 7.Soyasaponin I
- 8.Soyasaponin II
- 9.Soyasaponin III
- 10.Soyasaponin IV

LOD = 5ng

LOD = 100ng

Conditions:

C18, 5µm, 150 x 4.6mm
water + 0.05% TFA / acetonitrile
1mL/min

SEDEX 75LT

Pressure: 3.5Bar
Temperature: 35°C



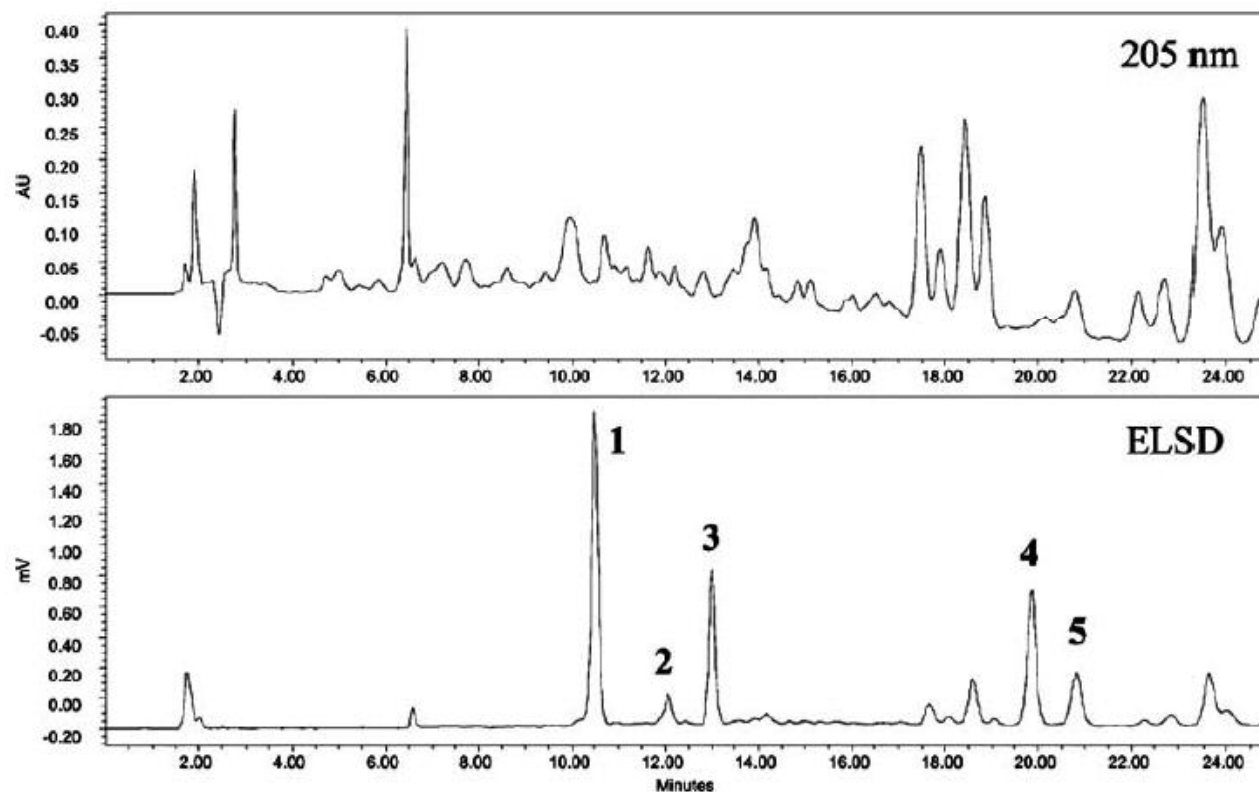
SENSITIVITY
FLEXIBILITY
EXPERIENCE

SEDERE S.A.S.

9 rue parmentier – Parc Volta - BP 27
94141 Alfortville Cedex - France

Application Manager
+33 (0)2 38 66 84 47
applications@sedere.com

LC / LT-ELSD Analysis of Terpene Lactones in a Crude Ginkgo Biloba Extract



Solutes:

1. bilobalide
2. ginkgolide J
3. ginkgolide C
4. ginkgolide A
5. ginkgolide B

LOD = 150ng

Conditions:

C12 column, 5 μ m,
250 x 4.6mm
NH₄ acetate (pH=5),
MeOH, isoBuOH
1mL/min

SEDEX 75LT

Pressure: 2.4Bar
Temperature: 45°C