

# ***Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD***

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

Mr Maquin François ; Analytical Sciences Paris ;  
Sanofi ; Vitry sur Seine .

# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD

Configuration retenue: CCM-CAMAG-split-ELSD/SM :Nov. 09



## Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD

---

- Après différentes analyses de taches CCM-SM (structures organiques, domaine de masse : 100-1200) 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...

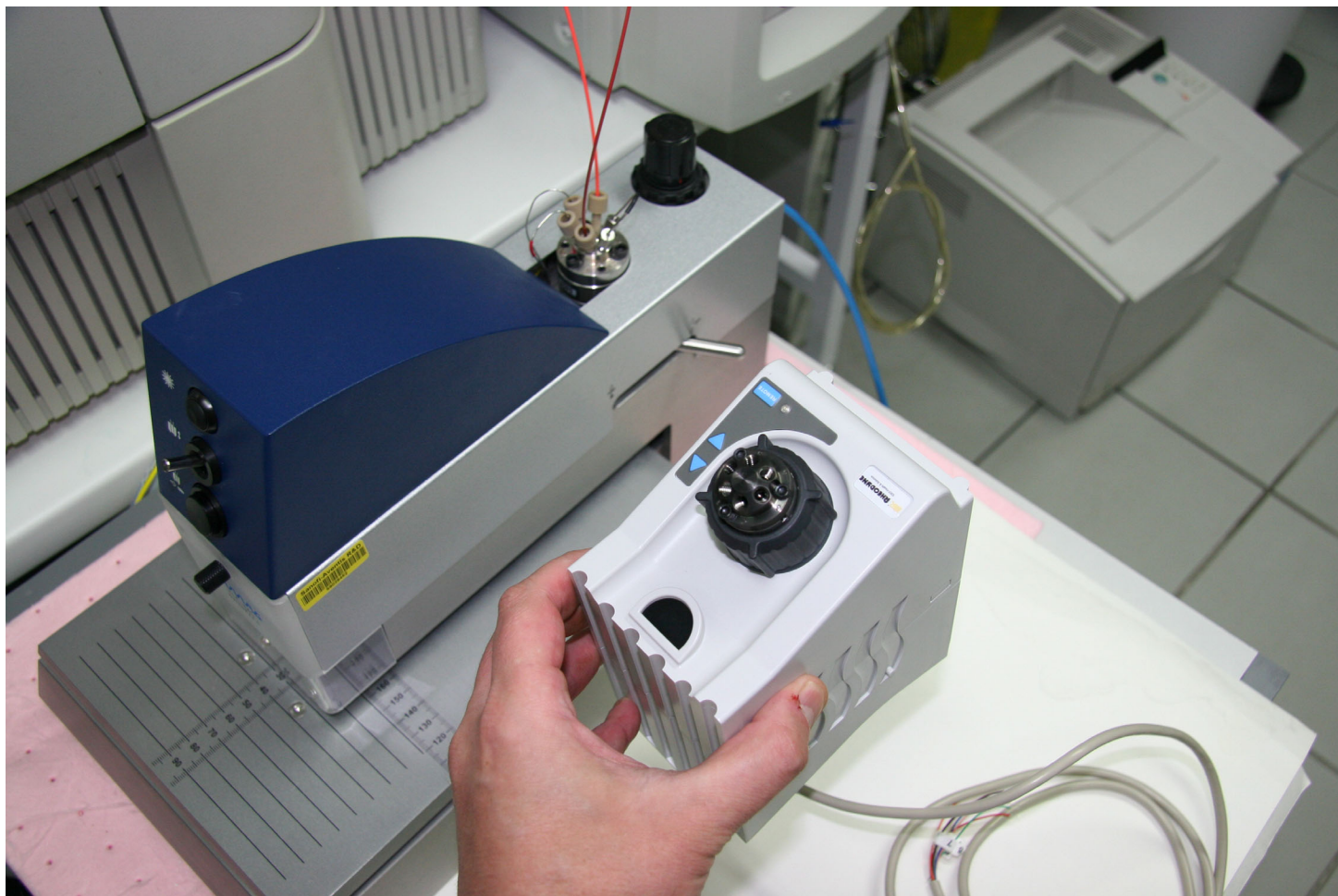
# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD

---



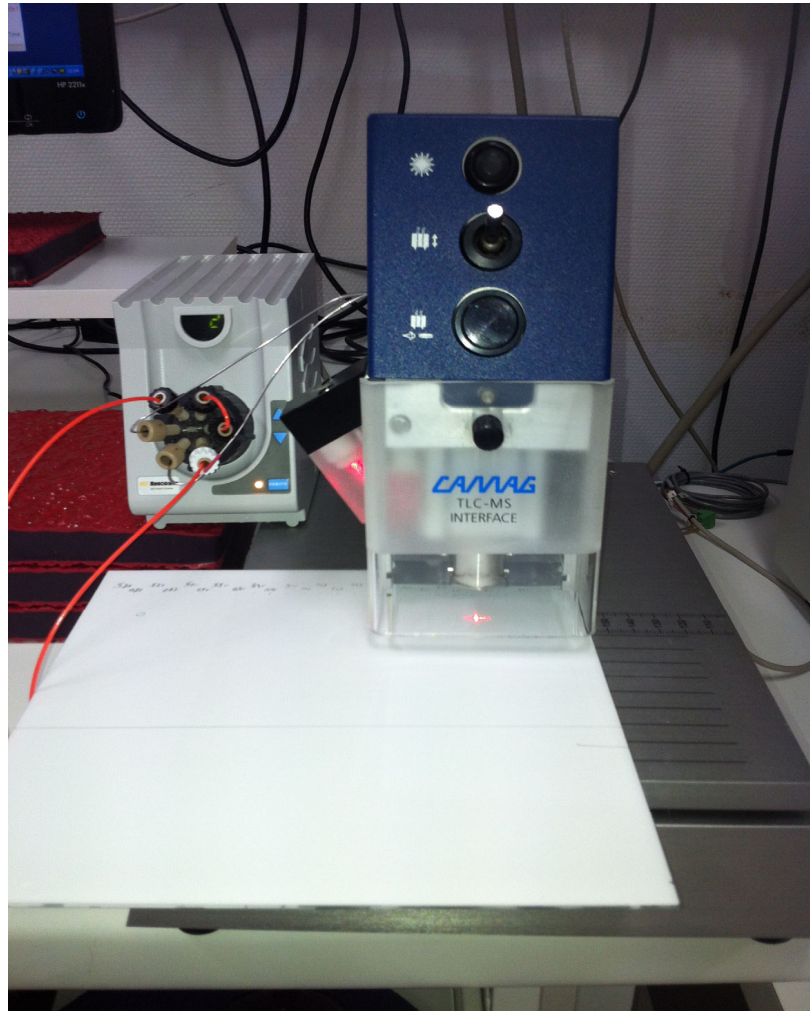
Interface CCM/SM

## Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD



Vanne rhéodyne automatique

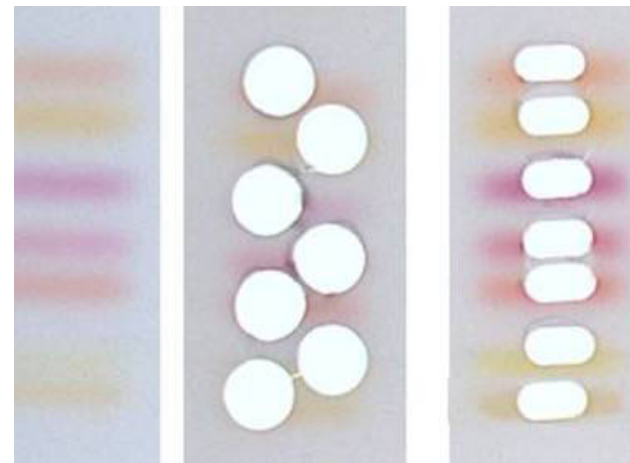
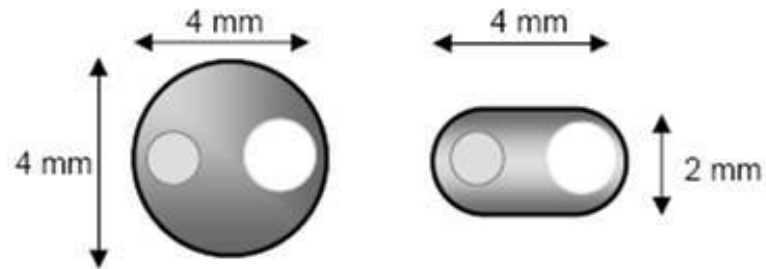
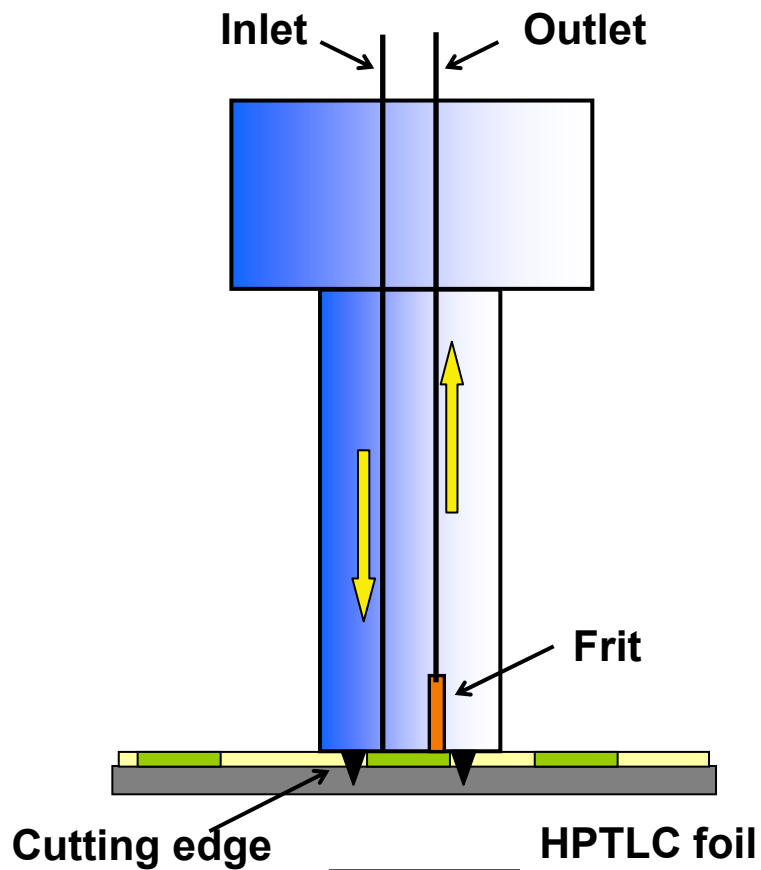
# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD



Pointeur laser

# Couplages HPTLC-MS

## ● Tête d'extraction



## Choix du piston:

### piston ovale

#### Avantage:

- Plus adapté aux produits proches

#### Inconvénients:

- Rétention de la silice
- Maintenance plus fréquente





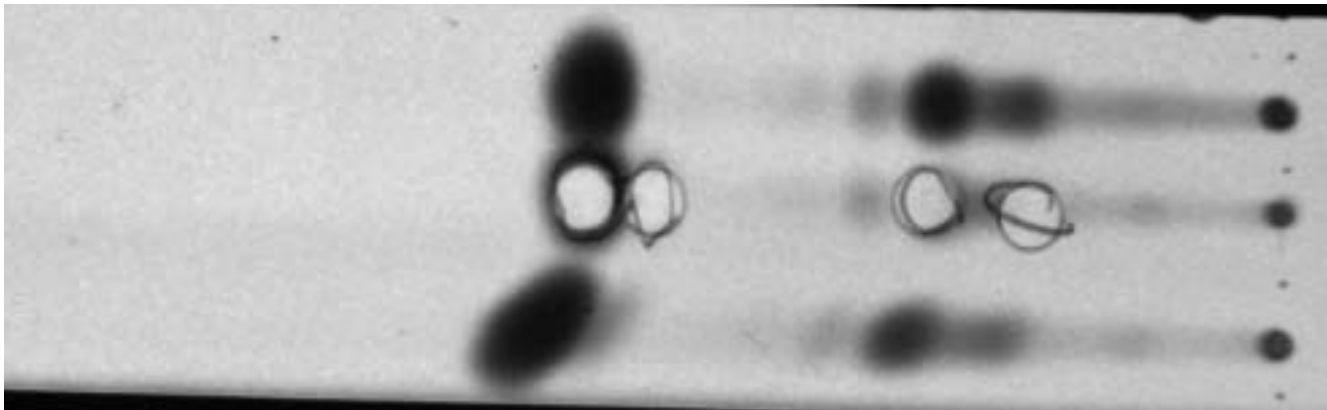
## Piston rond

### Avantages:

- La silice reste sur la plaque (désorption)
- Maintenance moins fréquente

### Inconvénient:

- Mais moins adapté aux produits très proches



## *Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD*

---

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

- **Durée d'une acquisition CCM-SM-ELSD : 1,5 minutes.**
- **Eluant : méthanol / H<sub>2</sub>O (98/2)  
(pour maintenir un rendement d'ionisation electrospray optimal)**
- **Débit éluant en sortie pompe LC-Waters-Alliance : 0,35 mL/mn (valeur compatible : 0,3-0,5 mL/minute).**
- **Pression LC associée débit 0,35 ml/mn : 11 - 15 bars (l'augmentation pression/perte de charge est un bon indicateur de l'entraînement de silice ou d'un bouchage (au-delà de P= 40 bars changement du fritté Upchurch conseillé ou backflush).**
- **ELSD Sedere : gaz de nébulisation : azote ; pression de nébulisation P= 3,7 bars ; température d'évaporation = 32°C-35 °C .**

# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD

The screenshot displays a Windows desktop environment. On the left, a vertical taskbar contains various application icons. The central focus is a Microsoft Word window titled 'soufflette.rtf' containing the following text:

**N'oubliez pas** après chaque utilisation d'actionner la soufflette pendant **au moins 5 secondes** afin de bien nettoyer le système.

**De plus**, veillez à ce que la lumière rouge permettant de cibler la tâche soit bien éteinte après usage (ré-appuyez sur l'interrupteur si besoin).

To the right of the Word window is an 'OALogin' window showing a 'Self CCM-SM-ELSD' button and a message: 'Batch VAC-MRR8-144-C has been successfully logged in. Press button to login samples. There are no Jobs waiting.'

At the bottom of the desktop is a 'Chromatogram' window for '[FBN-061-SP3-1]'. It features three stacked chromatograms with the x-axis labeled 'Time' ranging from -0.20 to 1.50. The top plot (purple) shows a peak at 0.33. The middle plot (green) shows peaks at 0.30, 0.42, 0.48, 0.88, and 1.30. The bottom plot (red) shows peaks at 0.01, 0.32, 0.41, 0.95, and 1.32. On the right side of the chromatogram window, the following data is displayed:

15-Apr-2013  
11:41:14  
ELSD-Sedex-65  
An1  
1.00e6

2: Scan ES-TIC  
6.76e6

1: Scan ES+  
TIC  
2.05e8

The Windows taskbar at the bottom shows several open applications, including 'soufflette.rtf - Micros...', 'sor.rtf - Microsoft Word', 'MassLynx - DEFAULT ...', 'Chromatogram - [FBN...', 'OALogin Manager', 'ccm-sm-camag-autom...', 'ZQ - c:\masslynx\def...', and 'OALogin'.

## Interface informatique

## ● Types d'ions observés:

### ● En mode positif:

- $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+(\text{solvant})+H]^+$ ,  $[2M+H]^+$
- $[M+2H]^{2+}$
- Fragments

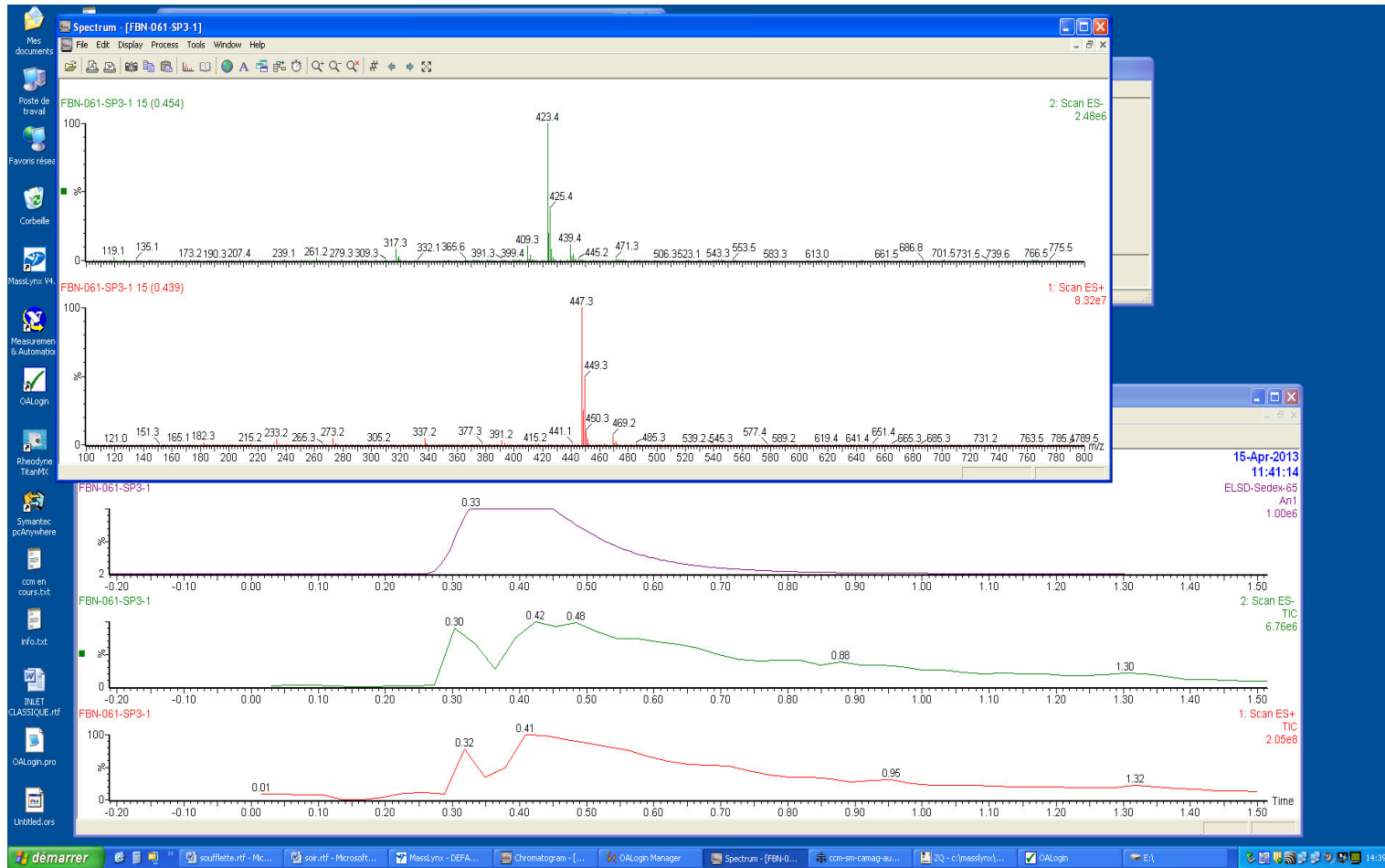
### ● En mode négatif:

- $[M-H]^-$ ,  $[M+(\text{solvant})-H]^-$ ,  $[2M-H]^-$
- $[M-2H]^{2-}$

## ● Concentration en échantillon:

- S'il n'y a pas de concentration "idéale", la moyenne nécessaire à l'obtention d'un spectre se situe autour de 50 picomoles/ $\mu\text{l}$  (# 10  $\mu\text{l}$  à  $10^{-3}$  M).

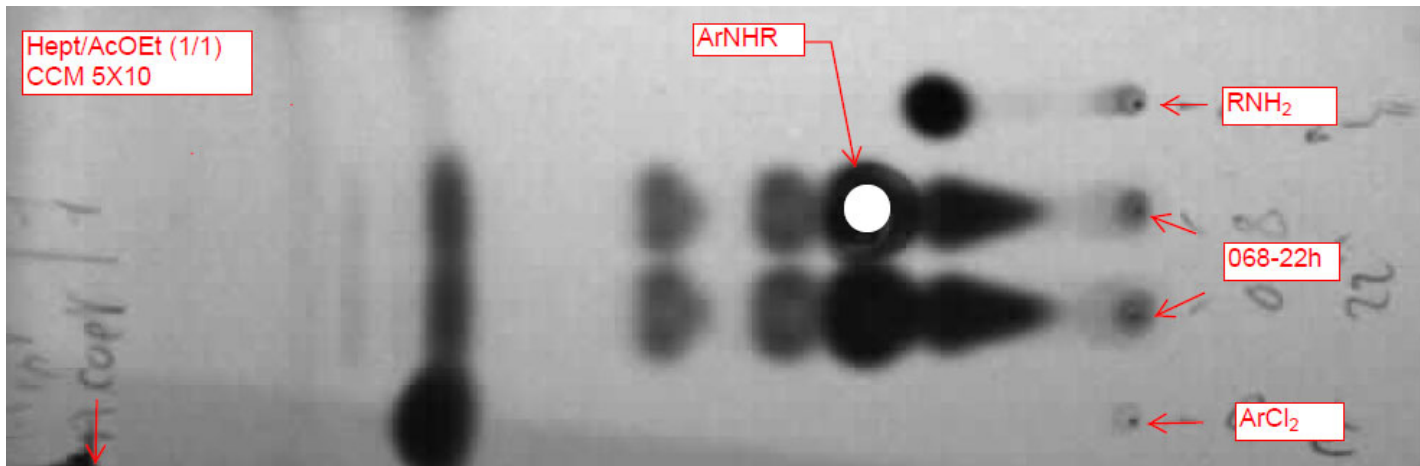
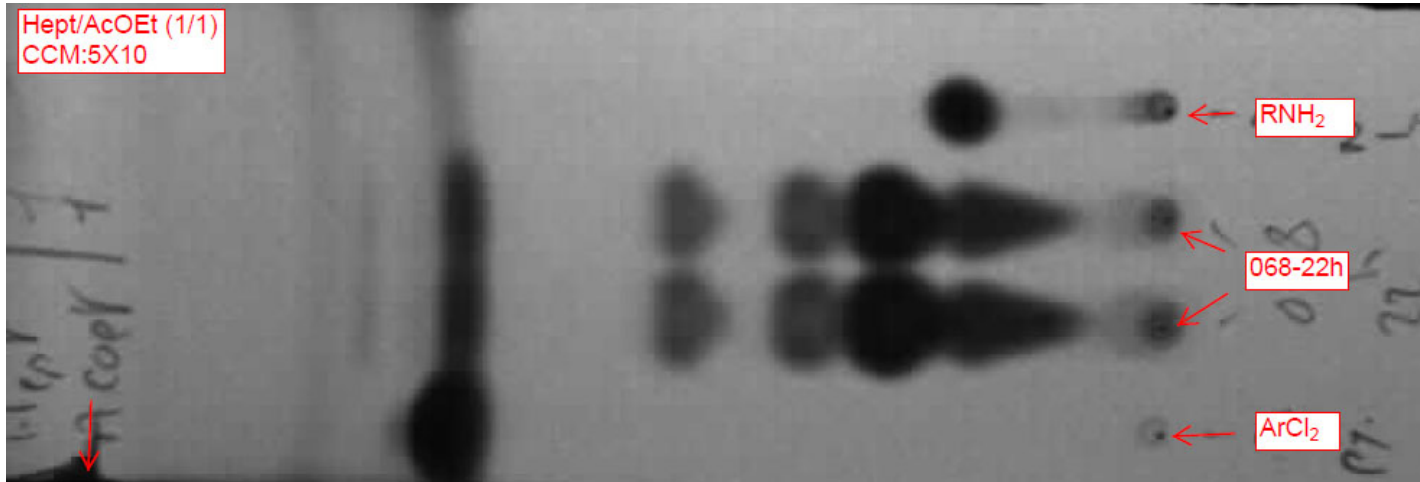
# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD



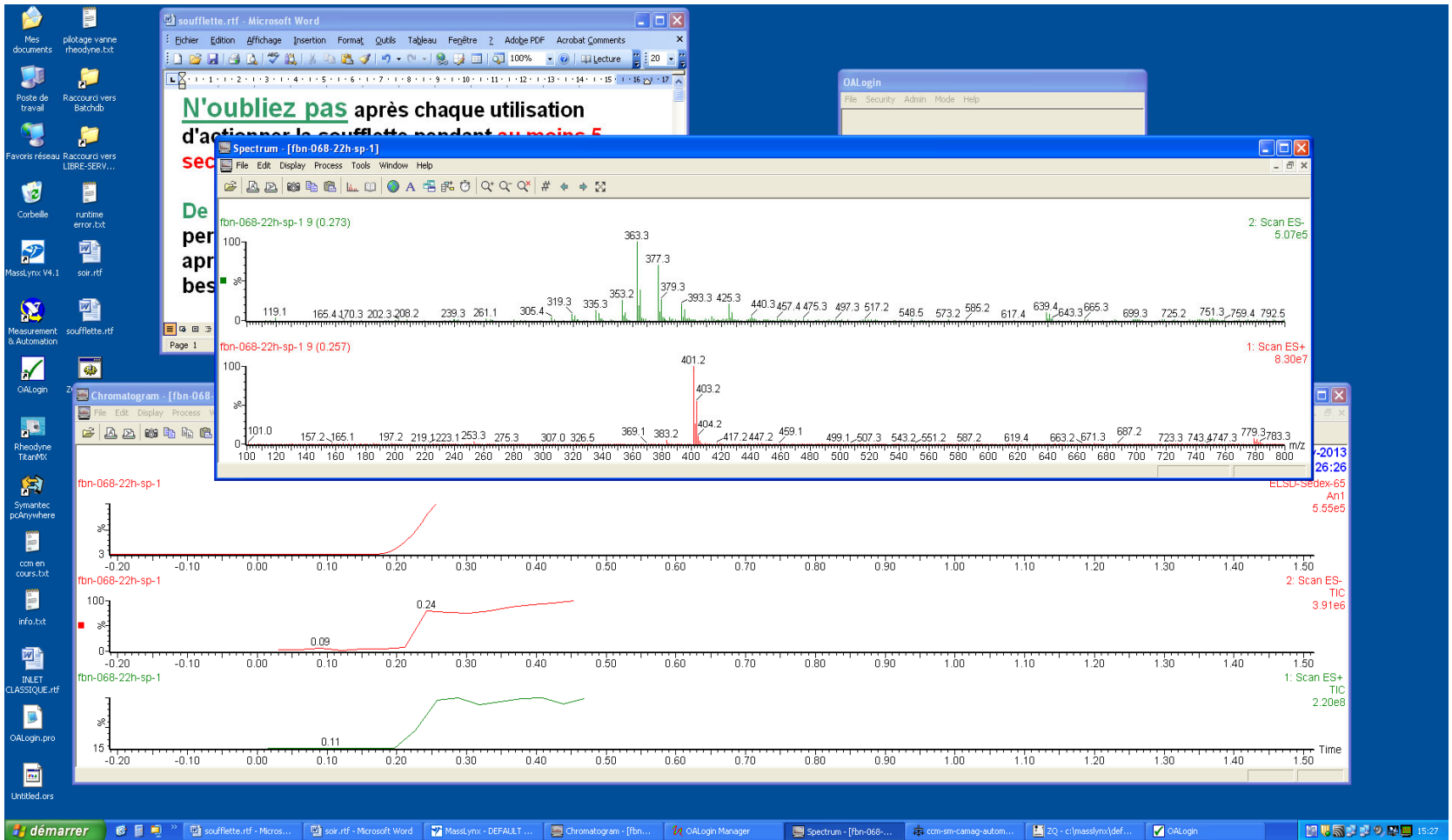
Types d'ions observés:  $[M+Na]^+$ ,  $[M-H]^-$

# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD

- Suivi de réaction:

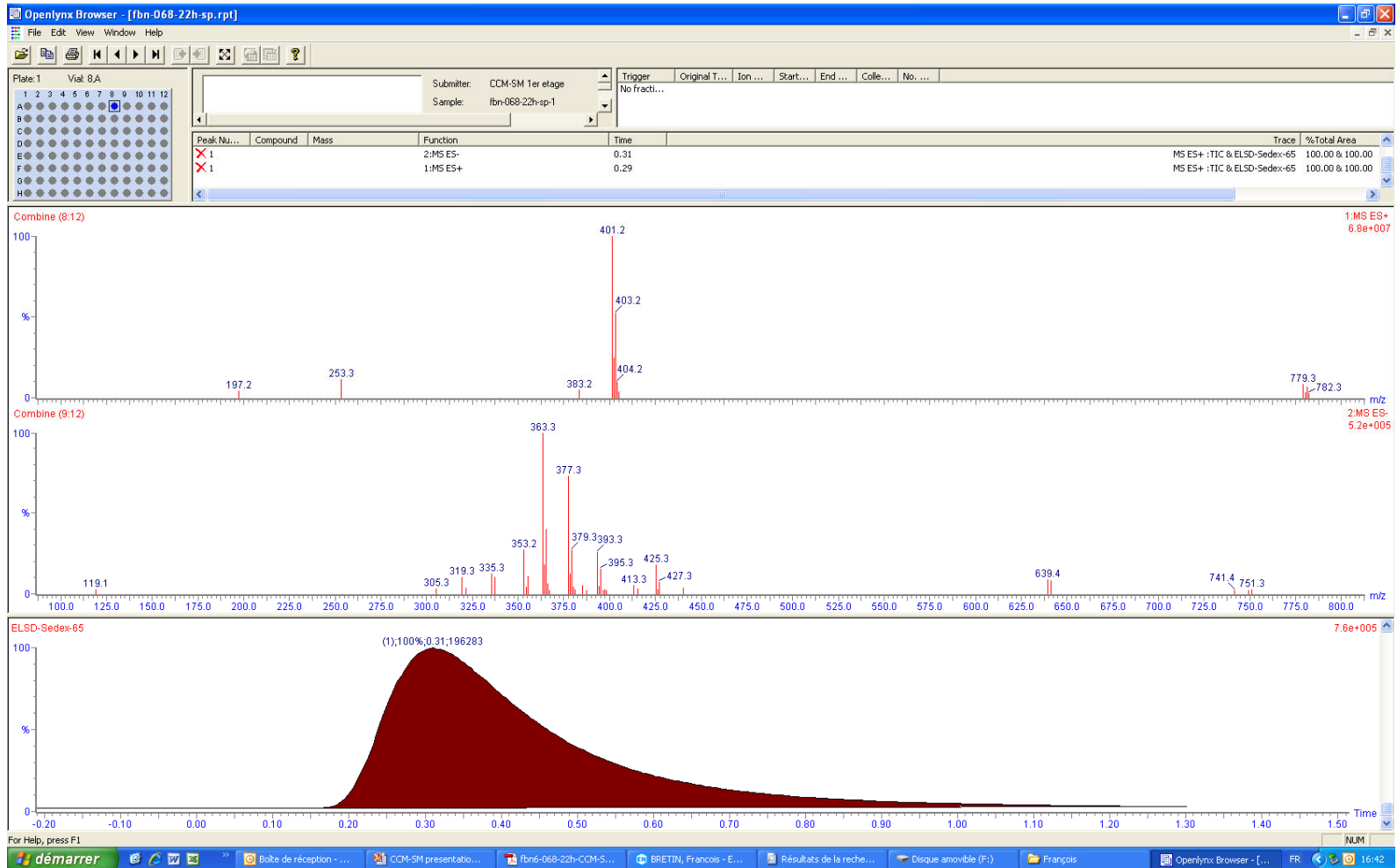


# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD



Détermination de la masse en cours d'acquisition M=378

# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD

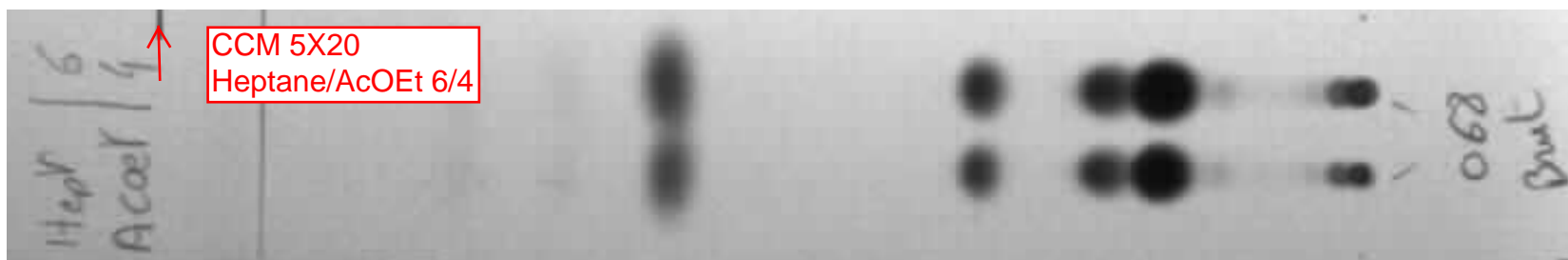


Récupération des résultats sur l'intranet

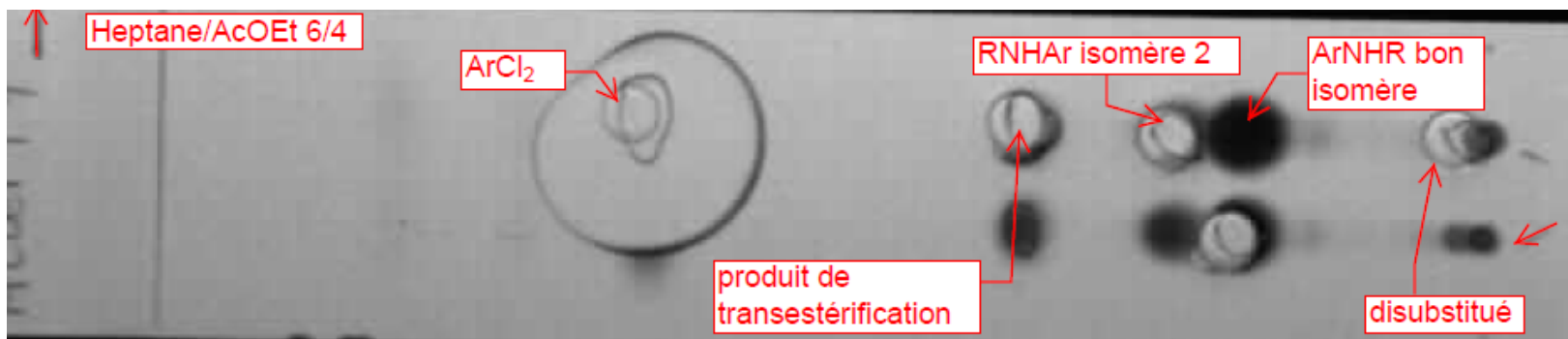


# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD

## ● Avant extraction:



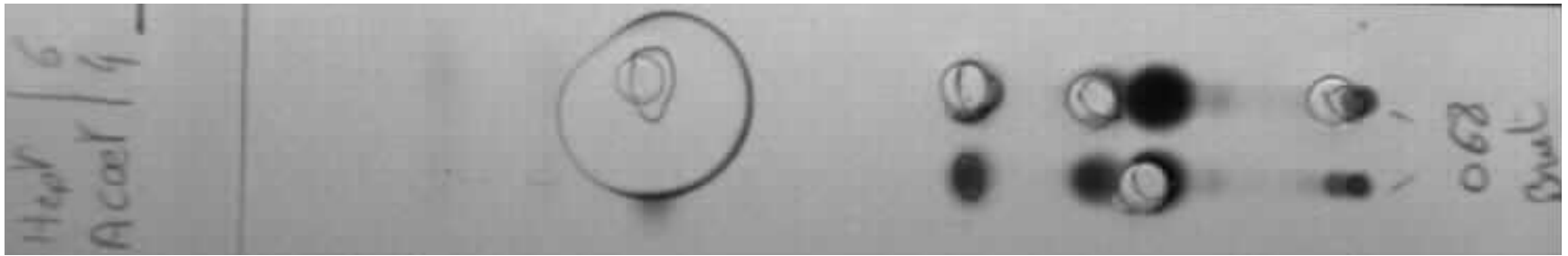
## ● Après extraction:



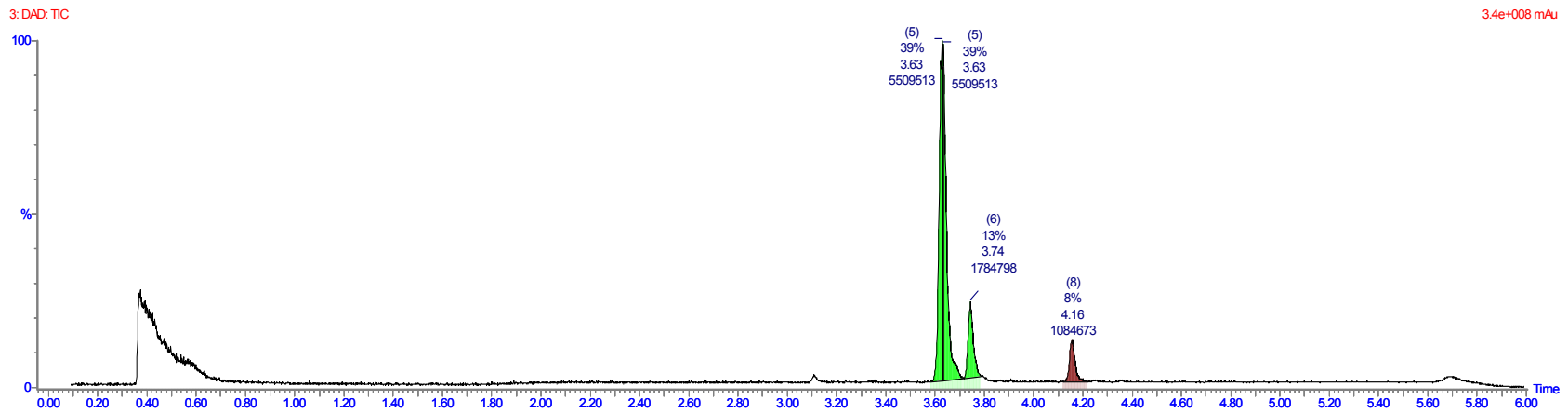
Analyse de la CCM

# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD

- CCM/SM:

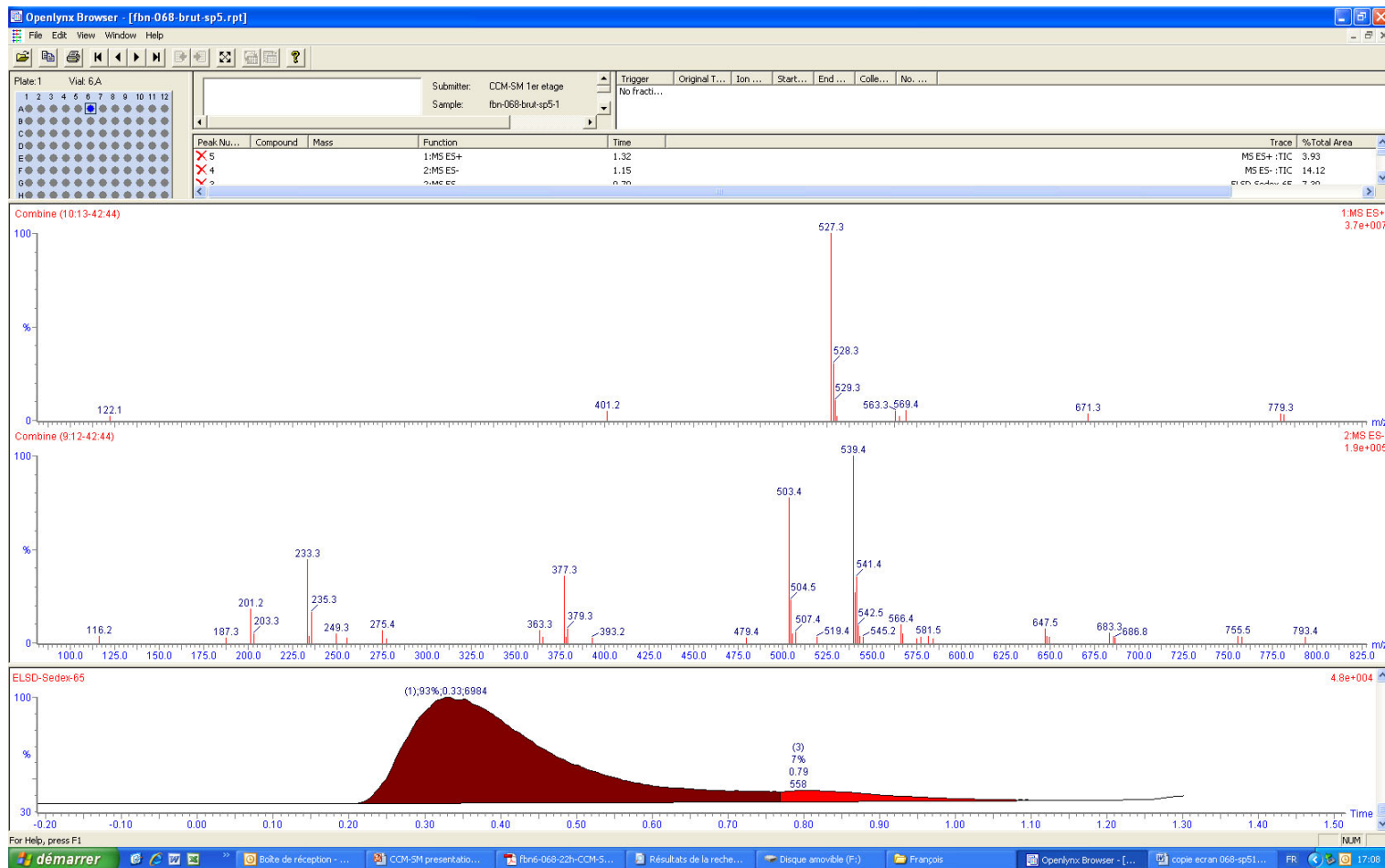


- LC/MS:



LC/MS du 068 brut

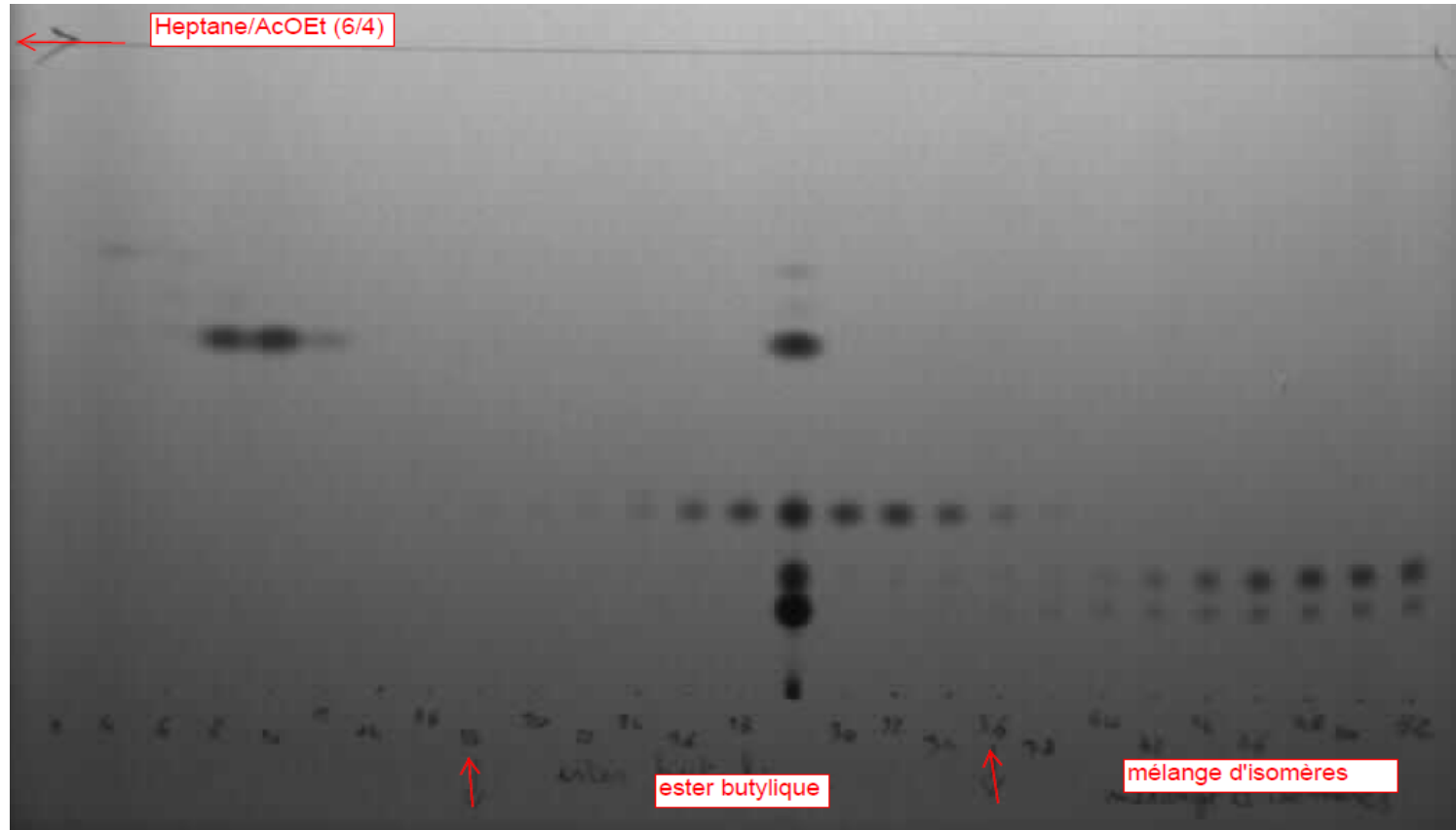
# Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD



Analyse du spot le plus polaire: disubstitué M=504

## Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD

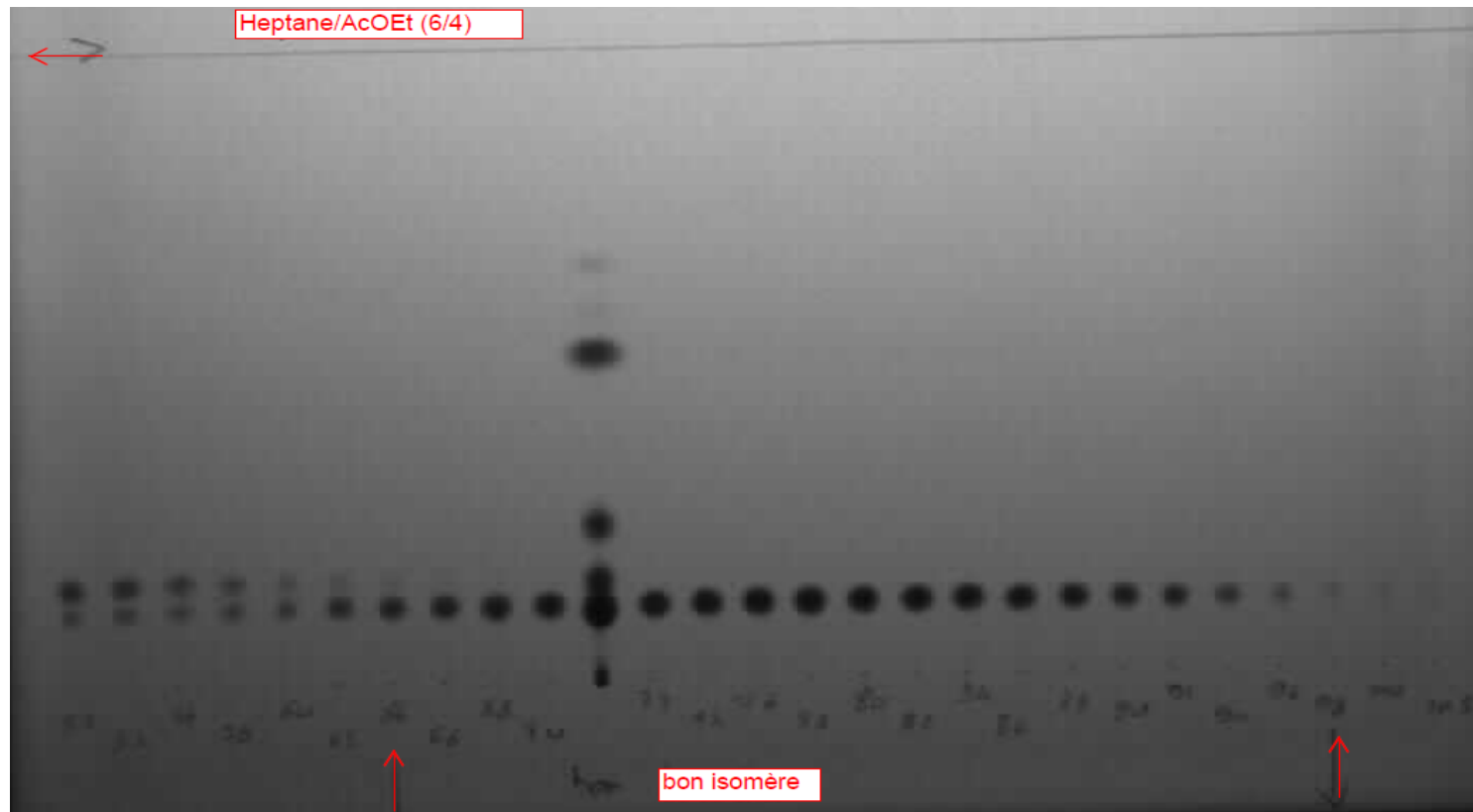
- Purification du 068 brut (520 mg) sur colonne de M=50 g (Merck) (15-40  $\mu\text{m}$ ) avec un éluant Heptane/AcOEt (6/4) à 60 ml/mn et détection à 254 nm. Dépôt solide: 2,5 g



Visualisation de la purification: dépôt tous les 2 tubes

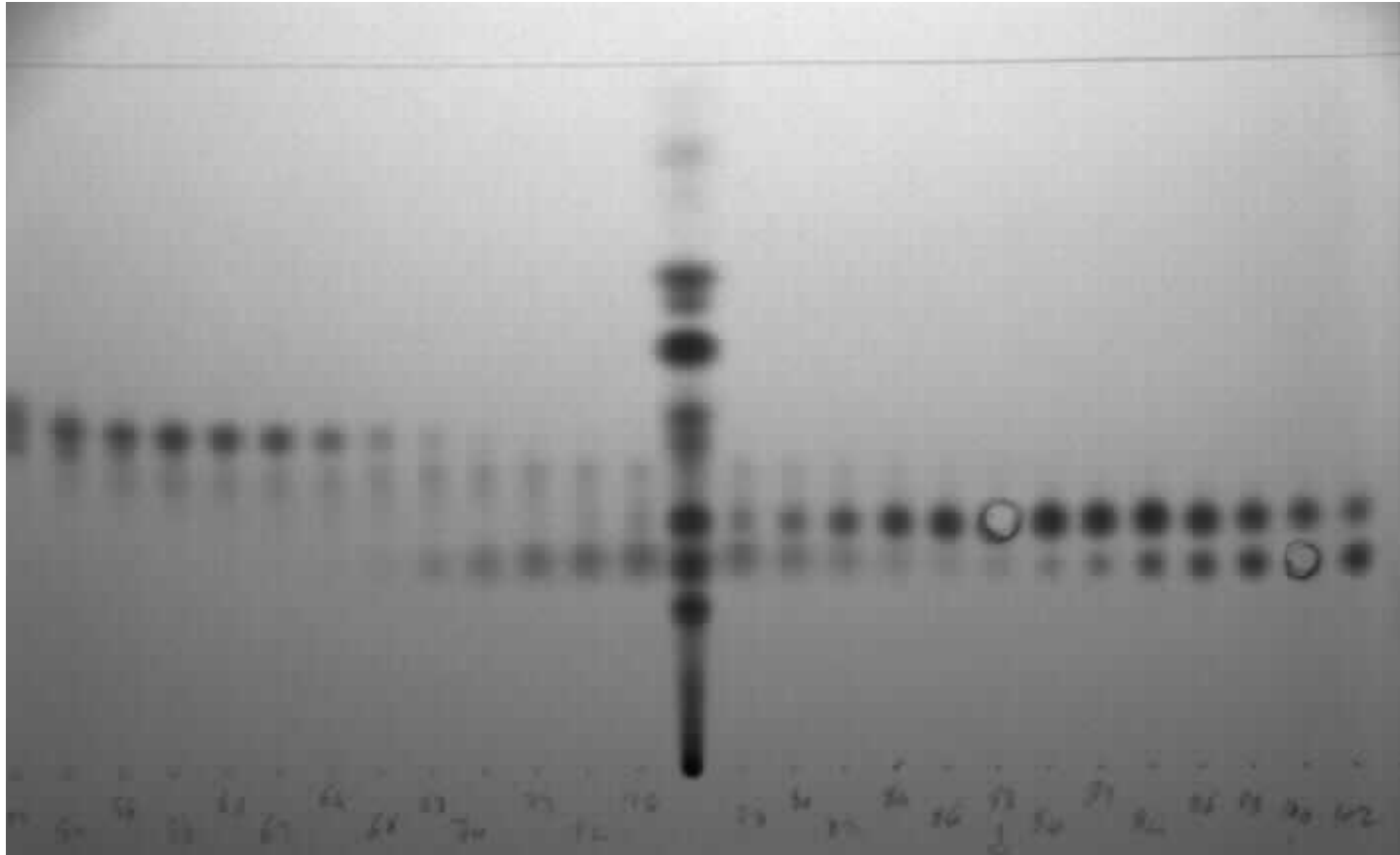
## Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD

- Purification du 068 brut (520 mg) sur colonne de M=50 g (Merck) (15-40  $\mu\text{m}$ ) avec un éluant Heptane/AcOEt (6/4) à 60 ml/mn et détection à 254 nm. Dépôt solide: 2,5 g  
Durée: 18 mn.



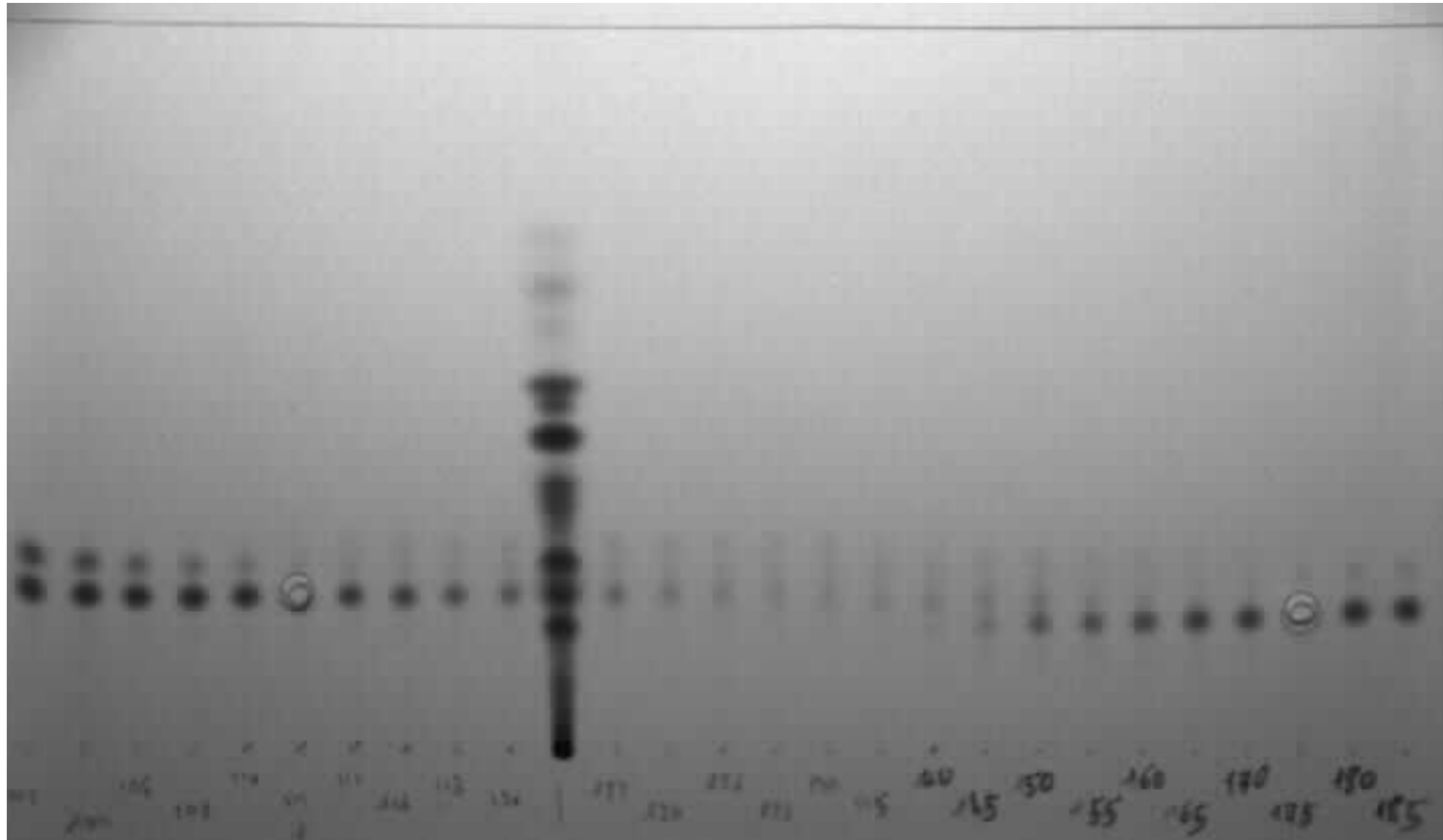
Visualisation de la purification plaque 2

- Analyse de chromatoflash:



Brut de réaction d'orientation

- Analyse de chromatoflash:



Brut de réaction d'orientation 2

### ● **Technique complémentaire à la LC/MS**

- **Pas de problème d'inversion de pics / LC-MS**
- **Récupération de l'analyse sur l'intranet**
- **Sensibilité très intéressante car moins de dilution**
- **Rapidité: durée d'analyse de 1,5 mn**
- **Visualisation instantanée de la masse pendant l'acquisition**
- **Transposition plus rapide pour la purification**



## *Nouveaux développements du couplage CCM-SM-ELSD*

---

- Merci aux trois sociétés contributrices à la mise au point de l'ensemble CCM-SM-ELSD :
- **Société Chromacim** ( représentant Camag France) : Mr Pierre Bernard-Savary ; L'ancienne Eglise ; 38340 Pommiers La Placette ; Tel 06 76 29 32 81 .
- **Société BCP Instruments** ; Mme Véronique de Nailly (connectiques chromatographie;filtres en ligne;accessoires peek .. ) 24 rue de la Mouche ; 69540 Irigny ; Tel: 04 72 49 72 65 .
- **Société Sedere** ( ELSD) ; Mr Henry Gangloff ; Parc Volta ; 9 Rue Parmentier ; Alforville ; Tel 01 45 18 05 18 .

# Conclusion: Merci de votre attention

---

