

UNE FORMATION SUR LA CCM ? MAIS POUR QUOI FAIRE ?

Mr François Bretin,
Small Molecule and Natural Product Chemistry,
Emerging Chemical Modalities
IDD, Sanofi R&D Vitry-sur-Seine

CCM, COUPLAGE TLC/MS, TRANSPOSITION
CCM-CHROMATOFLASH

Strasbourg 8 Novembre 2018

Une formation sur la CCM ? Mais pour quoi faire ? Mon rôle chez SANOFI

Chimiste



Antiinfectieux

Systeme nerveux centrale

Oncologie

Immunologie

Une formation sur la CCM ? Mais pour quoi faire ?

Chercheur

Synthèse organique

Purification

Analyses

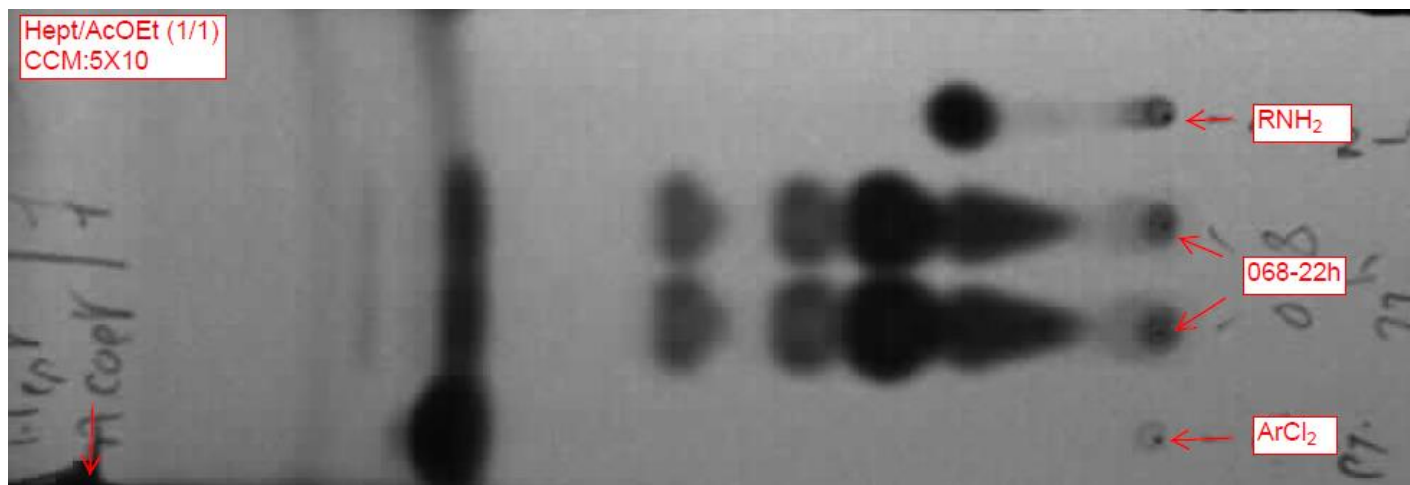
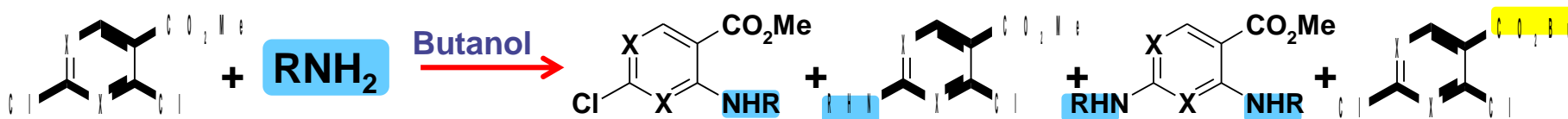


Une formation sur la CCM ? Mais pour quoi faire ?



Une formation sur la CCM ? Mais pour quoi faire ?

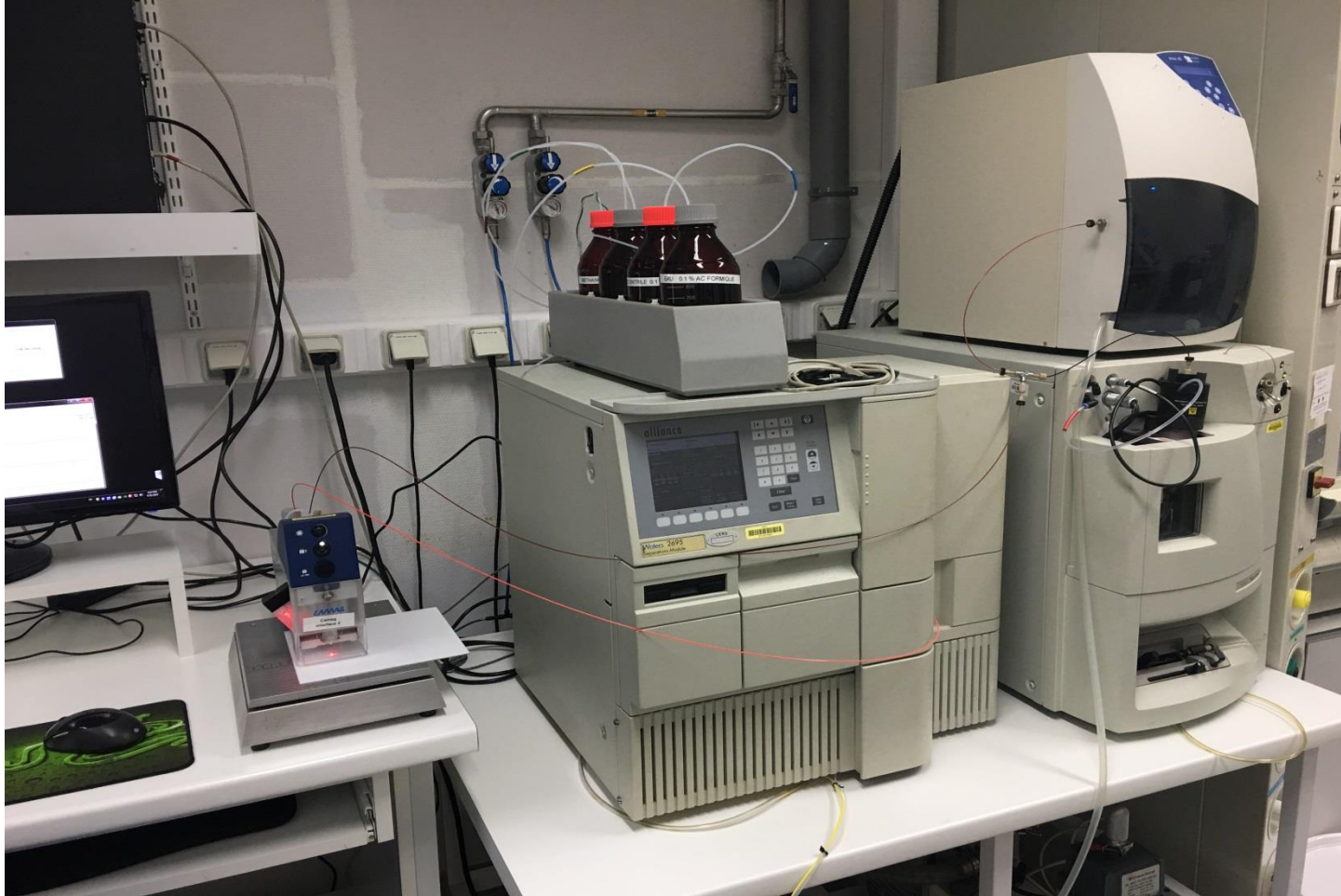
● Suivi de réaction



Une formation sur la CCM ? Mais pour quoi faire ?

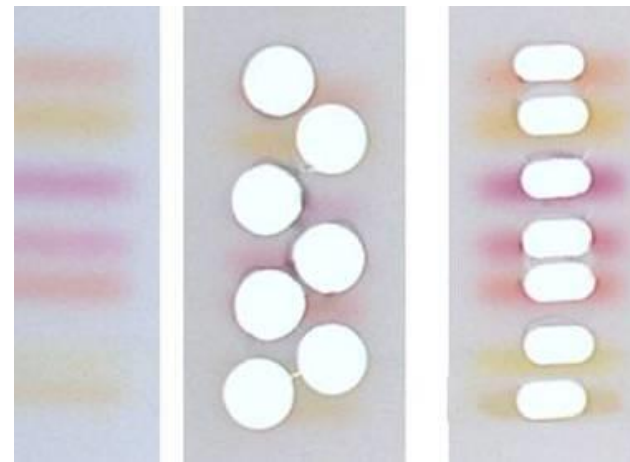
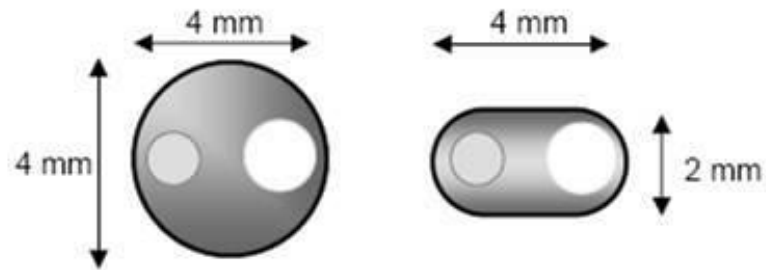
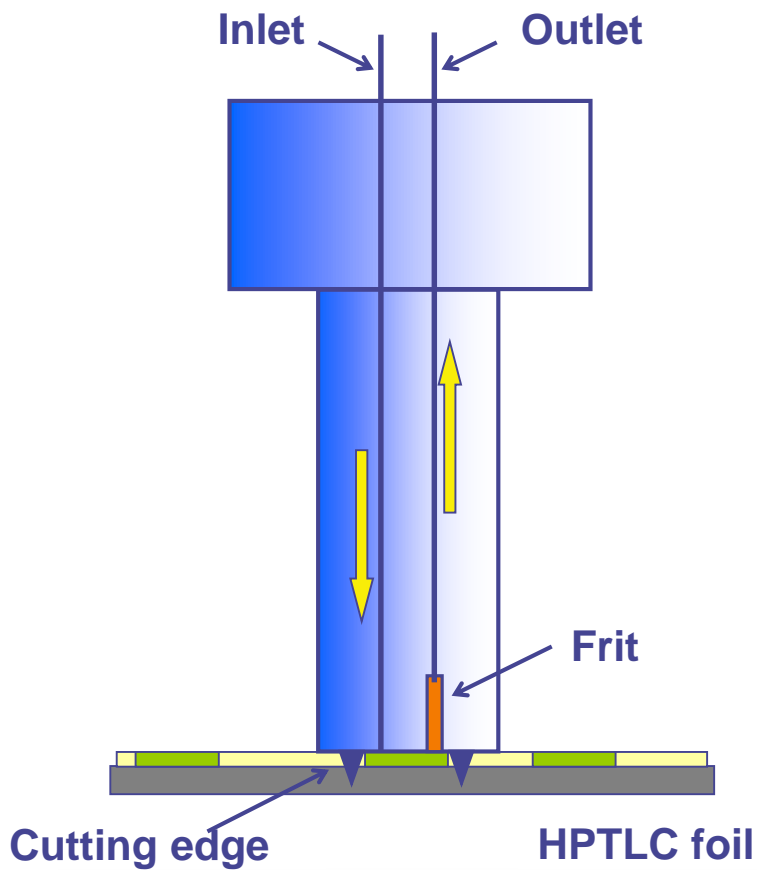


Une formation sur la CCM ? Mais pour quoi faire ?



Couplages HPTLC-MS

- Tête d'extraction

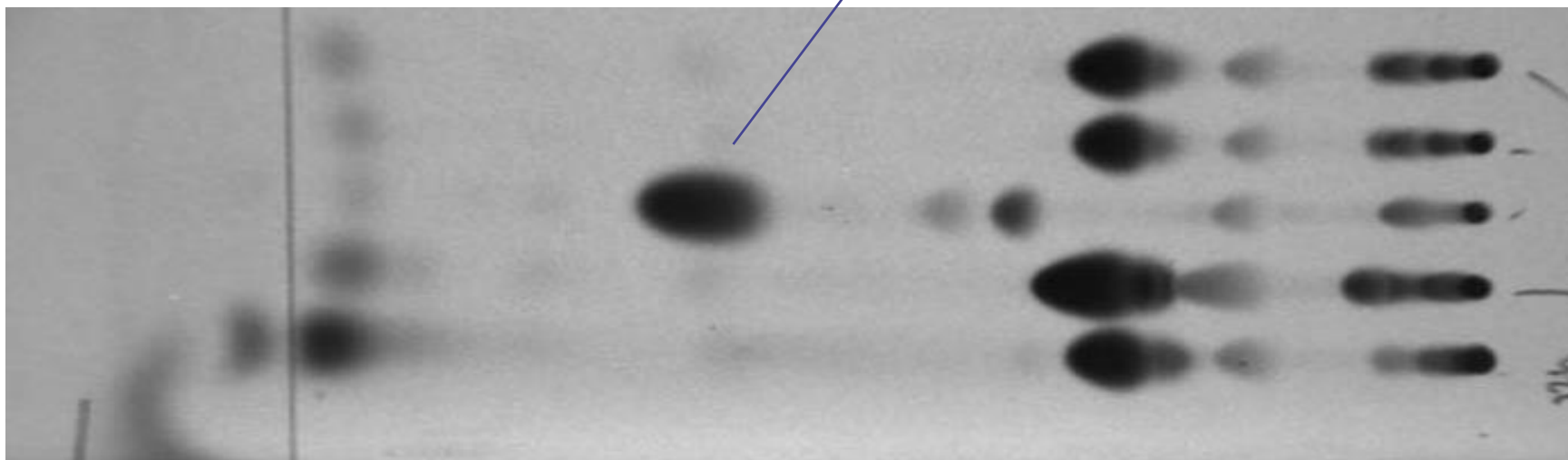
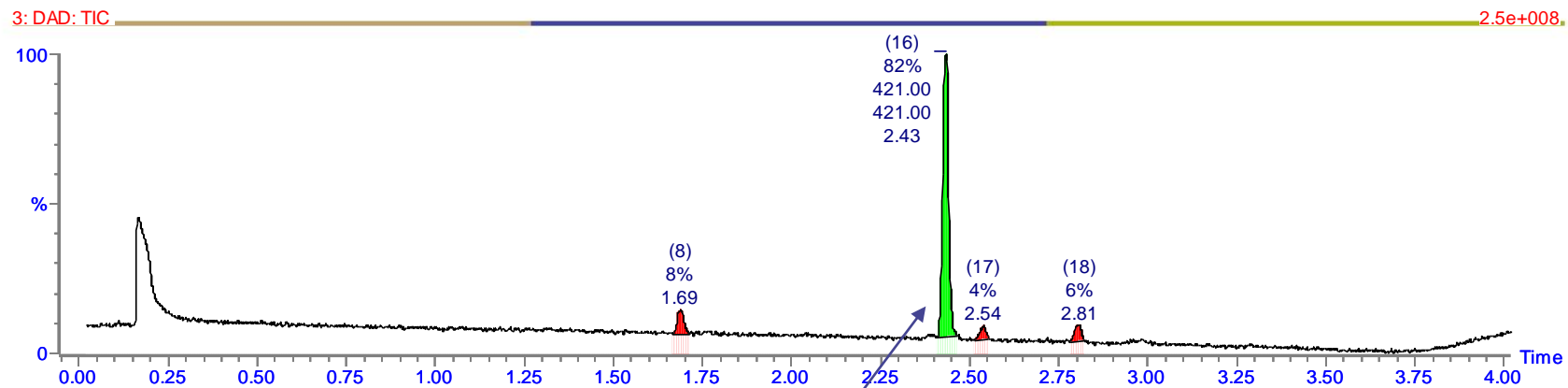


Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : Formation

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

- **Durée d'une acquisition CCM-SM-ELSD : 1, 5 minutes.**
- **Eluant : méthanol / H₂O+HCOOH 0,1%(95/5)
(pour maintenir un rendement d'ionisation electrospray optimal)**
- **Débit éluant en sortie pompe LC-Waters-Alliance : 0,4 mL/mn (valeur compatible : 0,3-0,5 mL/minute).**
- **Pression LC associée débit 0,4 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 : Formation



Nouveaux Développements du couplage CCM-SM-ELSD : Formation

- **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**
 - **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 : Formation

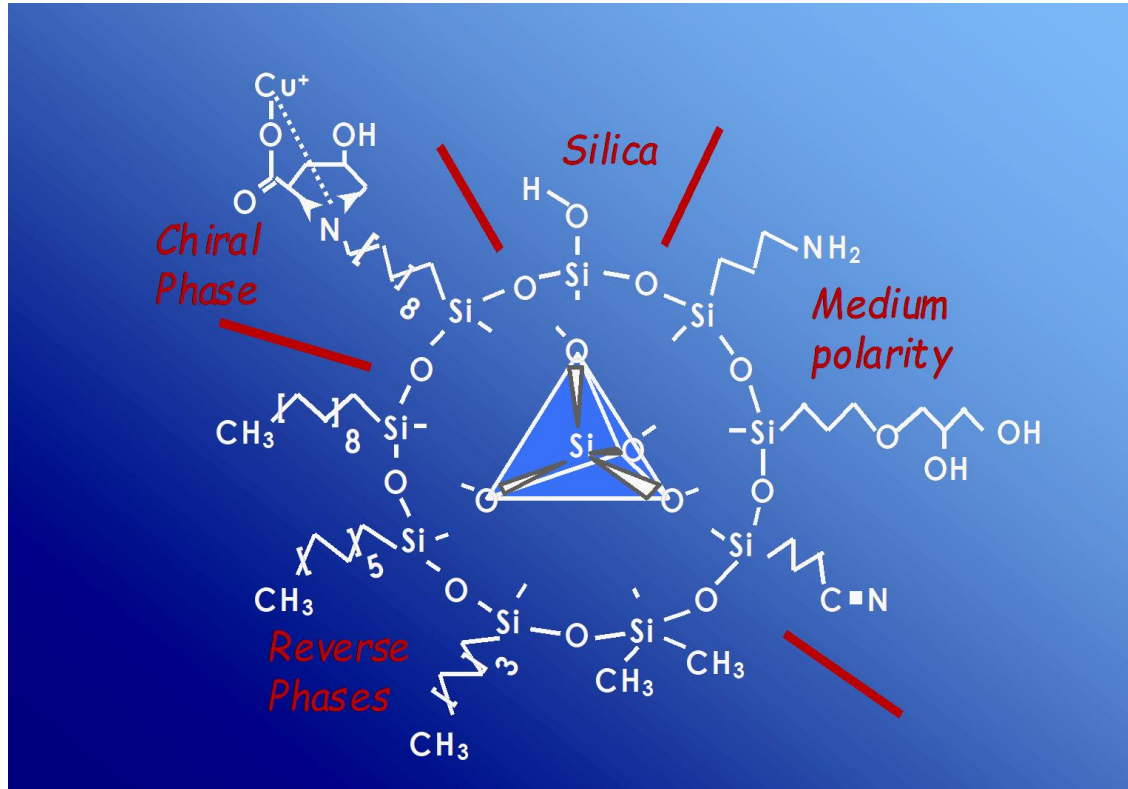
● Types d'ions observés:

- 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:

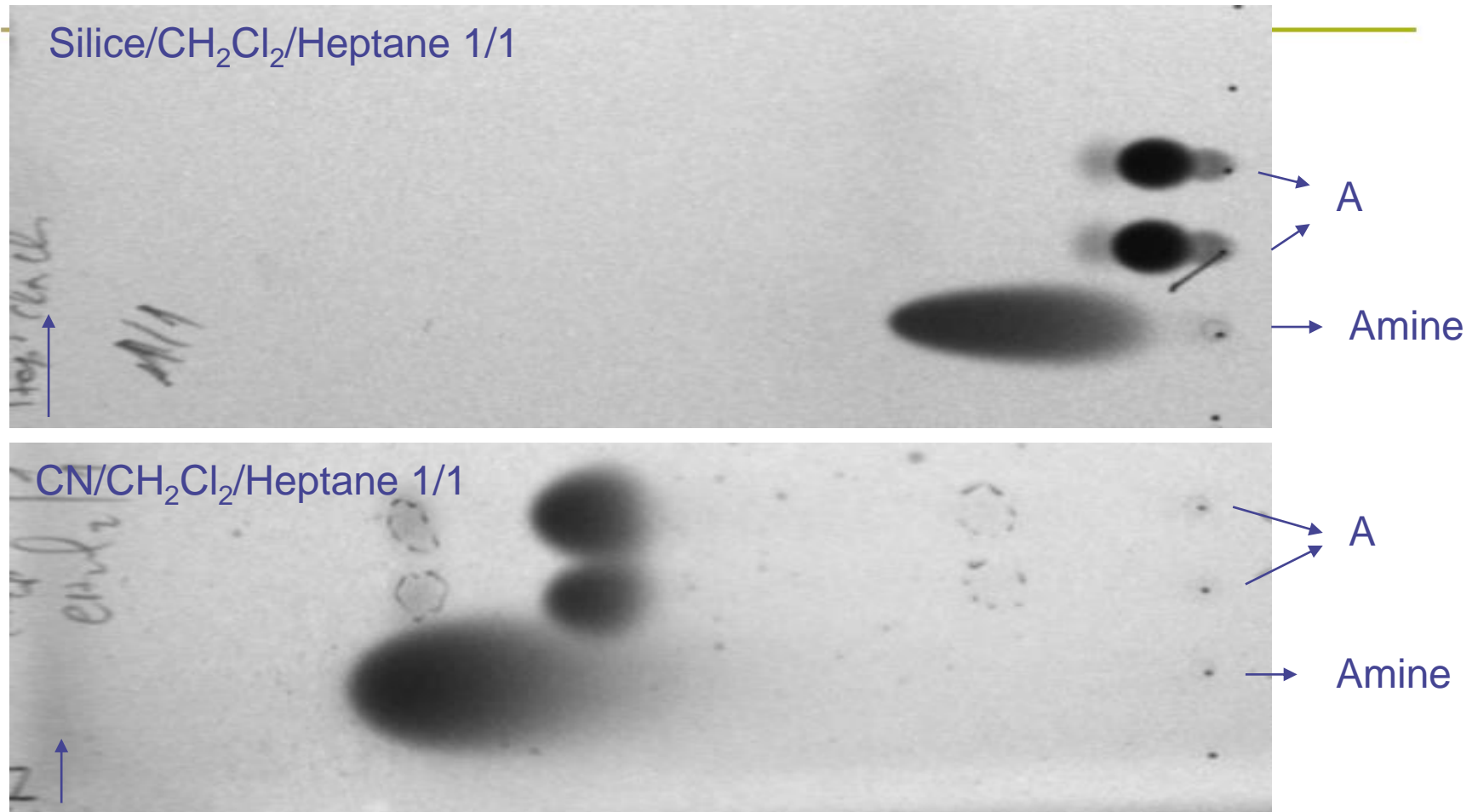
- S'il n'y a pas de concentration "idéale", la moyenne nécessaire à l'obtention d'un spectre se situe autour de 50 picomoles/ μl (# 10 μl à 10^{-3} M).

Les plaques de silice greffée

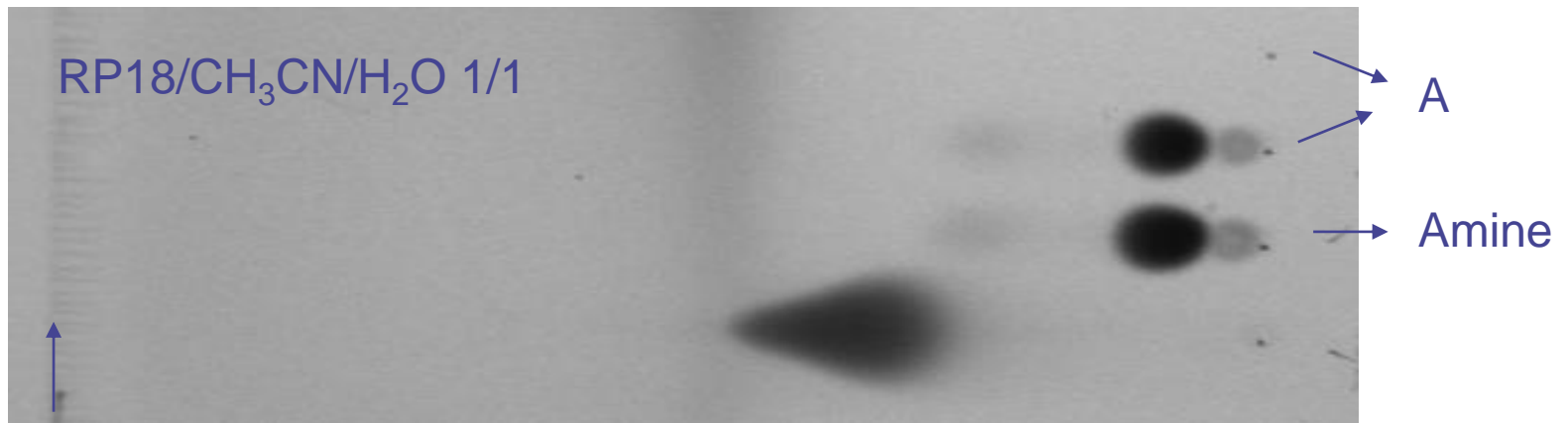
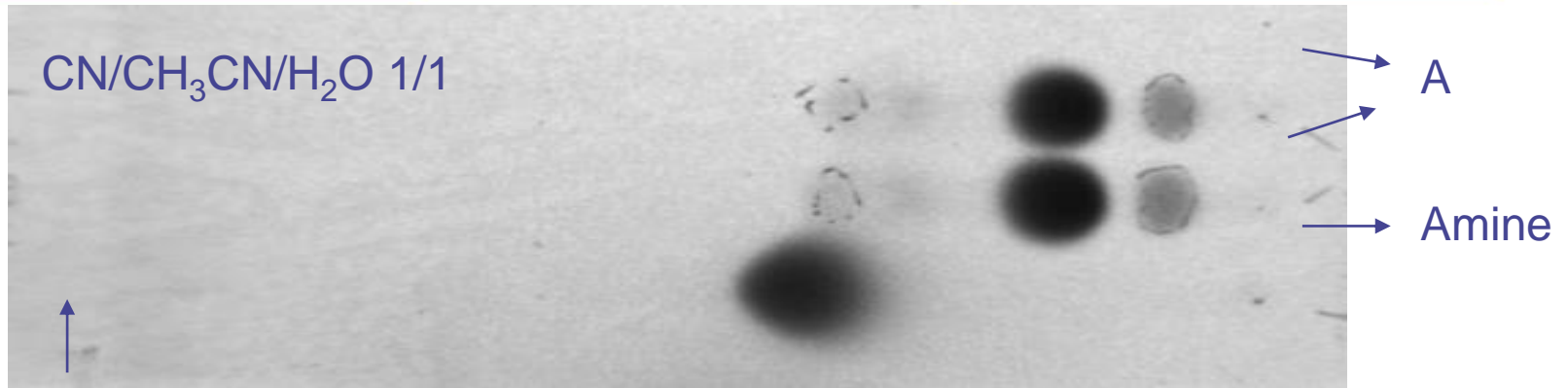


- Ordre des polarités : Silice, Diol, NH₂, CN, RP2, RP8, RP18w, RP18.

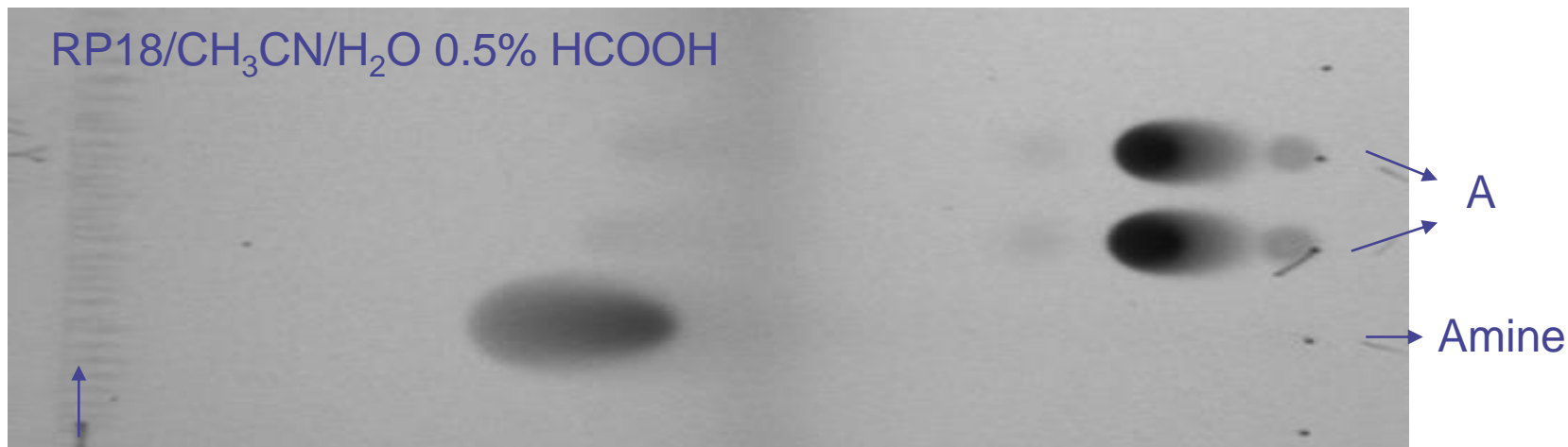
Phase stationnaire silice/cyano(phase normale)



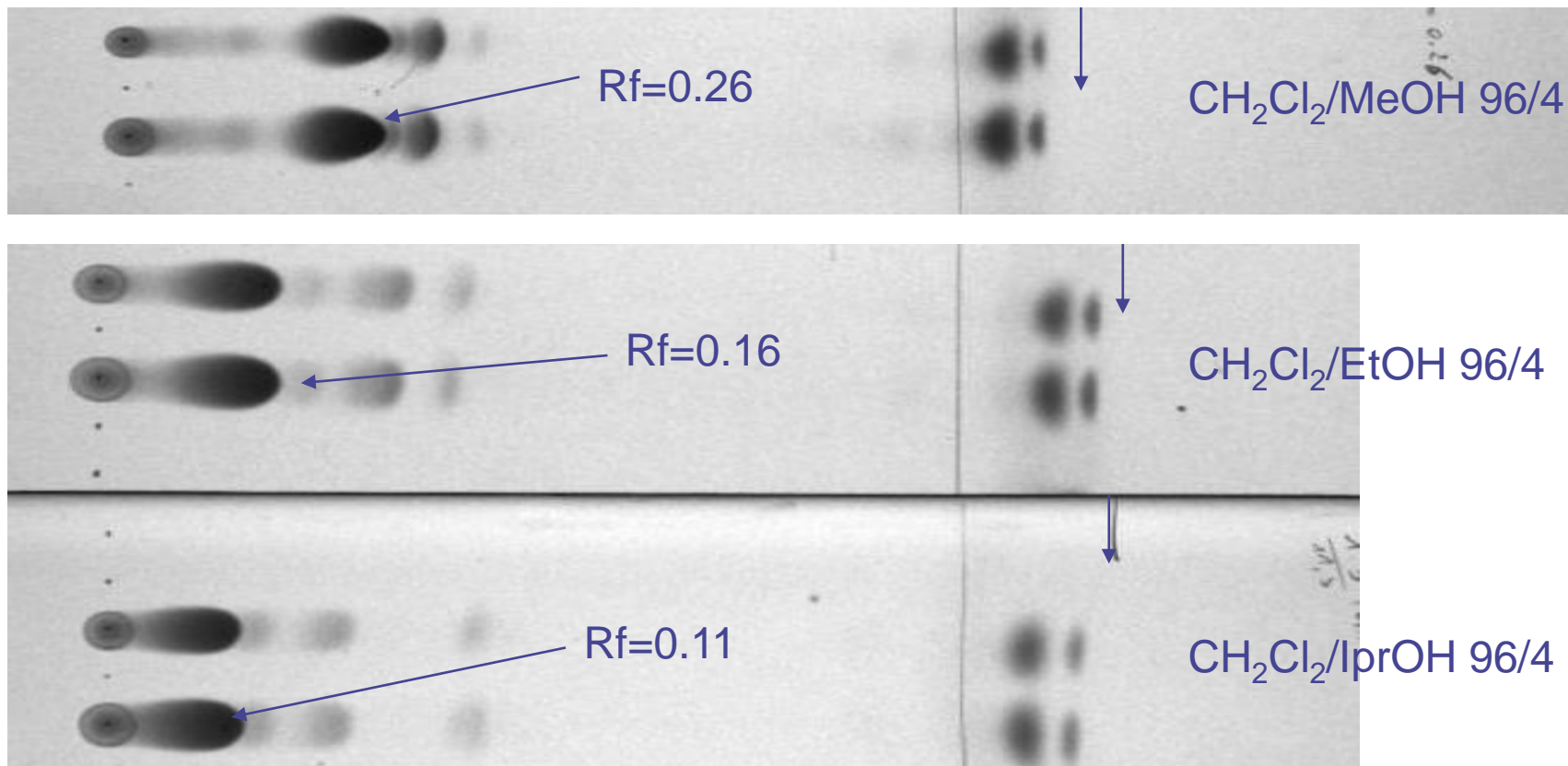
Phase stationnaire Cyano/RP18 (mode phase inverse)



Phase stationnaire Cyano/RP18 Mode phase inverse+modifiant



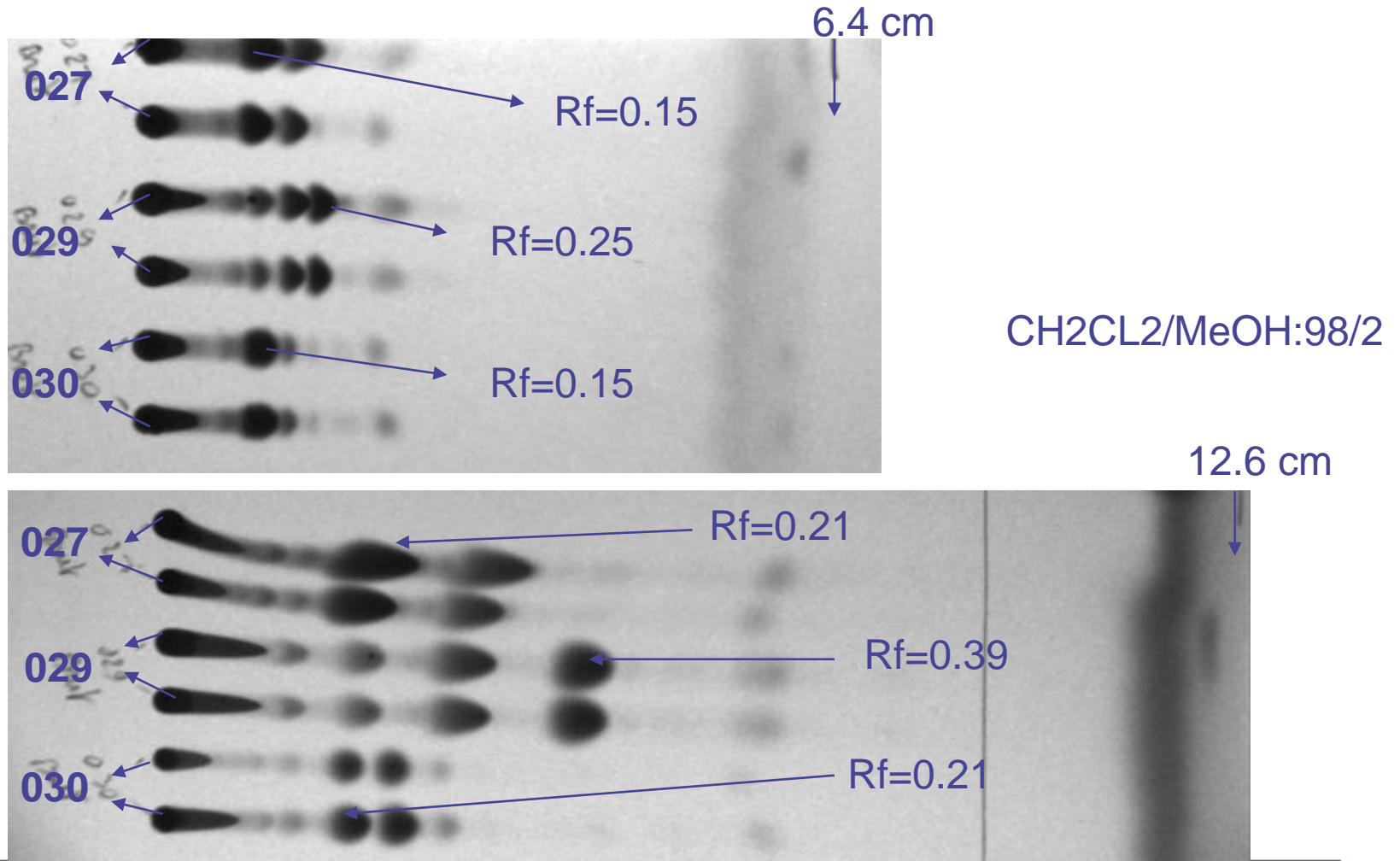
Choix du solvant



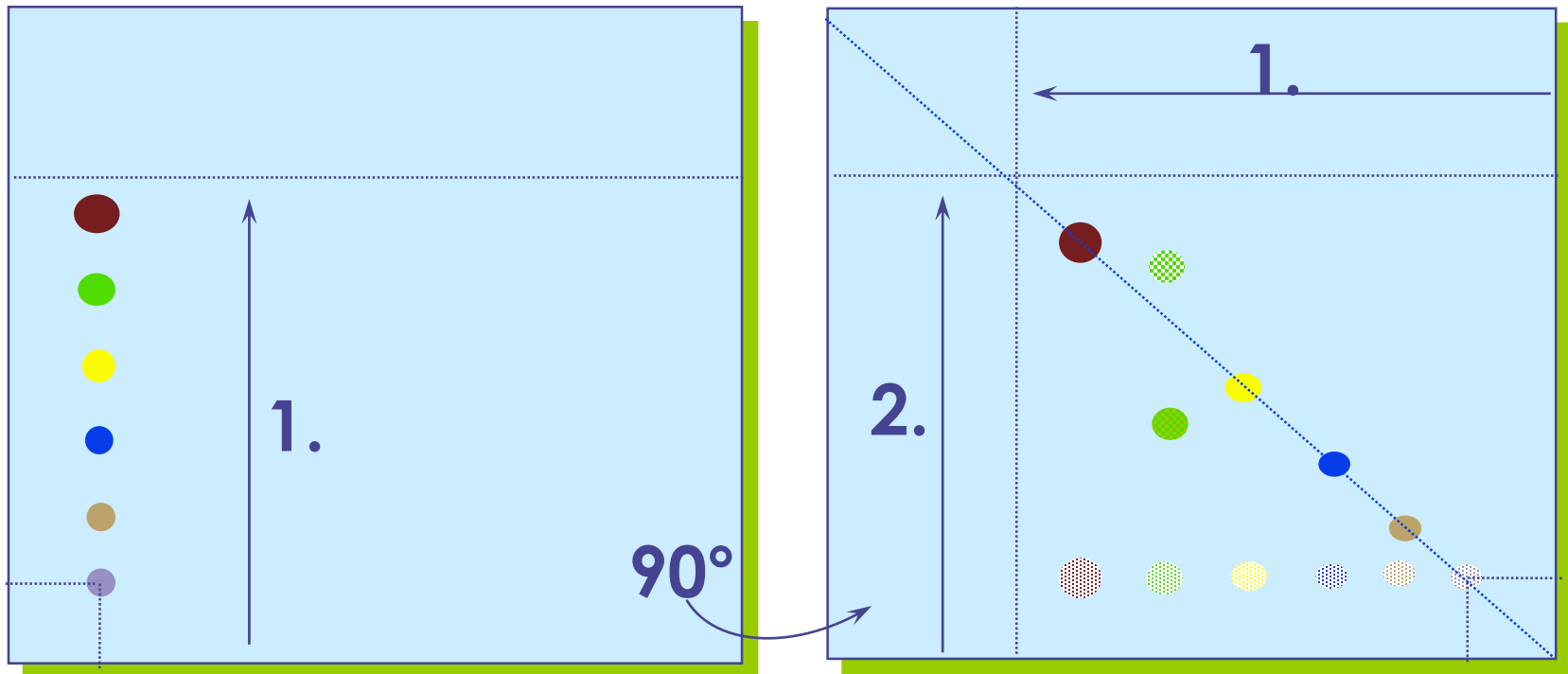
Diminution du R_f , latitude plus grande du % d'alcool, meilleure dissolution du brut

CALCUL DU Rf

Distance de migration et comparaison plaques 5X10 et 5X20



Chromatographie bidimensionnelle : produit stable ou pas ?



Technique SRS : Séparation-Réaction-Séparation

... Avec le même solvant, mais en tournant la plaque de 90°

Colonnes verres ou préremplies ?

- Sur colonnes verres:

$35 \text{ p} < M(\text{silice}) < 70 \text{ p}$ (voir 100 p)

pour un $0.2 < R_f < 0.3$

Sur colonnes préremplies:

$M(\text{silice}) = 70-100 \text{ p}$

pour un $0.10 < R_f < 0.25$

Injection sur la colonne: soluble ou insoluble

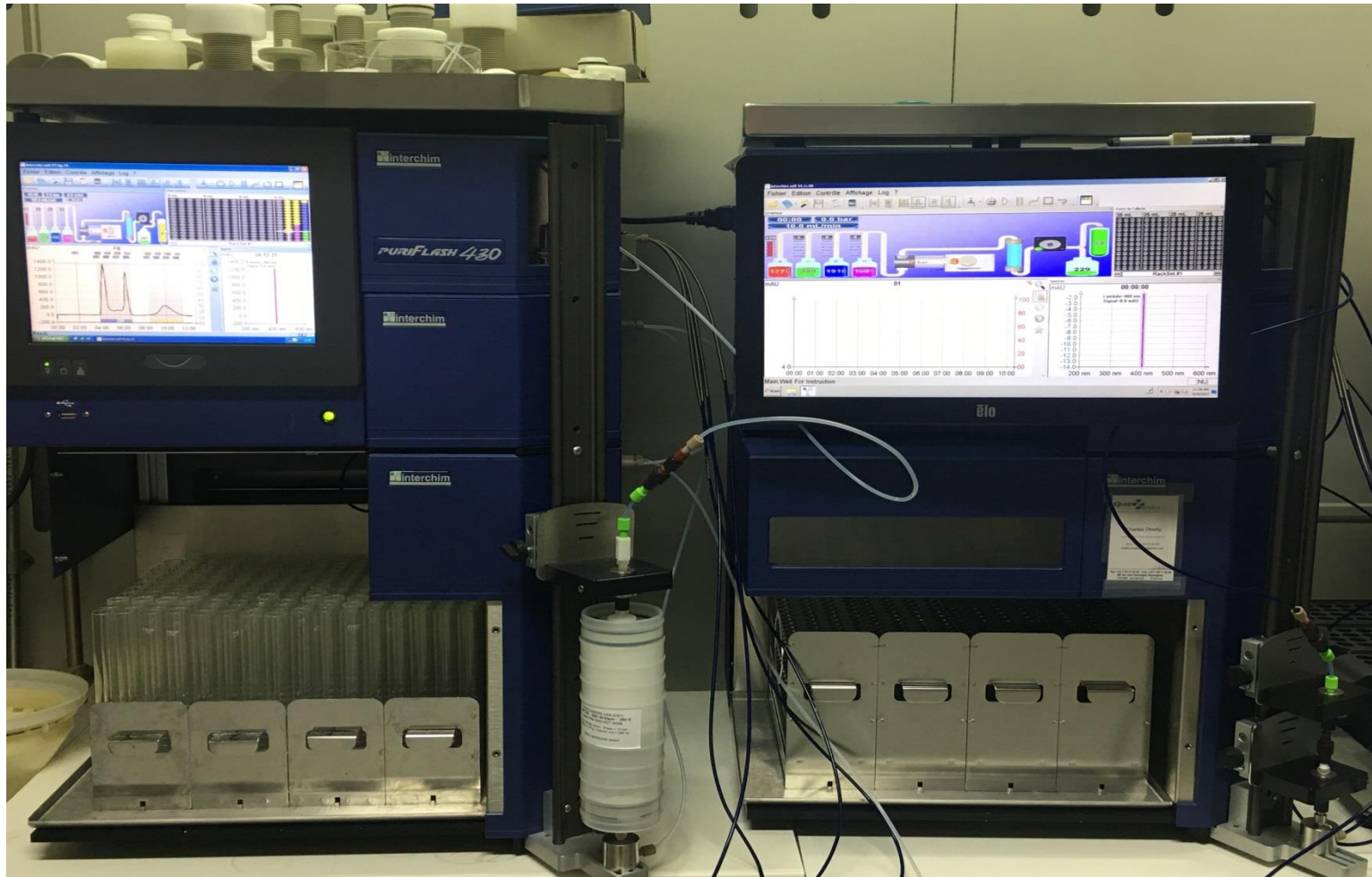
- Si produit soluble:

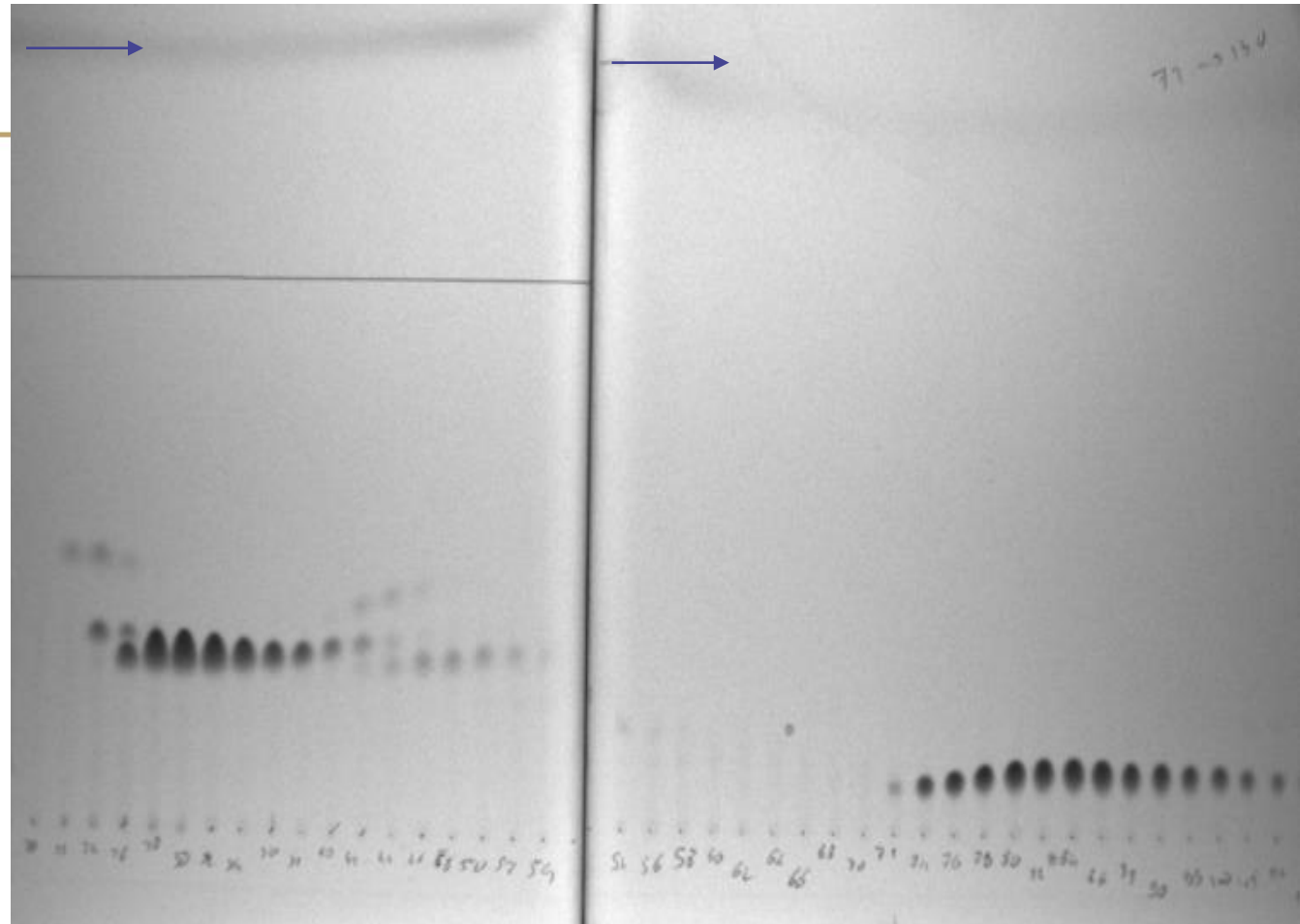
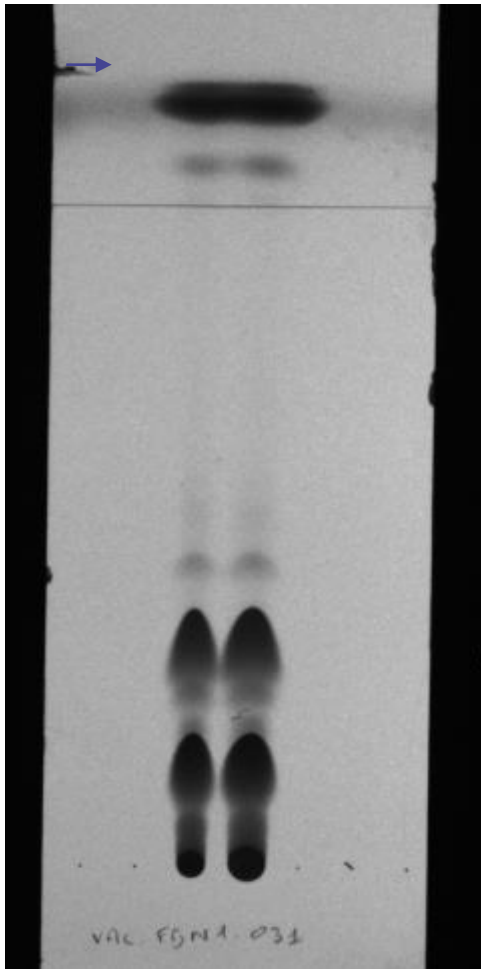
Injection liquide dans un minimum de solvant si possible le plus apolaire du mélange sinon le dans le mélange éluant

Si produit insoluble:

Faire un dépôt solide avec 5% du poids total de la colonne en silice identique. (attention de bien sécher la silice)

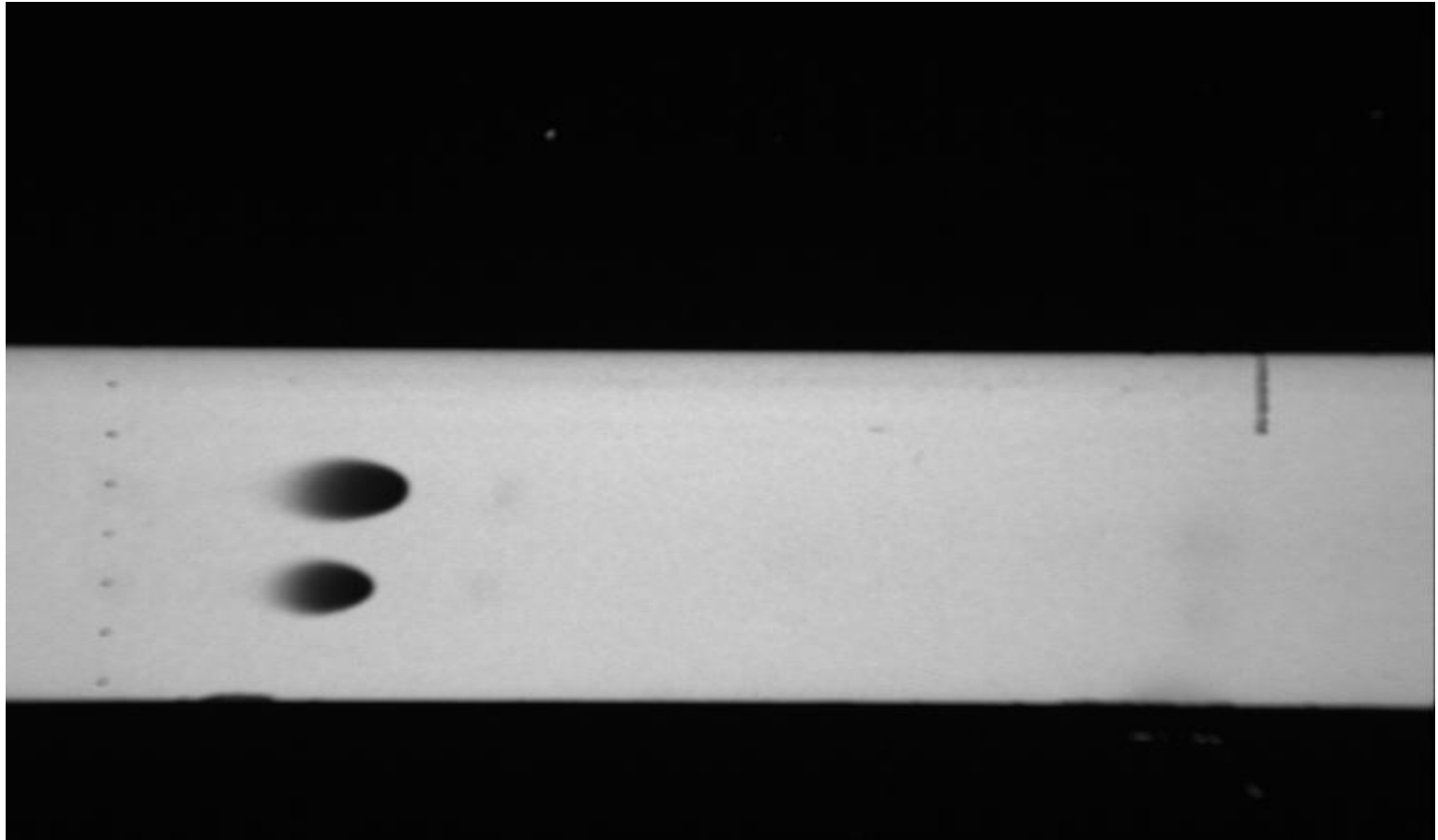
Choix de la méthode en recherche médicinale





Rf1=0.14 et Rf2=0.3 80 parties de silice 15-40 μm CH₂CL₂/MeOH 97/3 80 ml/mn
M(brut)=0.9 g

Conclusion



Merci de votre attention