



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

Mr François Bretin, Chimie Médicinale Oncologie,
Sanofi-aventis R & D Vitry-sur-Seine

Mr Francis Maquin, Analytical Sciences Paris,
Sanofi-aventis R & D Vitry-sur-Seine



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

- **Optimisation solvant et débit**
 - MeOH/H₂O/HCOOH (95/5/0.5%) à 0.4 ml/mn
- **Choix du piston (piston ovale)**
 - Plus adapté aux produits proches
 - Rétention de la silice
 - Maintenance plus fréquente



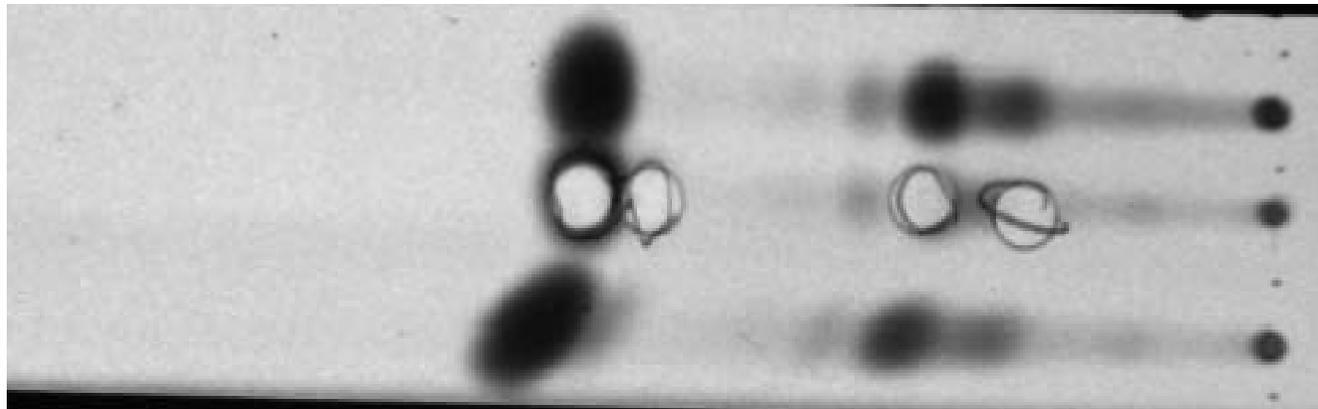


Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience



Piston rond

- La silice reste sur la plaque (désorption)
- Maintenance moins fréquente
- Mais moins adapté aux produits très proches





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

■ Problèmes majeurs (utilisateurs)

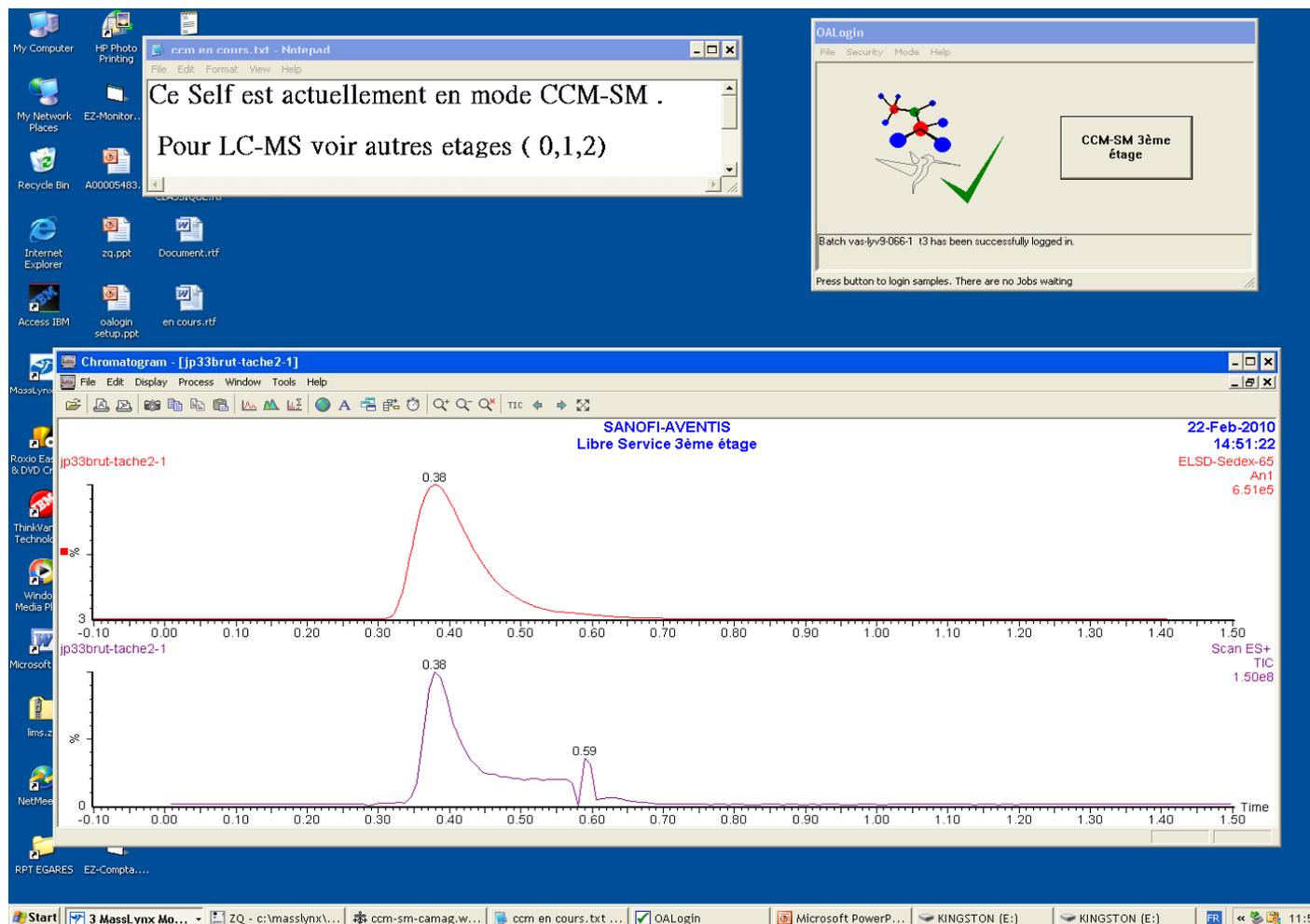
- Passage de 4 LC/MS à 3 LC/MS + CCM/MS

■ Outil complémentaire de la LC/MS (avantages)

- Rapidité: durée d'analyse de 1.5 mn
- Visualisation instantanée de la masse pendant l'acquisition
- Récupération de l'analyse sur l'intranet

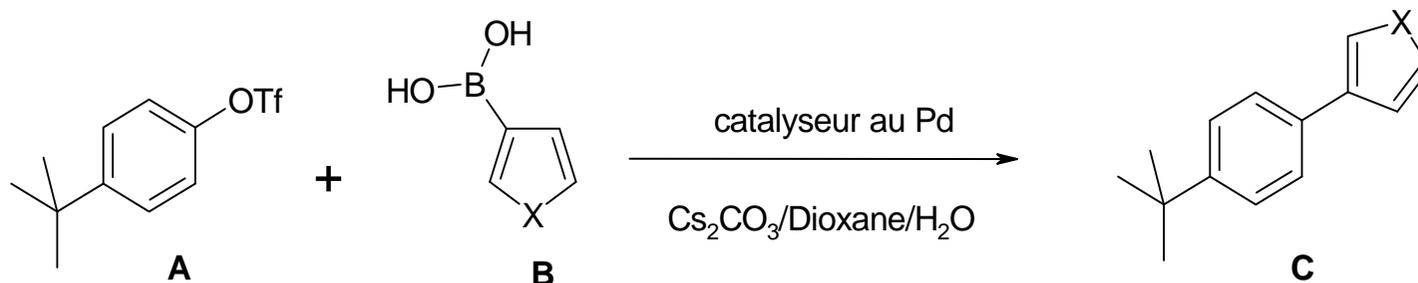


Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience





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



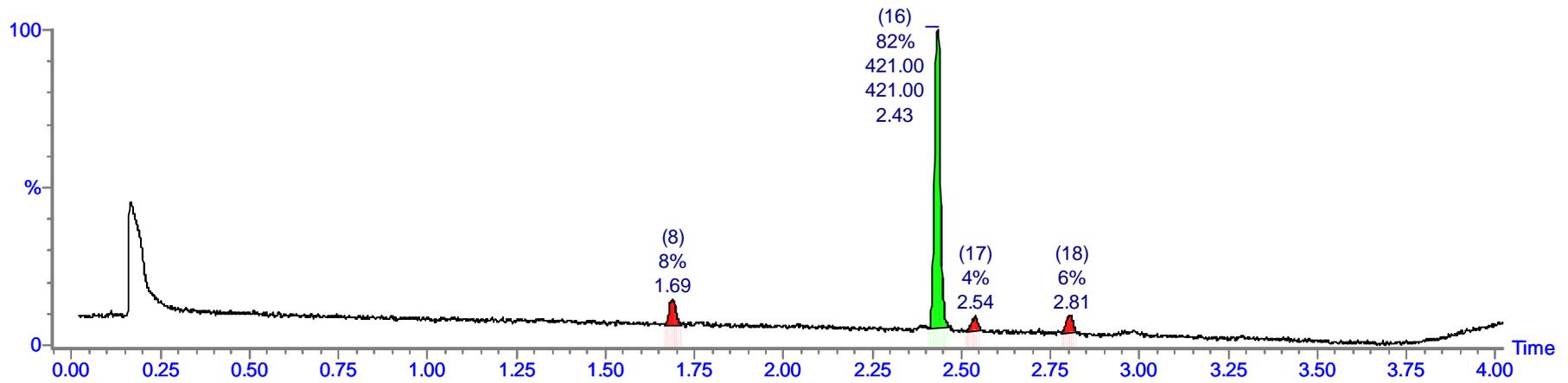
Suivi de réaction par CCM et LC/MS



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

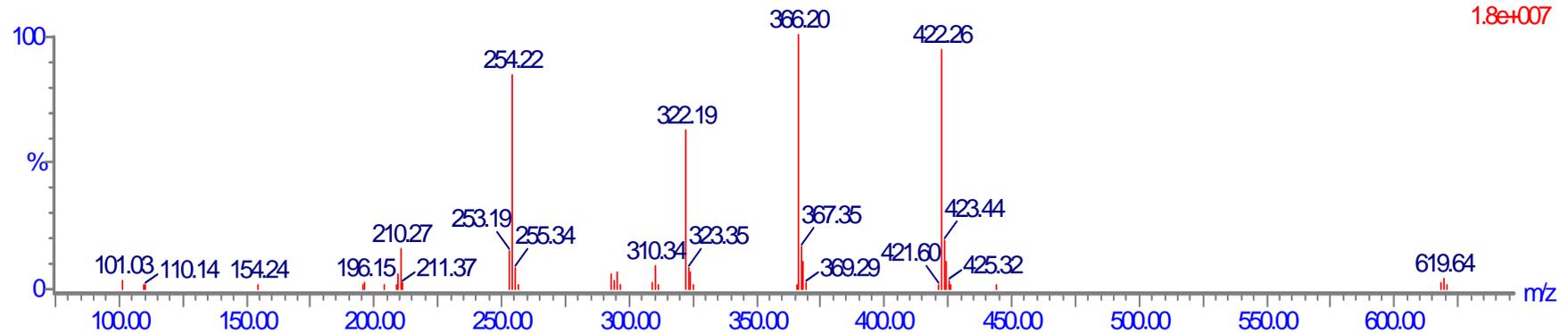
3: DAD: TIC

2.5e+008



Combine (694:724-(640:655+773:788))

1:MS+
1.8e+007

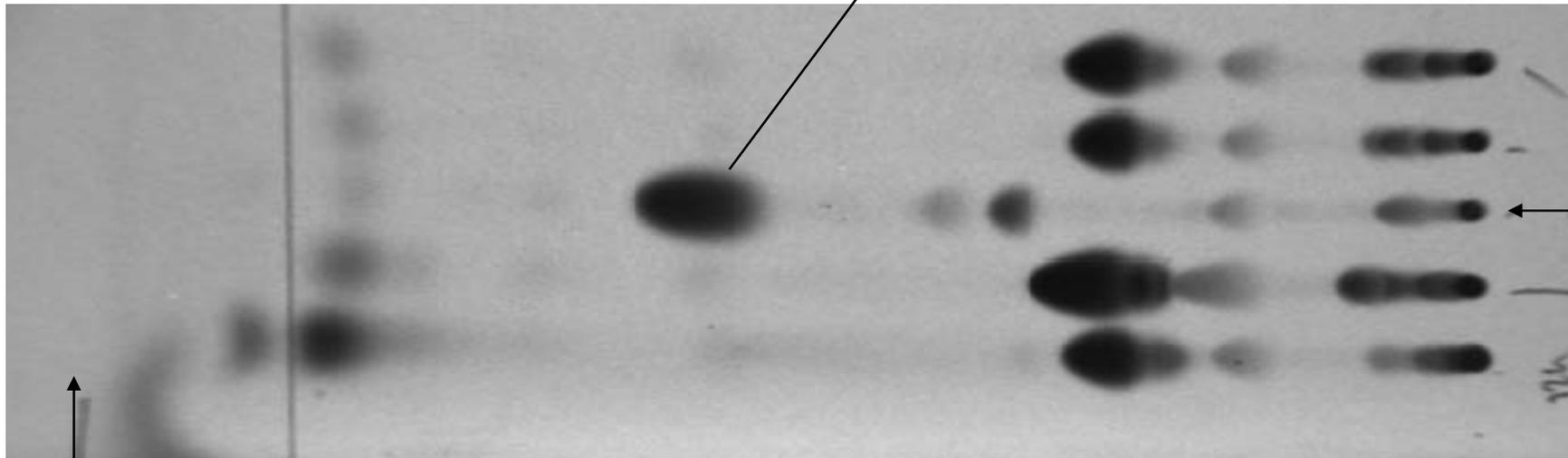
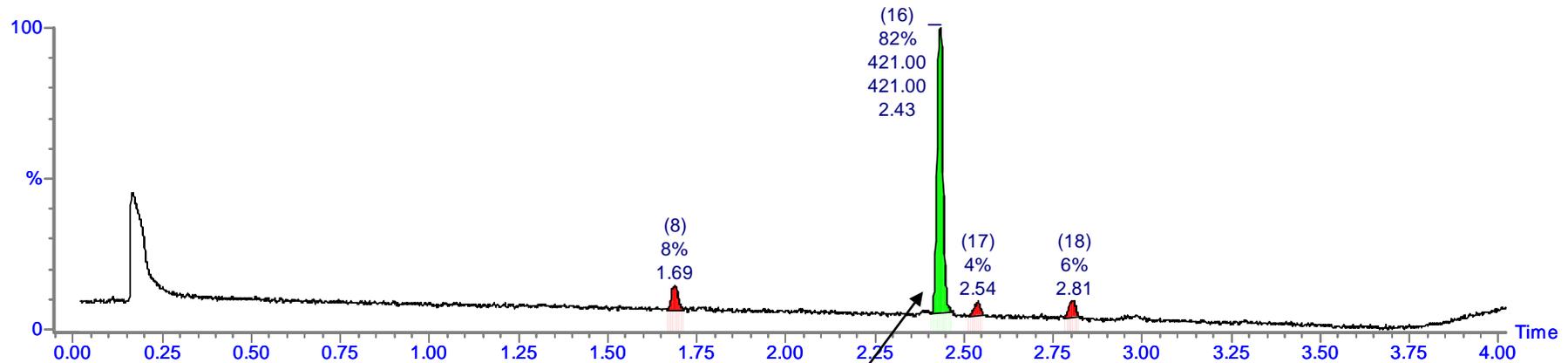




Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience

3: DAD: TIC

2.5e+008

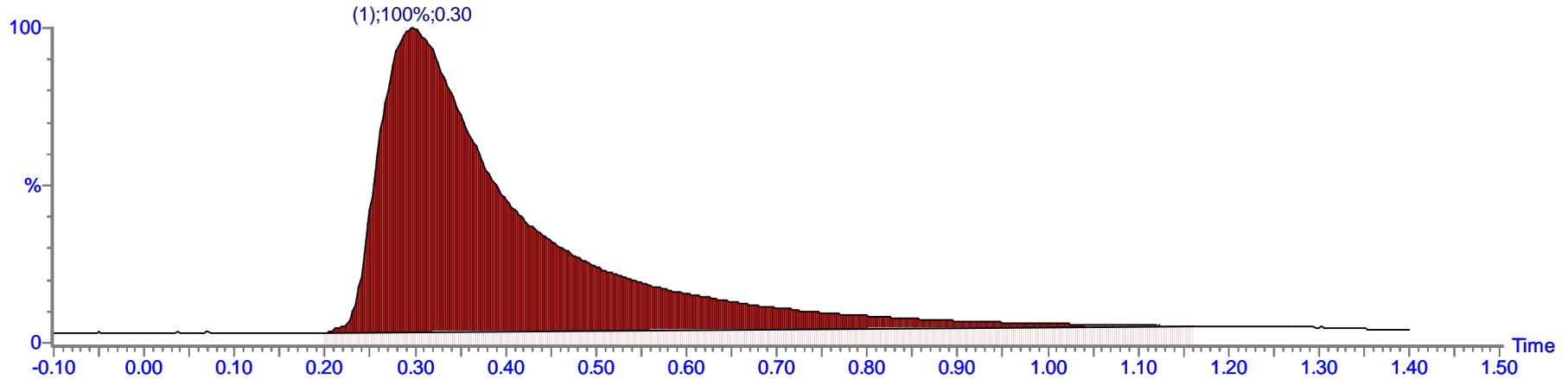




Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : retour d'expérience

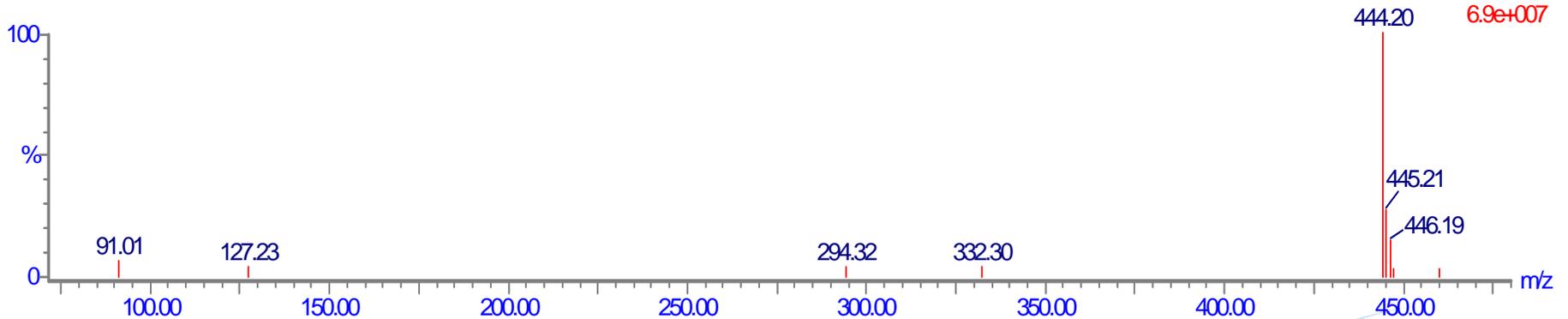
ELSD-Sedex-65

5.0e+005



Combine (15:21)

1:MS/ES+
6.9e+007





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

■ Technique complémentaire à la LC/MS

- Transposition plus rapide pour la purification
- Pas de problème d'inversion de pics
- Sensibilité très intéressante car moins de dilution



Couplage CCM-SM ou CCM-SM-ELSD (DAD)

Francis MAQUIN

Octobre 2010

sanofi aventis

L'essentiel c'est la santé.



Couplage CCM-SM ou CCM-SM-ELSD (DAD)

■ l'absence de signal SM-électrospray d'un spot donne plusieurs hypothèses :

☺ la pression LC est élevée (sup à 40bars) bouchage du piston : nettoyage ultrasons/inversion éluant pour éliminer le dépôt de silice sur piston (*voir manuel instruction Camag*).

Après cette intervention, la pression LC doit revenir dans une plage du type 4-15 bars.

☹ la pression LC est normale : la configuration CCM-SM ne permet pas d'estimer le rendement d'extraction du spot CCM ; la concentration du spot CCM est insuffisante ; le spectromètre de masse est la cause du problème ; mauvais paramétrage des paramètres d'acquisition (domaine de masse ; polarité positif/négatif) ; structures associées au spot ne s'ionisant pas sous SM-électrospray (hydrocarbures ; aliphatiques ; structures volatiles..).



Couplage CCM-SM ou CCM-SM-ELSD (DAD)

Afin d'éviter de longues heures à tenter d'identifier l'absence de résultats SM, il faut envisager une configuration du type CCM-SM-ELSD.

(d'après nos essais, le signal UV est trop peu sensible/représentatif des structures isolées par CCM).

L'ELSD (*détecteur à diffusion de lumière*, www.sedere.com / Sedere Sedex 85 LT) est idéal pour le couplage CCM-SM : sensibilité optimale pour débit 0,1 à 0,6 ml/minutes ; compatible tous solvants ; réponse assurée pour aliphatiques ; phtalates ; lipides ; terpenes ; volatils....



Couplage CCM-SM ou CCM-SM-ELSD (DAD)

Comme démontré par Mr F. Bretin, nous suivons en simultanée les profils d'évaporation SM, ELSD :

- l'absence de profil ELSD signifie la non désorption du spot CCM via l'interface CCM.
- La présence de profil ELSD en l'absence de signal SM s'explique par : la non ionisation de la structure, un défaut de fonctionnement du spectromètre de masse... *(L'intensité du profil ELSD nous donne une indication sur la concentration associée au spot CCM).*



Evolution & Développement possibles pour l'interface CCM-SM Camag

Francis MAQUIN

Octobre 2011



Evolution & Développement possibles pour l'interface CCM-SM Camag



✓ Piston rond/ovale : mise en place de tests après fabrication pour limiter des problèmes du type “décollement de la silice” autour du spot sélectionné : à discuter avec Chromacin (*P.B Savary*) et Camag (*Support & Service, Mr. U. Bloesch*).



✓ Remplacement optionel de la vanne rheodyne manuelle de l'interface Camag par une vanne rheodyne automatique OEM (**Original Equipment Manufacturer**) (= rheodyne MXP 7900-000 sans son boîtier) les contacts closures servant à l'automatisation de l'ensemble CCM-SM. Avec cette vanne rheodyne OEM, il serait toujours possible de travailler en mode manuel via un montage électrique basic associant un interrupteur par exemple.



Evolution & Développement possibles pour l'interface CCM-SM Camag

- ✓ Etude détaillée de l'éluant entrant dans l'interface CCM-SM Camag : méthanol/eau/acetonitrile/isopropanol ; pourcentage du mélange ; débit de l'éluant ; ajout ou non d'acide formique, TFA ; influence du pourcentage d'eau sur la découpe du spot via le piston Camag (= Camag plunger).
A notre connaissance, aucune publication/note d'application n'est disponible sur ce sujet : dommage ...
- ✓ Pompe LC optionnelle (pompe binaire, tertiaire ou quaternaire) spécifiquement adaptée aux conditions expérimentales de l'interface CCM-SM Camag (débit inférieur à 0,6 ml/minute)
- ✓ Optimisation de visualisation spot CCM : micro lampe, camera



Evolution & Développement possibles pour l'interface CCM-SM Camag



- ✓ Automatisation du déplacement de la plaque CCM (avec visualisation des spots intéressante via micro-camera et autres..) complémentaire de la vanne Rheodyne OEM : complexité de ce système, prix, faisabilité, fiabilité ...



Remerciements :

Club de chromatographie CCM :

Mme Louise Vicard ; Mr Pierre Bernard-Savary
(chromacim-Camag France).

MMs Claude Kugel & Bertrand Monégier, Sciences Analytiques Paris,
Sanofi-aventis R & D, Vitry-sur-Seine.

MMs Vincent Leroy, Laurent Schio, Chimie Médicinale Oncologie,
Sanofi-aventis R & D, Vitry-sur-Seine.