



Transposition de la CCM à la chromatographie préparative.

Applications à l'isolement d'impuretés et la purification de produits à usage pharmaceutique.



Le Groupe de Recherche



Dr Jacques SERVIER

« La découverte et la vie »

21000 personnes

- **1^{er} Laboratoire pharmaceutique français indépendant, présent dans plus de 140 pays**
- **Médicaments de prescription**
- **Plus de 4 boîtes sur 5 vendues à l'étranger**

2600 personnes

- **Un quart du chiffre d'affaires est consacré à la Recherche et au Développement et ce, depuis plus de 40 ans.**
- **Principaux axes de Recherches : Métabolisme, Maladies Cardio-vasculaires, Système Nerveux Central, Cancérologie, Rhumatologie, Gynécologie.**
- **Cette stratégie de recherche à long terme permet à notre Maison de posséder l'un des plus gros portefeuilles de médicaments en développement (32).**

Centre de Recherche
Industrielle et
Production chimique

Bolbec / Baclair

Physico-chimie, galénique
et pharmaco-cinétique

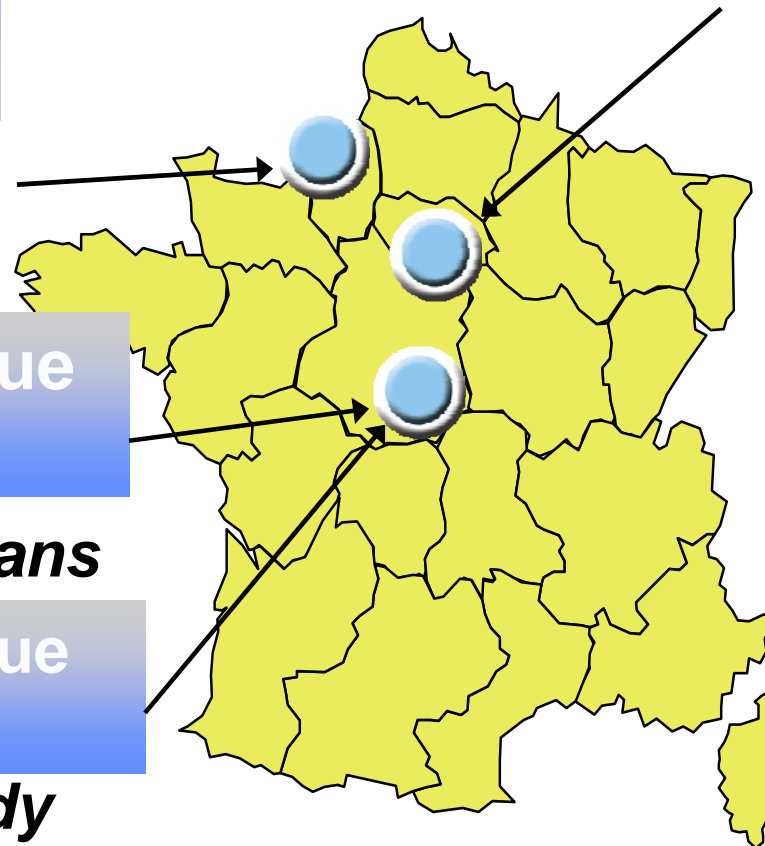
Orléans

Production pharmaceutique
et Centre de Toxicologie

Gidy

Recherche fondamentale

Suresnes et Croissy



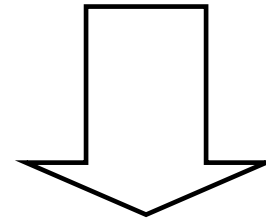
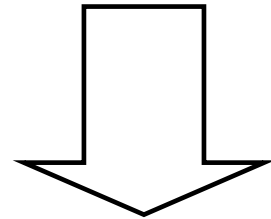
2 sites :

**1992, 2000 et 2004,
usine de Baclair**

1960, usine de Bolbec



Nos missions



Spécialité	Dénomination	Domaine thérapeutique
ARCALION	Sulbutiamine	Inhibition physique ou psychique
ARTEX	Tertatolol	Hypertension
COVERSYL	Périndopril	Hypertension
DAFLON	Fraction flavonoïque	Insuffisance veineuse
DIAMICRON	Gliclazide	Diabète
DUXIL	Raubasine + Almitrine	Sénescence cérébrale
FLUDEX	Indapamide	Hypertension
GLUCIDORAL	Carbutamide	Diabète
HYPERIUM	Rilménidine	Hypertension
LOCABIOTAL	Fusafungine	Affections respiratoires
MEDIATOR	Benfluorex	Diabète et dyslipidémies
MUPHORAN	Fotémustine	Tumeurs cérébrales et mélanomes
PNEUMOREL	Fenspiride	Affections broncho-pulmonaires
PRETERAX	Périndopril + Indapamide	Hypertension
PROTELOS	Ranélate de Strontium	Ostéoporose
STABLON	Tianeptine	Dépression
TRIVASTAL	Piribédil	Parkinson / Sénescence cérébrale / Artérite
VASTAREL	Trimétazidine	Angor
VECTARION	Almitrine	Insuffisance respiratoire

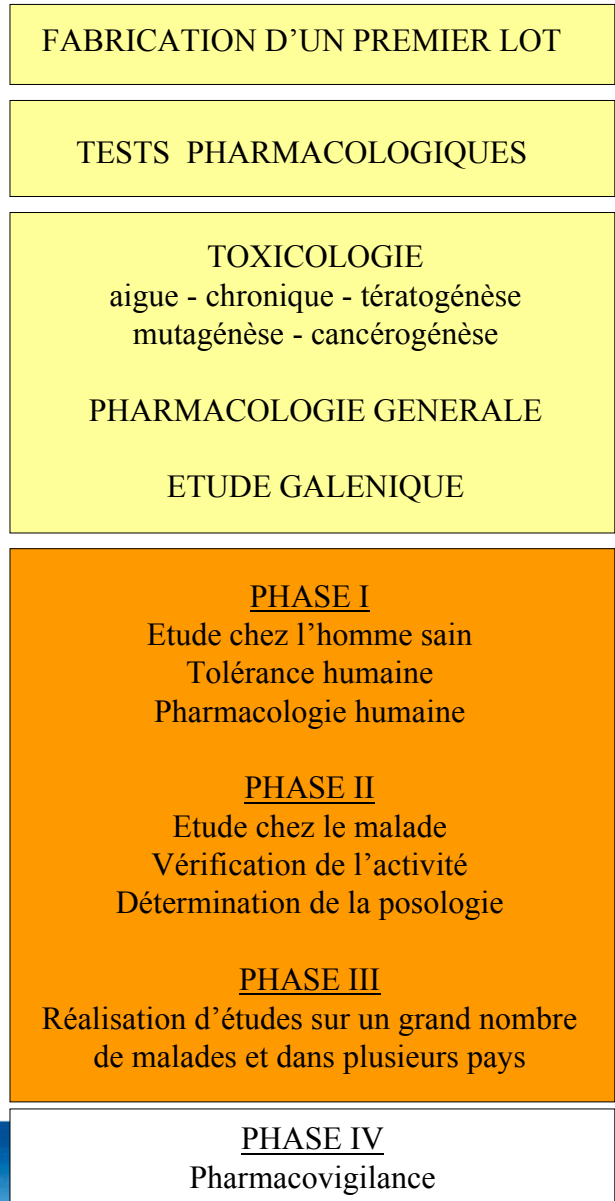
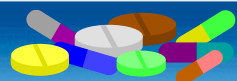
Idée d'un nouveau médicament →



Passage chez l'homme



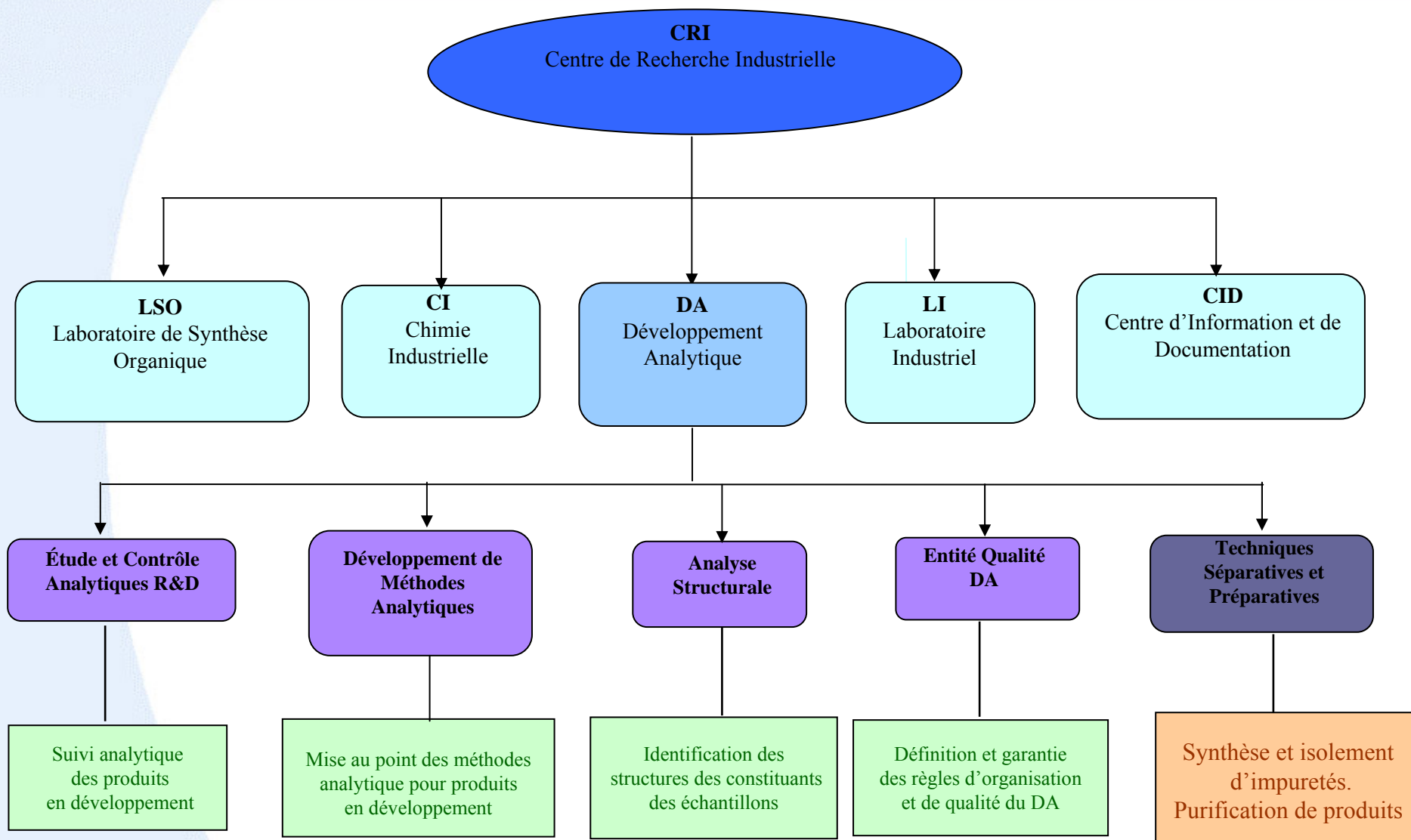
AMM - Commercialisation



Durée Moyenne Durée Totale



Coût moyen
> 1 milliard de francs



- Isoler et identifier les impuretés du principe actif ou dans un stade intermédiaire de sa synthèse:
 - pour la connaissance du procédé (un profil d'impuretés est une empreinte du schéma de synthèse utilisé). Toute impureté présente à une teneur supérieure à 0.1% doit être connue.
 - pour la validation de méthodes analytiques
 - pour le contrôle et l'étude d'effets purificateurs
 - pour d'éventuelles études toxicologiques
 - pour des aides ponctuelles aux chimistes

Tout ceci est obligatoire pour constituer le dossier de connaissance du produit ainsi que le dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché)

- Produire des lots spécifiques:
 - Lot de référence analytique
- Purifier des lots destinés à des études toxicologiques pour lesquels nos techniques séparatives apportent une solution rapide et suffisante.
- Produire et purifier les premiers lots destinés à des études pharmacologiques (Séparation d'énantiomères à partir d'un mélange racémique).
- Purifier des intermédiaires de synthèse lors de problèmes de qualité.

1. La Flash chromatographie

Principe:

- Mise au point de la séparation des composés d'un mélange en chromatographie sur couche mince et transposition sur colonne.

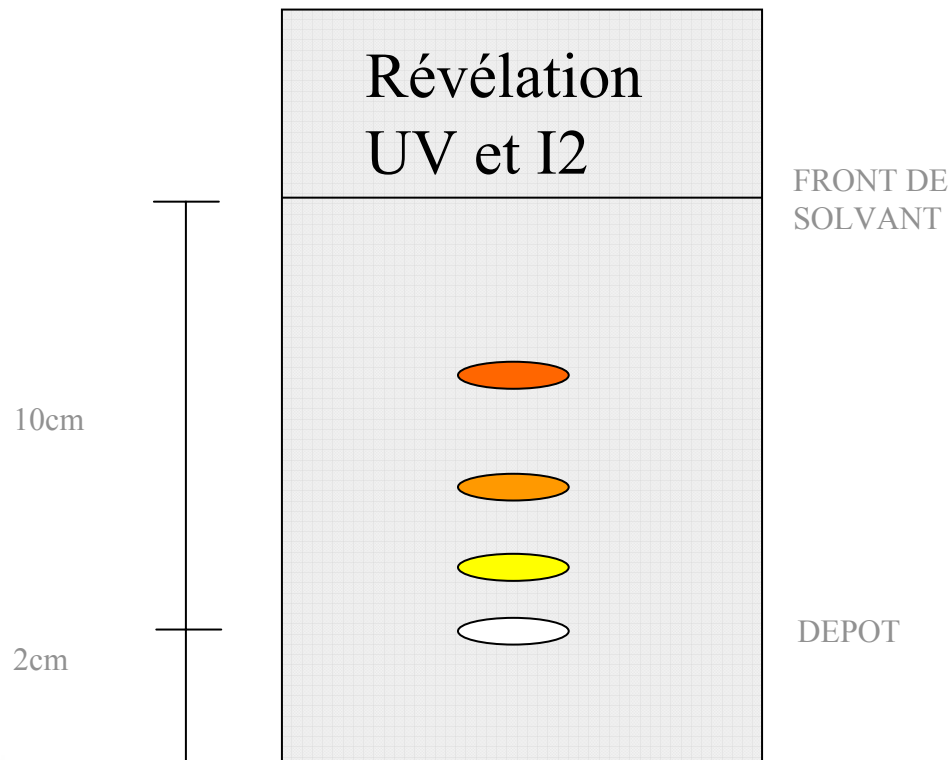
2. L 'HPLC Préparative

Principe:

- Mise au point de la séparation des composés d'un mélange en chromatographie liquide haute performance avec utilisation d'une phase stationnaire préparative disponible et transposition sur colonne.

- Le choix des conditions opératoires de purification passe avant tout par une bonne CCM:

Détermination des conditions opératoires (choix de l'éluant et de la phase stationnaire: silice le plus couramment), R_f adéquat, Solvants (solubilité).



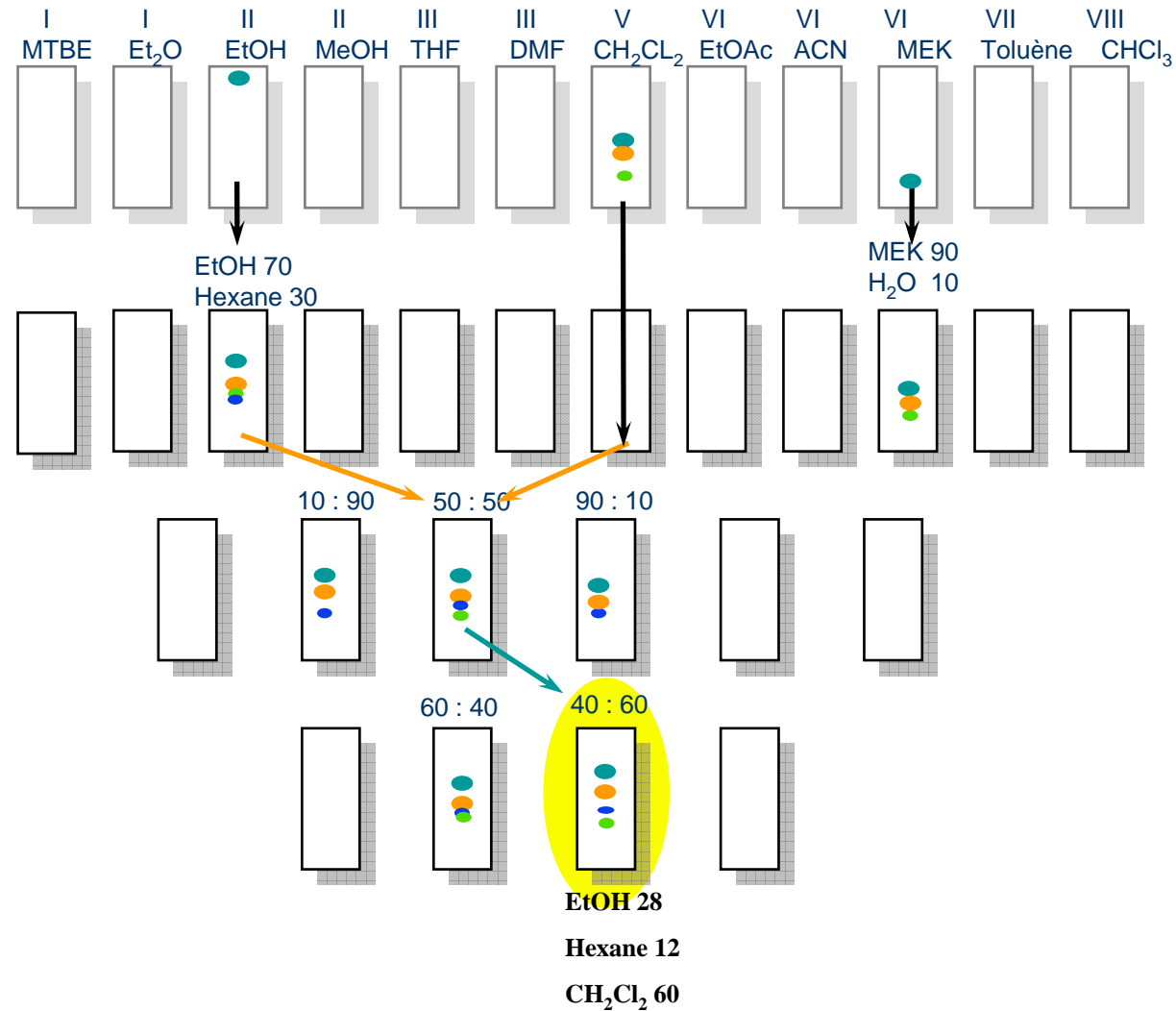
Recherche d'un système en CCM pour transposition sur colonne

étape 1:
solvants purs

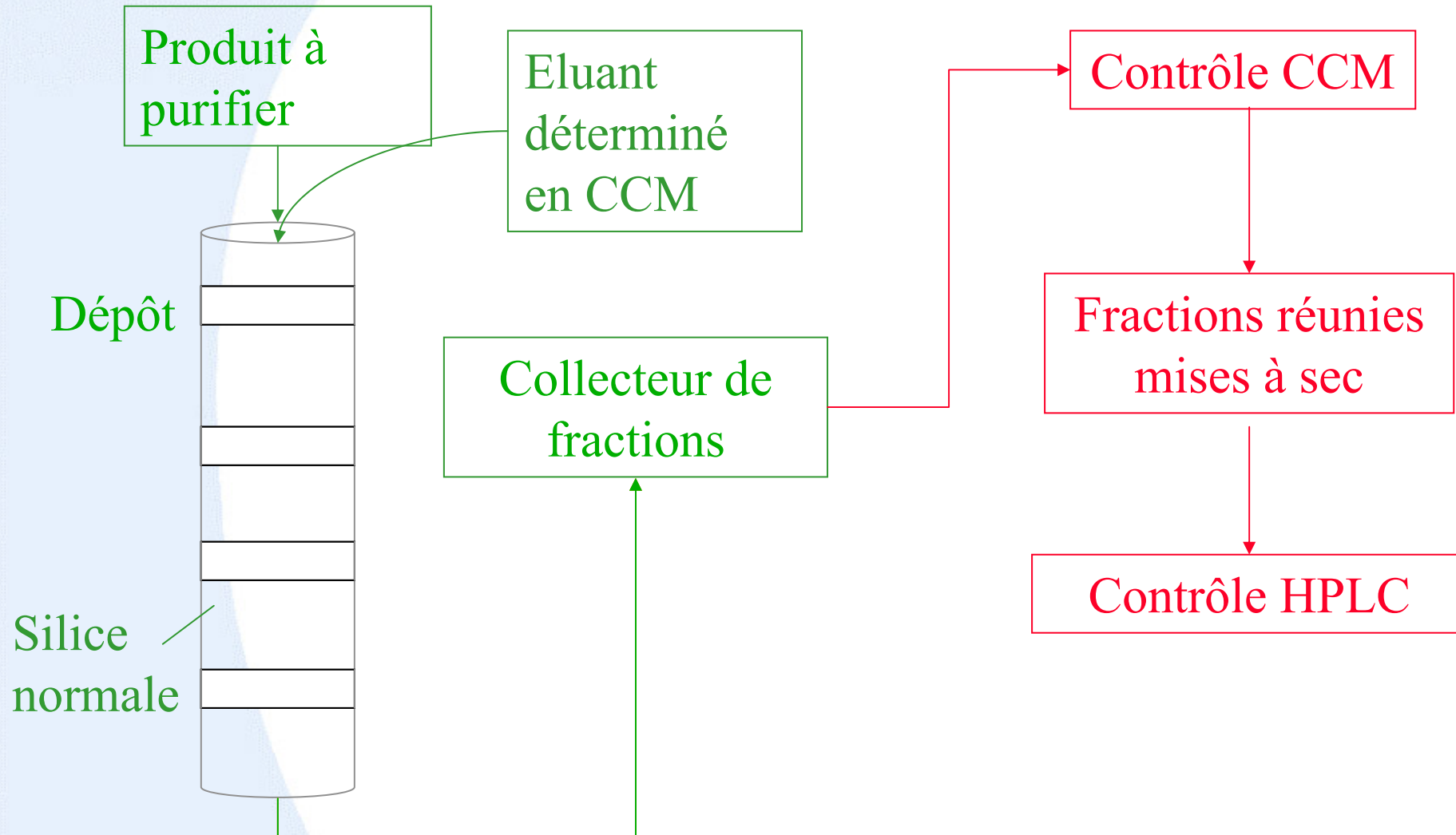
étape 2:
diminuer (Hex) ou
augmenter (H₂O)
la force éluante

étape 3:
essayer les
mélanges (+ acides
et bases)

étape 4:
ajustement final



Colonne Flash



- *Mise au point des conditions CCM:*

La composition de la phase mobile est correcte si la séparation des composés est suffisante et si le R_f du composé à isoler est compris entre 0,1 et 0,3.

- *Transposition sur colonne:*

Mise en suspension de la silice dans l'éluant déterminé pour la séparation .

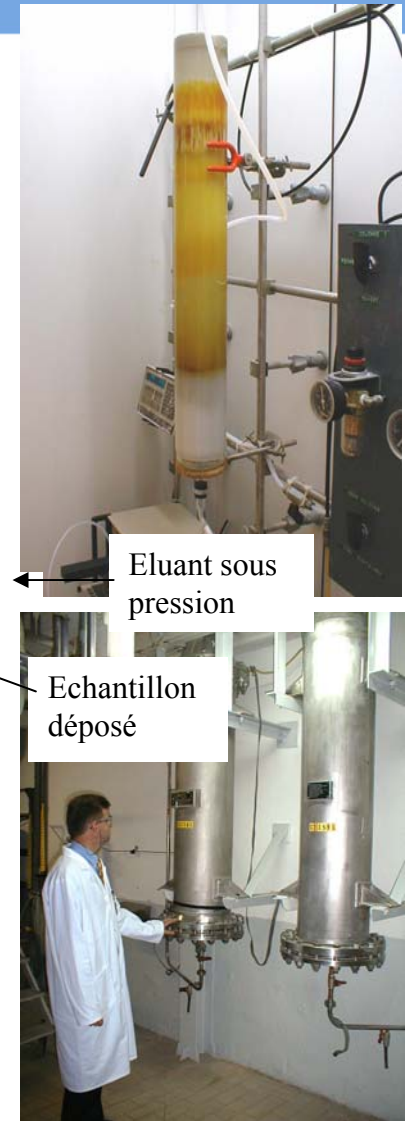
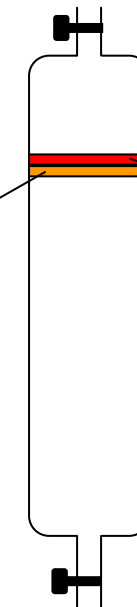
Tassement sous pression (0.5 à 1 bar).

Ajout de sable afin d'éviter le phénomène de dilution lors de l'injection et les perturbations du lit de phase.

Injection en solution dans le solvant le moins éluant (ou quelquefois solide).

Elution sous faible pression (0.5 à 1 bar).

Collecte en sortie de colonne, suivi de la purification par CCM ou HPTLC, regroupement des fractions et isolement des produits par mise à sec.



Quelques conseils :

Utiliser des systèmes de solvants « classiques » (Cyclohexane, Dichlorométhane, Toluène, Acétate d'éthyle, Acétonitrile, MTBE, Ethanol, Méthanol) en évitant quand on le peut l'addition d'adjuvants acides ou basiques, les systèmes les plus simples sont souvent les meilleurs!

L'autre petite astuce consiste à ne pas travailler sur les produits salifiés (Chlorhydrate...), il est nécessaire dans ce cas de revenir à la base ou acide avant injection sur une colonne chromatographique pour avoir de bons résultats.

Les rapports masse de produit injectée(g)/ masse de silice(g) sont de l'ordre de 1/20 à 1/100 et sont dépendants de la séparation et des produits injectés.

•*Transposition sur colonne:*

Mise en suspension de la silice dans le dichlorométhane
Utilisation des colonnes à compression axiale dynamique
Tassement sous pression (40 bars).

Injection en solution dans le solvant le moins éluant
Élution aux débits théoriques (100 ml/min sur colonne de
50 mm, 600 ml/min sur 110 mm et 500 l/h sur 450 mm).

Détection UV (Longueur d'onde déterminée par
densitométrie) et collecte en sortie de colonne, suivi de la
purification par CCM ou HPTLC, regroupement des
fractions et isolement des produits par mise à sec.





- ✓ 2 colonnes DAC de 50 mm
- ✓ 2 colonnes DAC de 110 mm
- ✓ 1 colonne DAC de 450 mm
- ✓ 1 système de cartouches **SPOT ARMEN**







- Efficacité**

Débit adapté (Pression plus importante), détection en ligne, efficacité de la colonne augmentée, séparation améliorée...

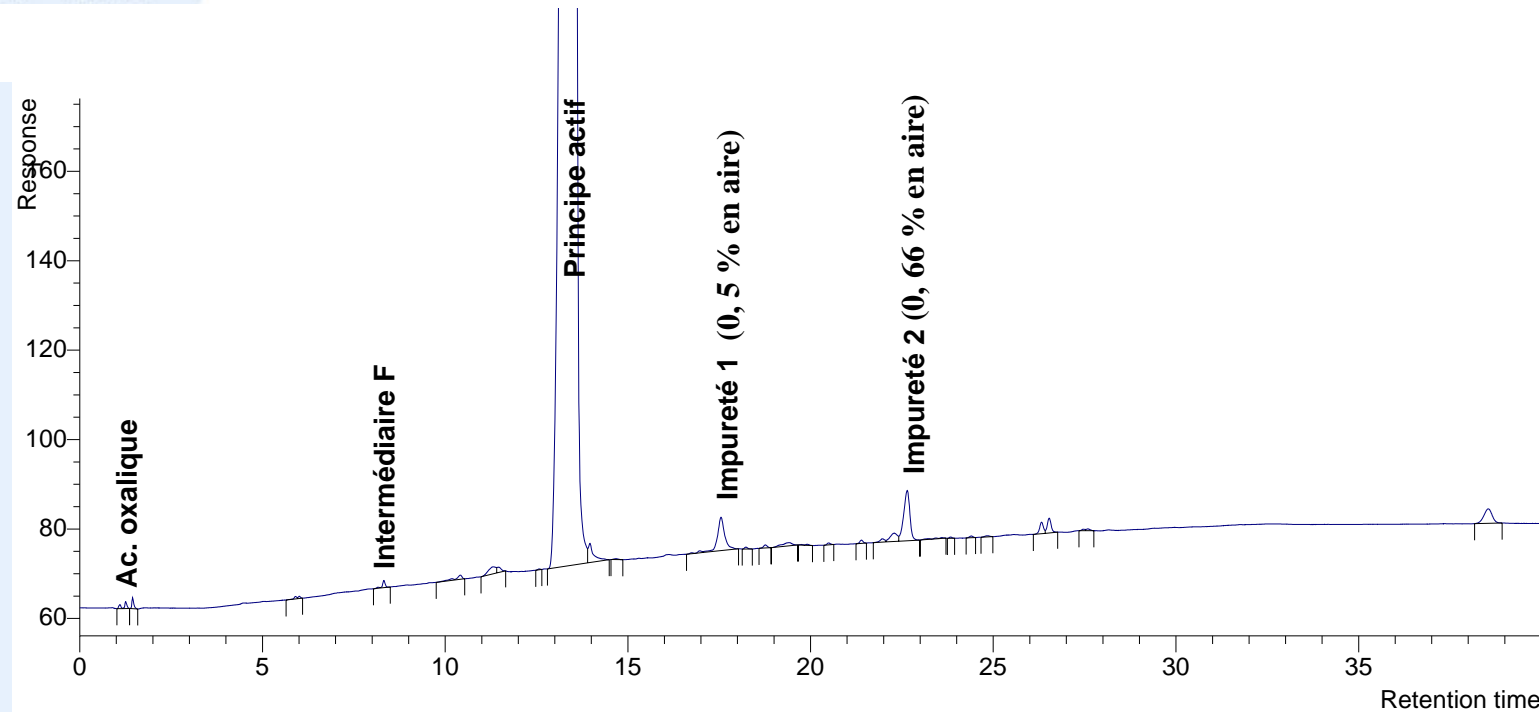
- Sécurité**

Plus de colonnes verre, plus de préparation de mélange de solvants...

- Productivité**

Vitesse linéaire plus élevée (X 20 de 25 l/h à 500 l/h), temps de préparation diminué (Packing plus rapide, utilisation de cartouches prépackées), temps de purification <1h

⚡ Chromatogramme obtenu par HPLC:

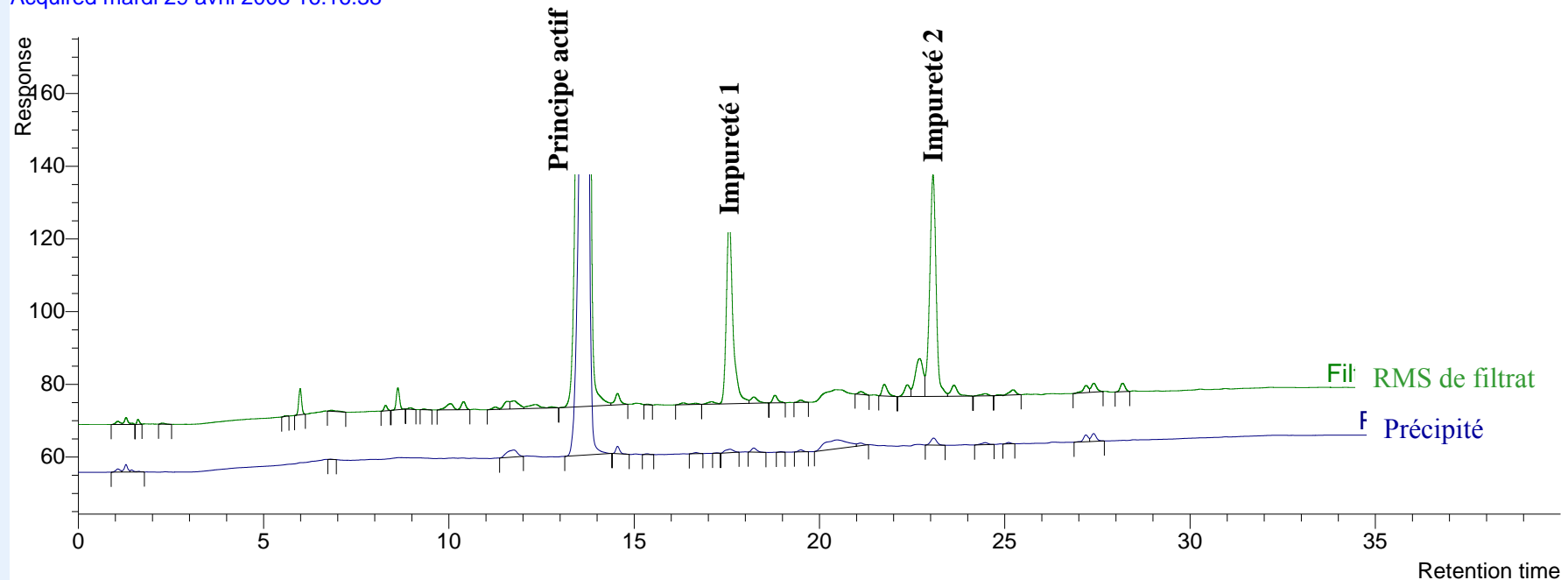


⚡ Objectif: isoler deux impuretés de Trr 1,31(impureté 1) et 1,69 (impureté 2) dans la DALC 1856, retrouvées dans tous les lots de PA.

- 1) Réempâtage dans l'éthanol effectué sur 372 g de produit.
- 2) Masse de précipité = 323 g
→ Masse du RMS de filtrat = **19 g**

Réempâtage (6,1)

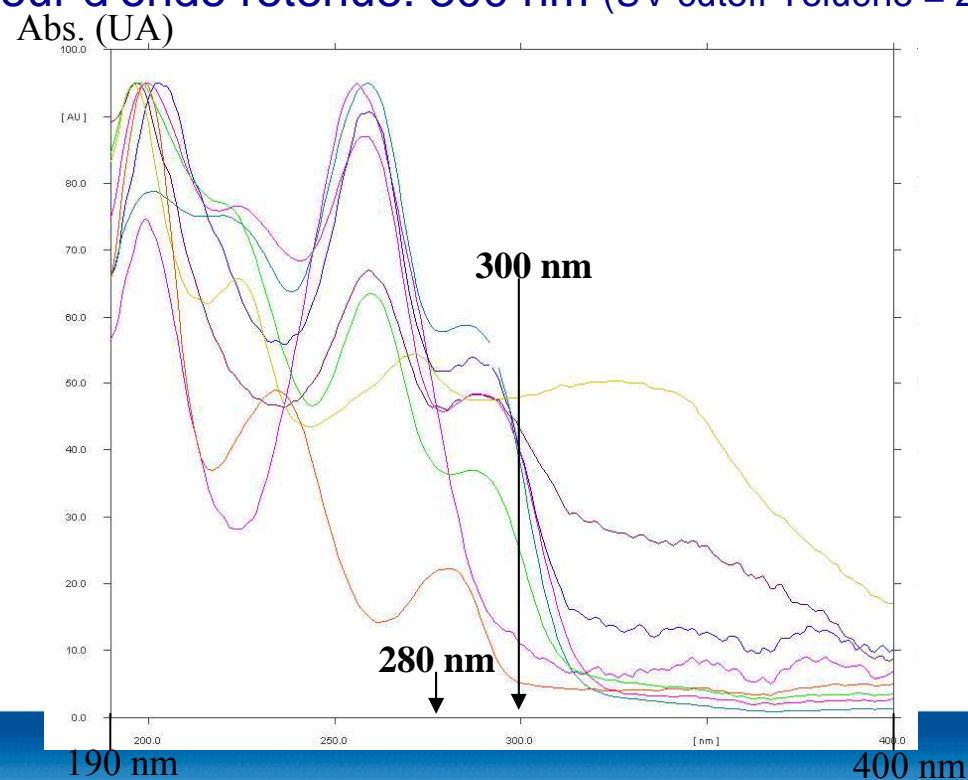
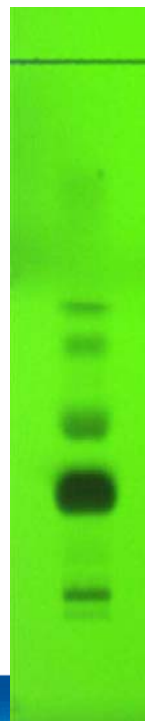
Acquired mardi 29 avril 2008 16:16:38



Résultats du réempâtage: RMS du filtrat: % en aire des impuretés multipliés par 10

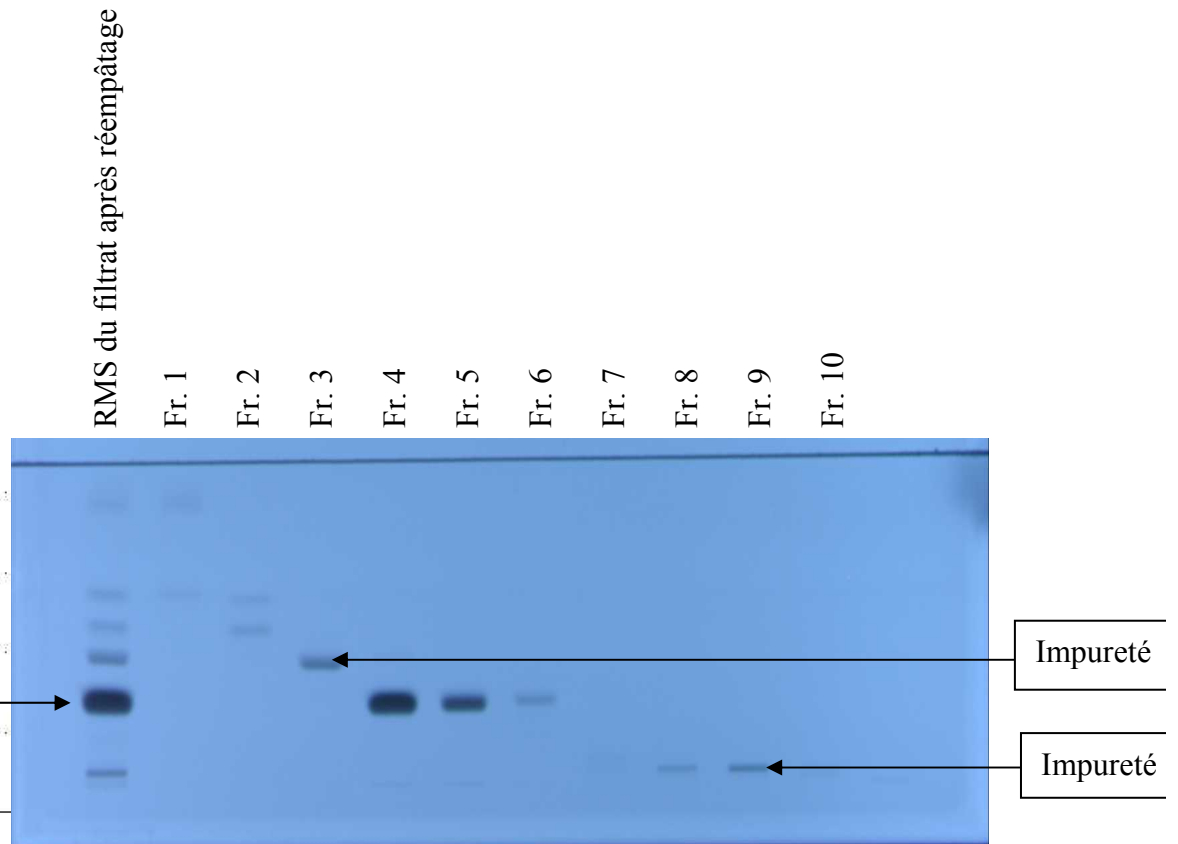
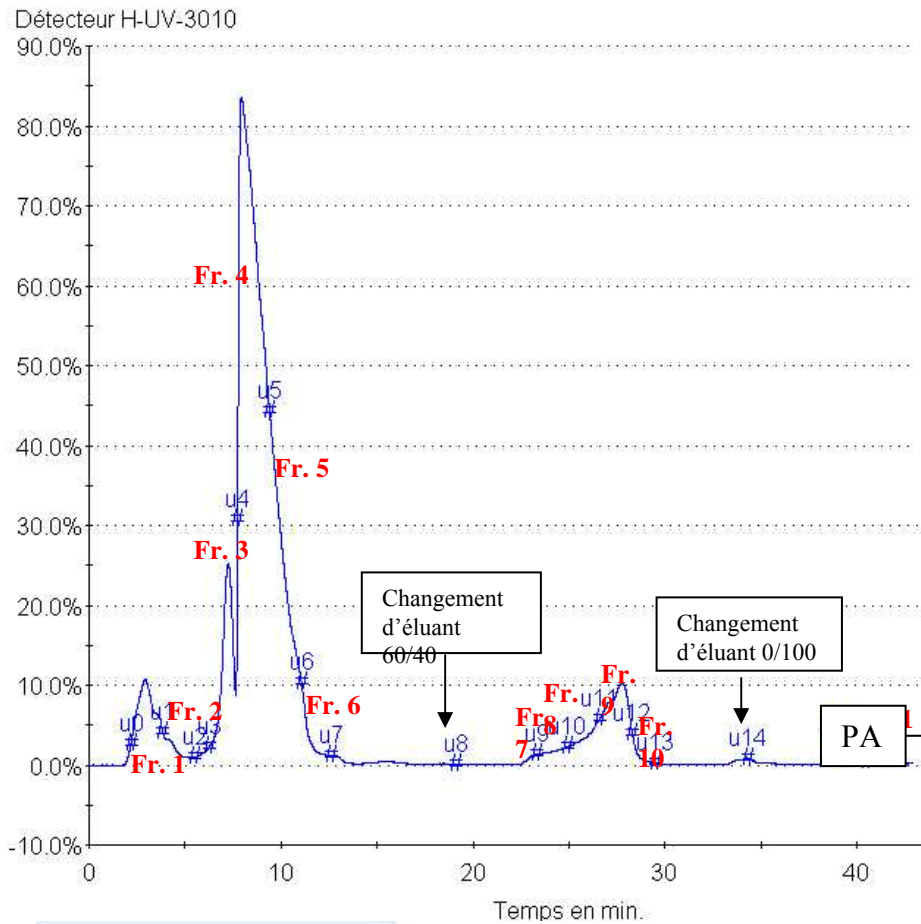
Mise au point des conditions en CCM :

- ✚ Phase stationnaire : Plaque CCM 5 x 20 cm (i.e. Merck 60F254)
- ✚ Dépôts 100 µg; Éluion sur 10 cm ; Détection U.V. 254 nm
- ✚ Système éluant: Toluène/MeOH/EtOH NH₃ 70/25/5 (V/V/V)
- ✚ Scan UV (190 – 400 nm) → Longueur d'onde retenue: 300 nm (UV cutoff Toluène = 280 nm)

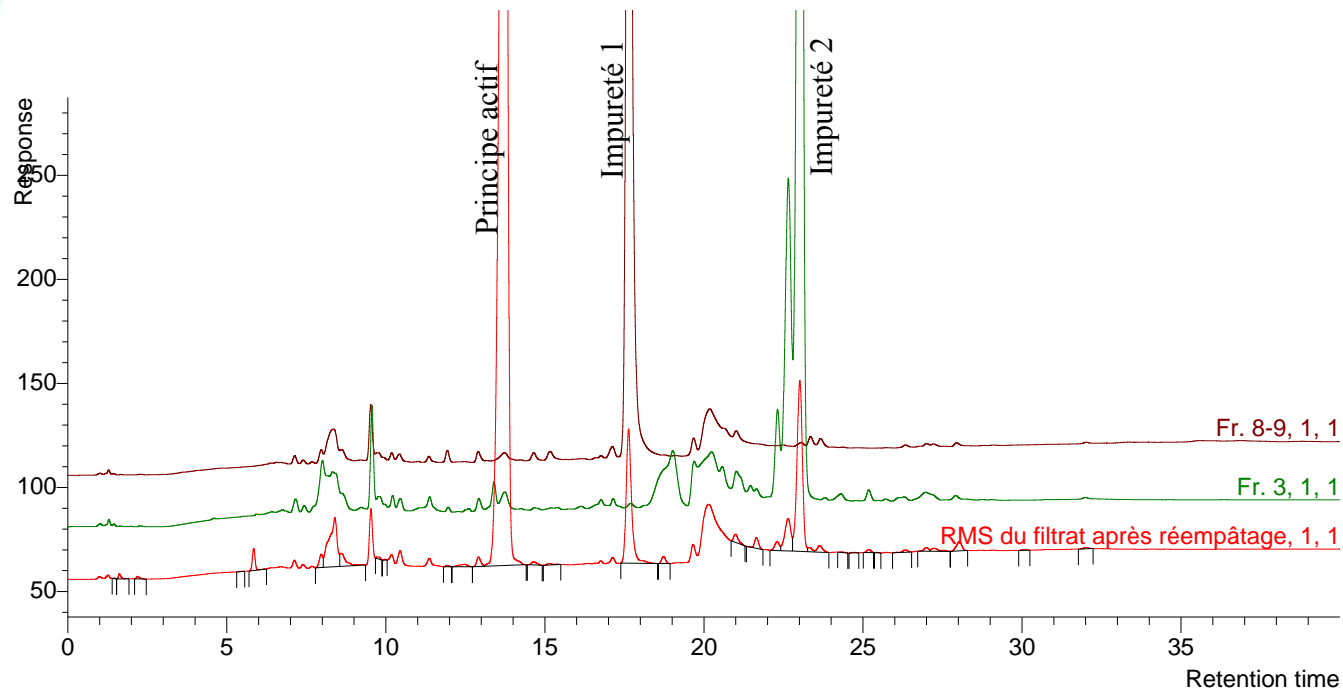


- Colonne Novasep 110 mm packée à 40 bars avec 1,5 Kg de silice normale 15-40 μm
- Éluant : step gradient toluène/ (MeOH/EtOH NH₃(25-5)) 70/30 (v/v)
- Débit : 600 mL/min
- Préparation de l'échantillon : 13,35 g de RMS en solution dans 165 mL de MeOH puis filtration sur fritté n°4 puis ajout de 385 mL de toluène au filtrat
- Détection : U.V. 300 nm





Contrôle HPLC dans la méthode DALC1856:



Fractions	Masse de produit	Impureté
3	571 mg	2 (Trr 1,69)
8-9	540 mg	1 (Trr 1,31)

✚ Bilan CCM (toluène/MeOH/EtOH NH₃ 70/25/5 v/v/v):

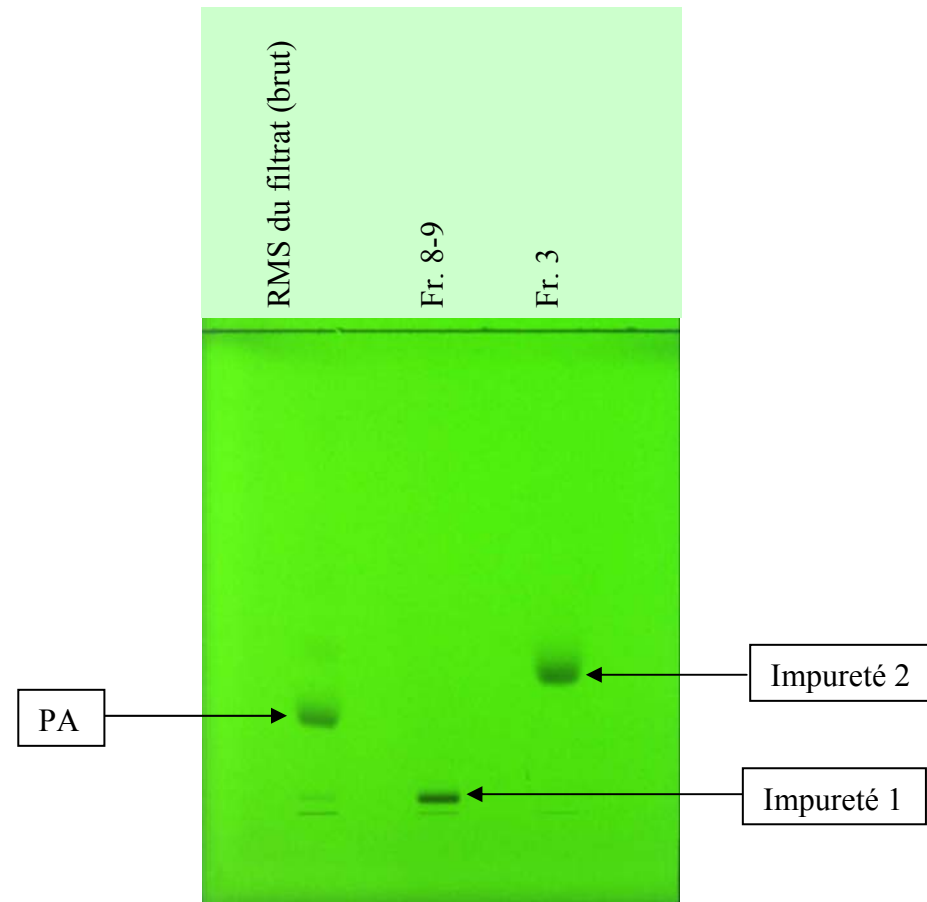
✚ Impureté 1 isolée dans les Fr. 8 et 9
(pureté HPLC = 93 %) Masse = 540 mg

✚ Impureté 2 isolée dans la Fr. 3 (pureté
HPLC = 67 %) Masse = 571 mg

✚ Identification par le Laboratoire
d'analyse structurale et stockage
dans la base d'impuretés:

✚ Impureté 1 nommée DAI 1720

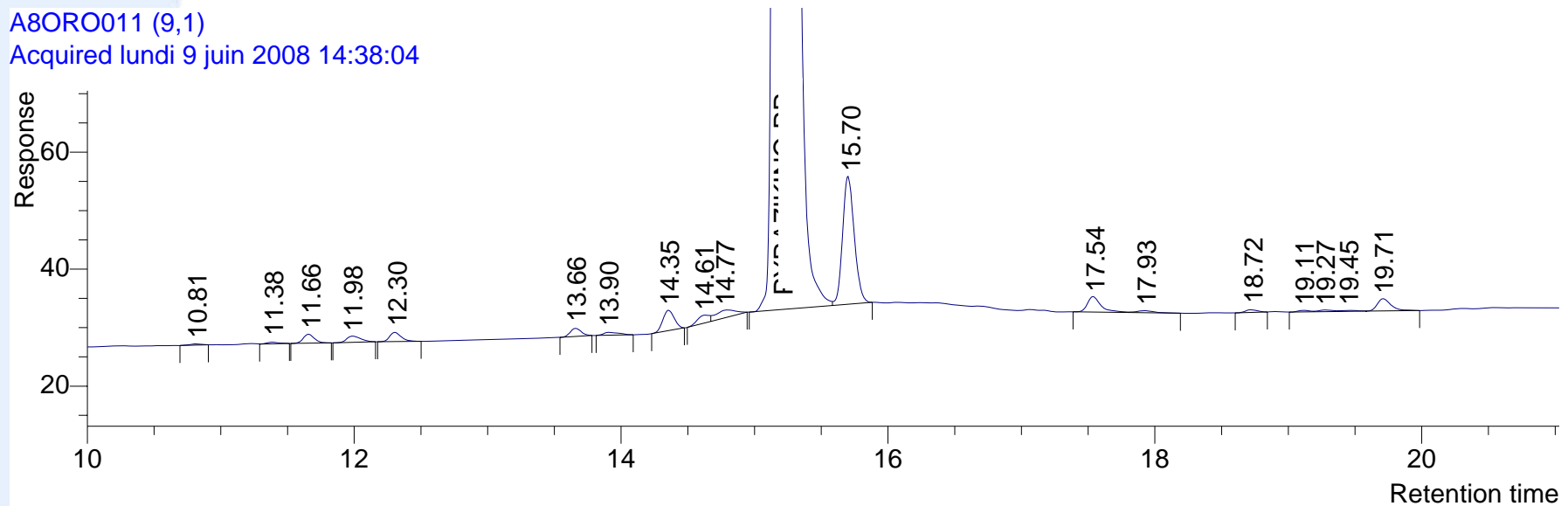
Impureté 2 nommée DAI 1718

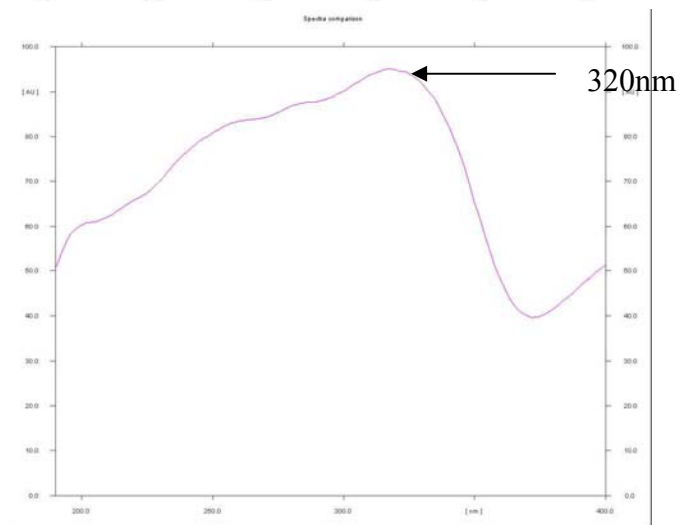
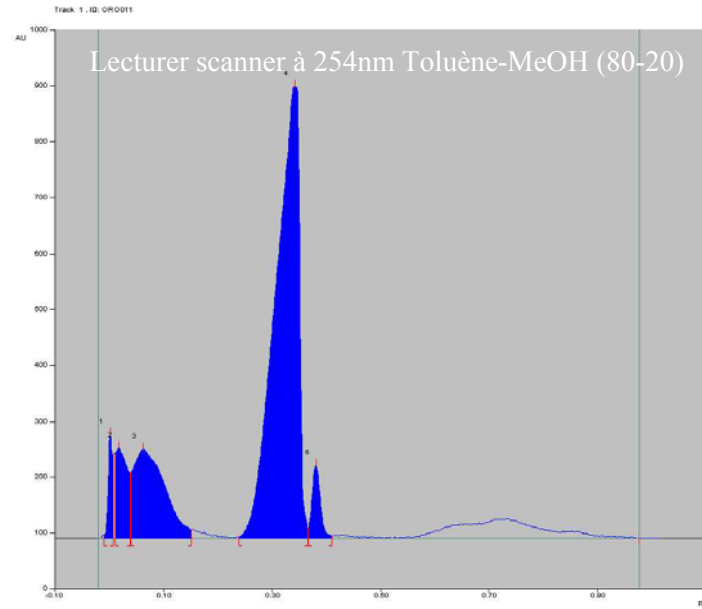
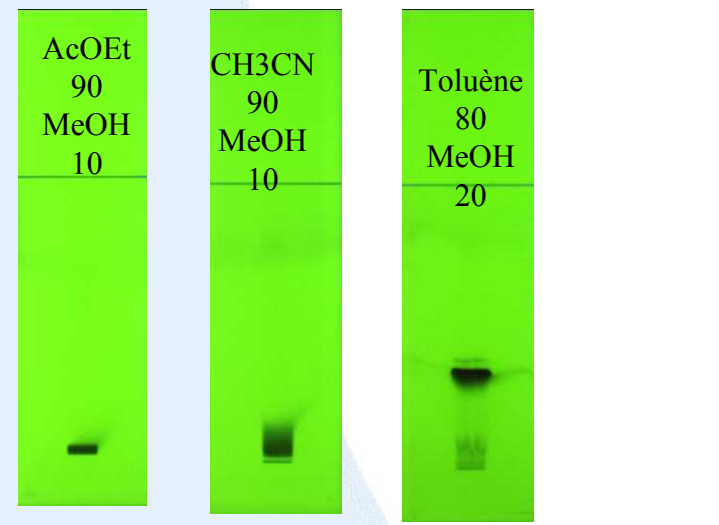
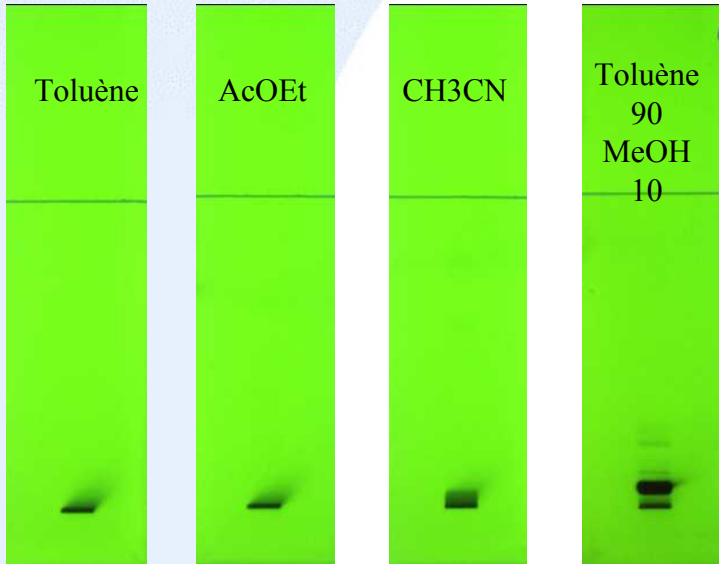


Objectif: Éliminer une impureté de Trr 1,03 détectée dans la méthode HPLC de contrôle à une teneur de 2.5%, retrouvée dans un lot de PA destiné à des études toxicologiques (Pureté de 95% insuffisante).

A8ORO011 (9,1)

Acquired lundi 9 juin 2008 14:38:04





Colonne : Prochrom diamètre 50 mm

Phase Stationnaire: Silice normale MERCK 15-40 μm 300 g

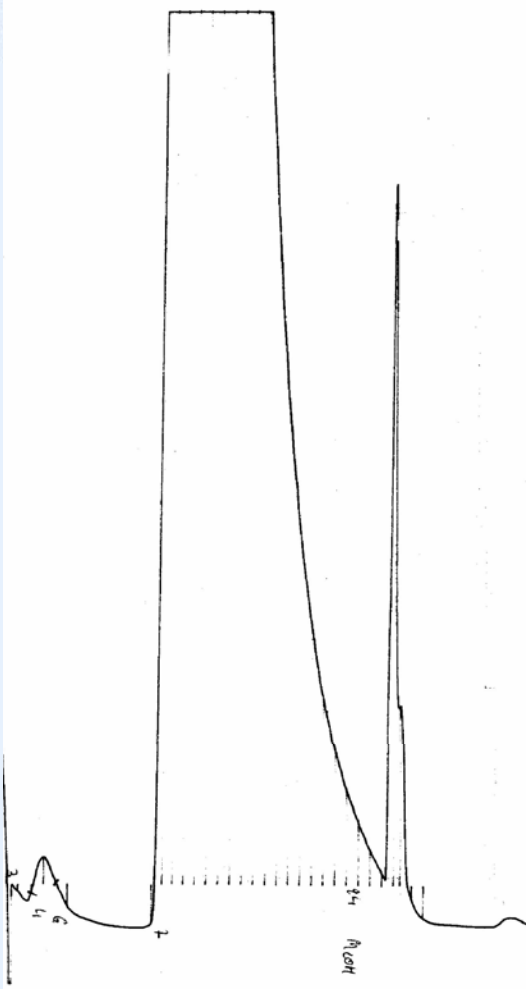
Packing: 40 bars

Eluant: Toluene – méthanol 80-20

Débit : 80 ml/min

Injection : 3.2 g de brut dans 100 ml d'éluant

Détection : UV 320 nm



Colonne : Prochrom diamètre 450 mm

Phase Stationnaire: Silice normale MERCK 15-40 μm 40 Kg

Packing: 40 bars

Eluant: Toluene – méthanol 80-20

Débit : 6.5 l/min

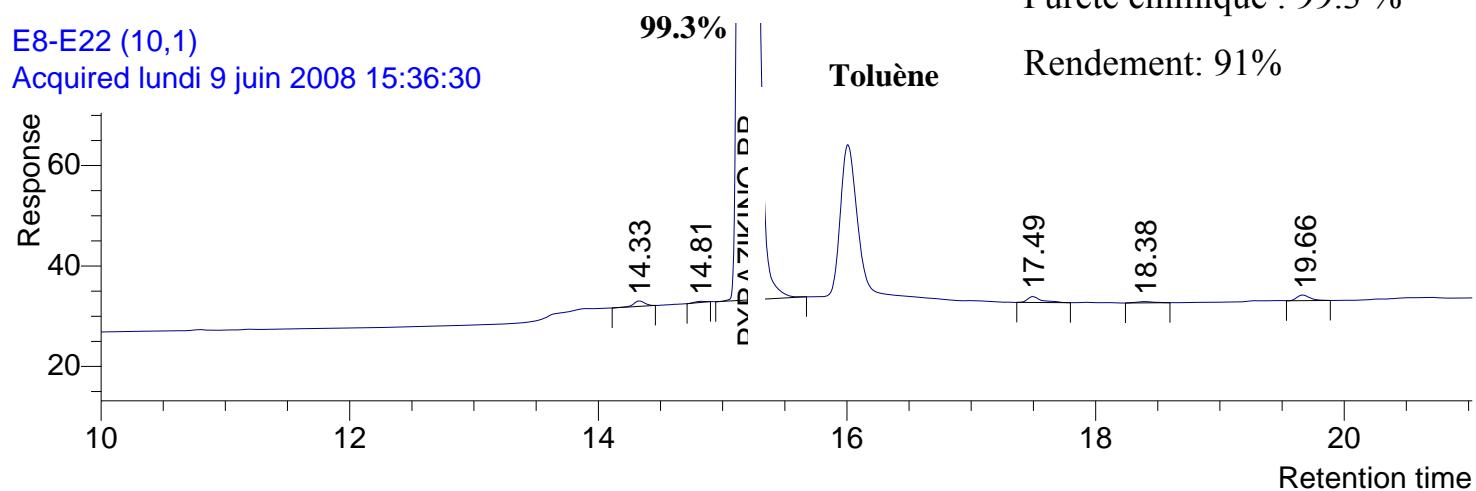
Injection : 374 g de brut dans 2500 ml d'éluant

Détection : UV 320 nm

Quantité obtenue: 340 g

Pureté chimique : 99.3 %

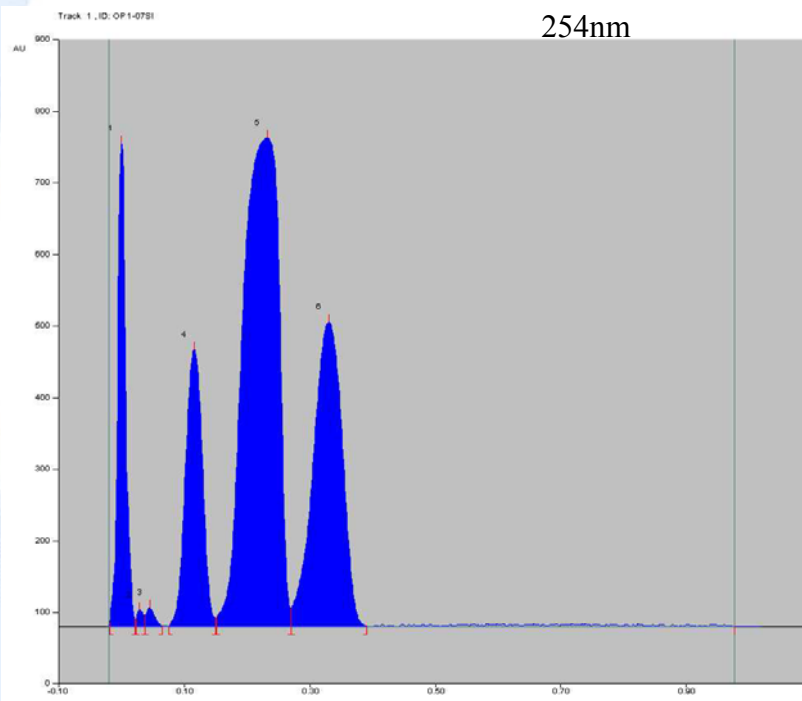
Rendement: 91%



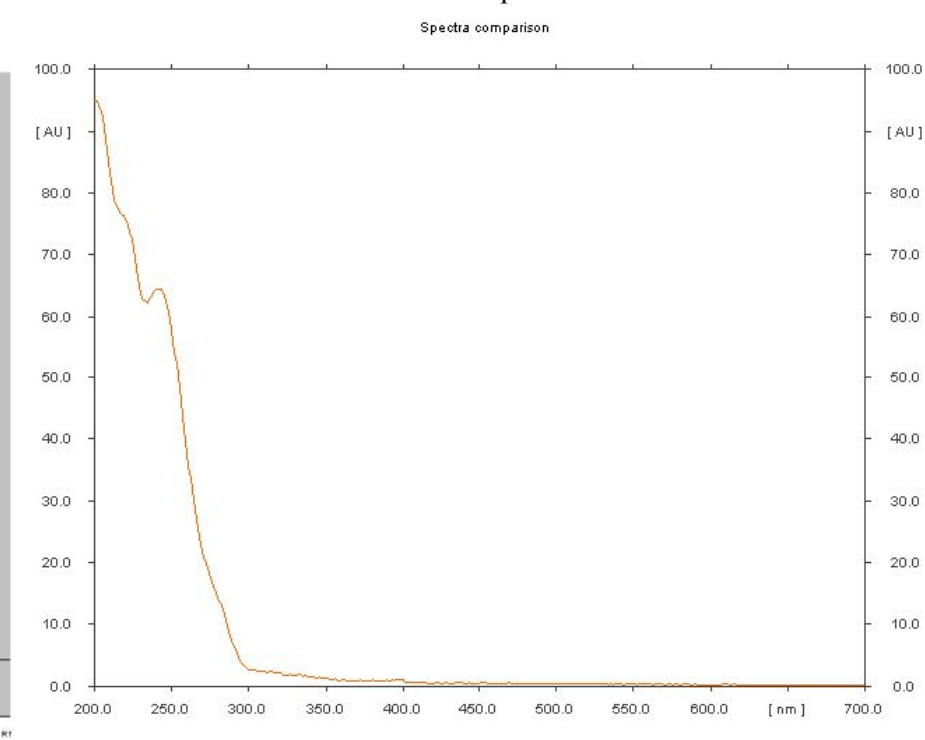
Phase stationnaire : Plaque CCM 5 x 20 (i.e. Merck 60F254)
Elution : Méthylcyclohexane 100% ; élution sur 10 cm
Dépôts : 50 µg et 100 µg
Détection : UV 254 nm



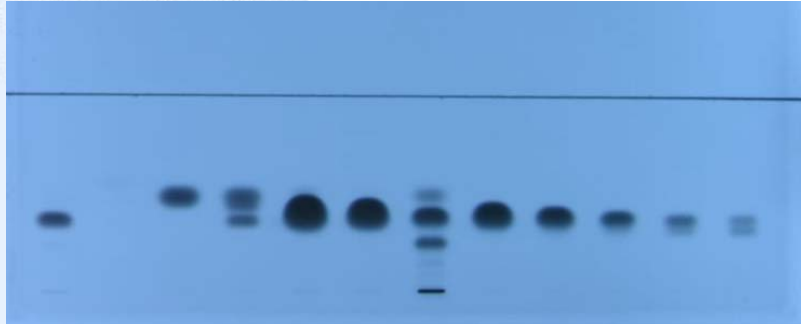
Lecture scanner à 254nm



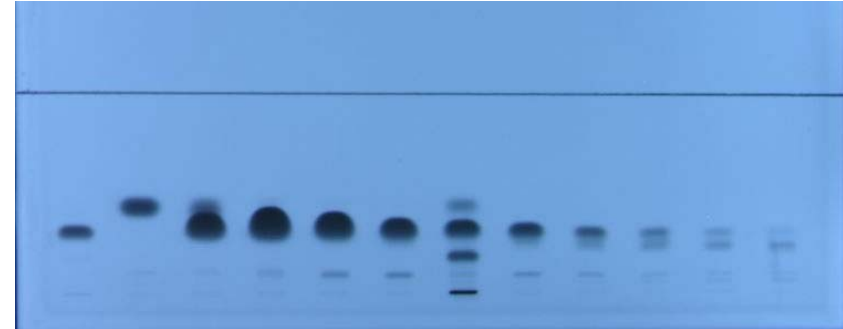
Spectre UV



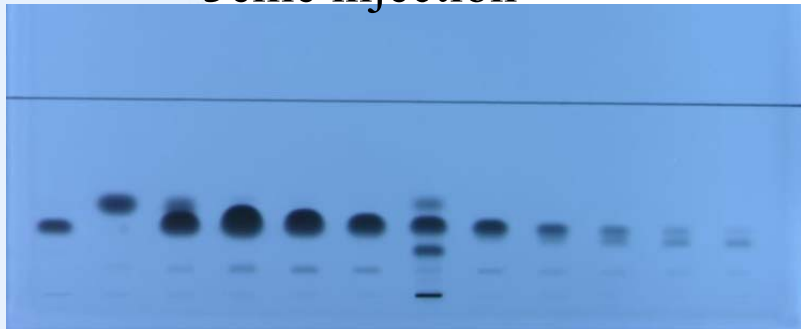
2eme injection



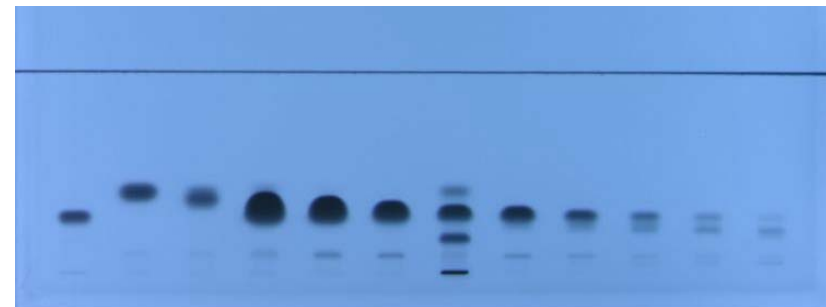
5eme injection



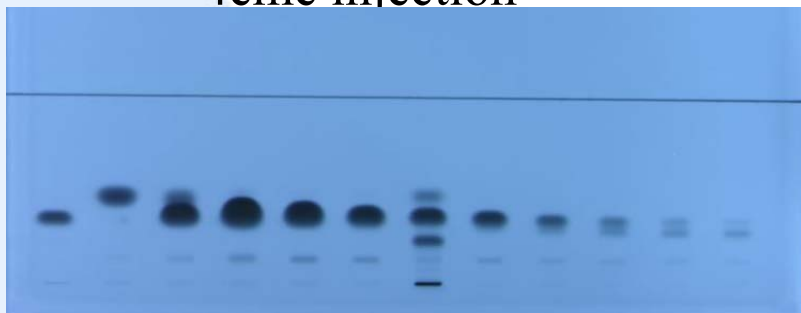
3eme injection



6eme injection



4eme injection



Colonne : Novasep diamètre 450 mm

Phase Stationnaire: Silice normale MERCK 15-40 μm 40 Kg

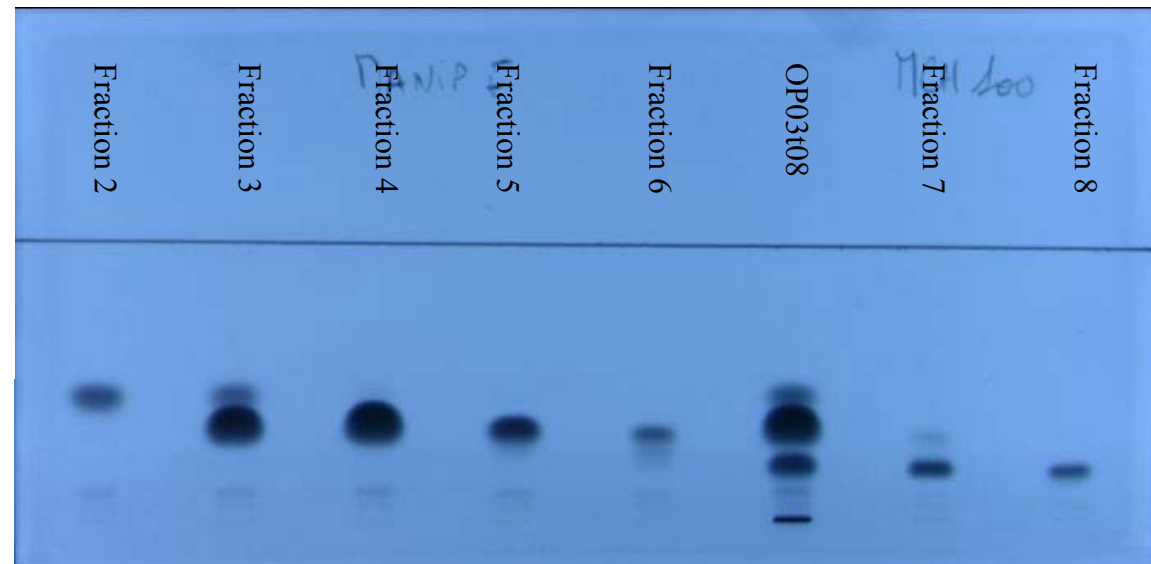
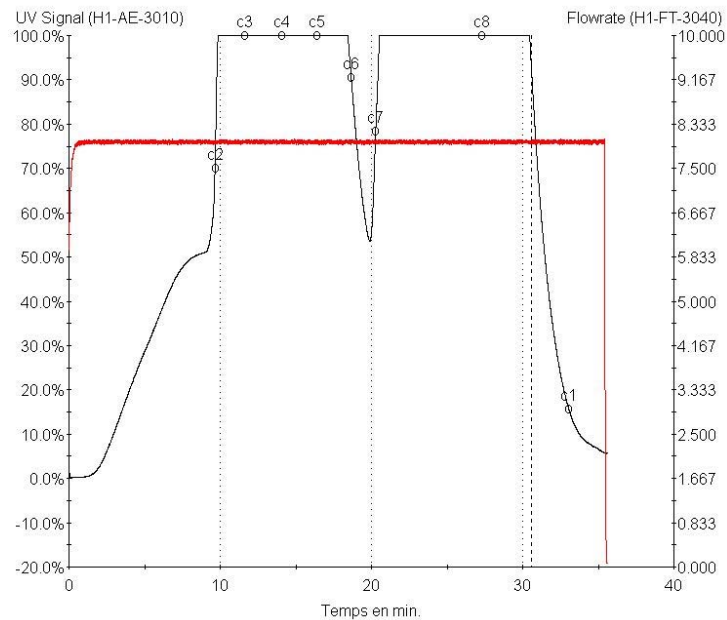
Packing: 40 bars

Eluant: Methylcyclohexane

Débit : 8 l/min

Injection : 1 Kg de brut dans 5 l de Methylcyclohexane

Détection : UV 254 nm





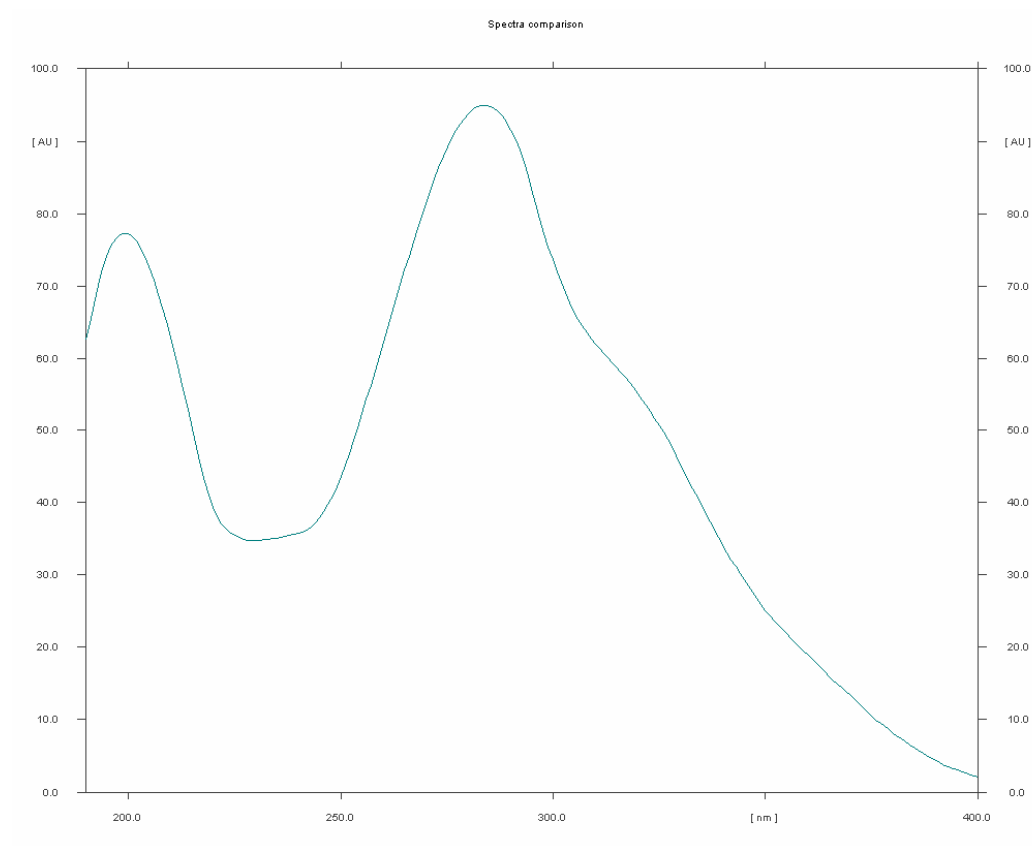
Purification de 5.1 Kg de cet intermédiaire en 6 injections de 35 min sur la même phase stationnaire.

obtention de 3.3 Kg de produit purifié soit un rendement de 64 % avec une qualité chimique de 96% (Rendement obtenu au laboratoire: 67.5%)

Purification d'un intermédiaire de synthèse en développement

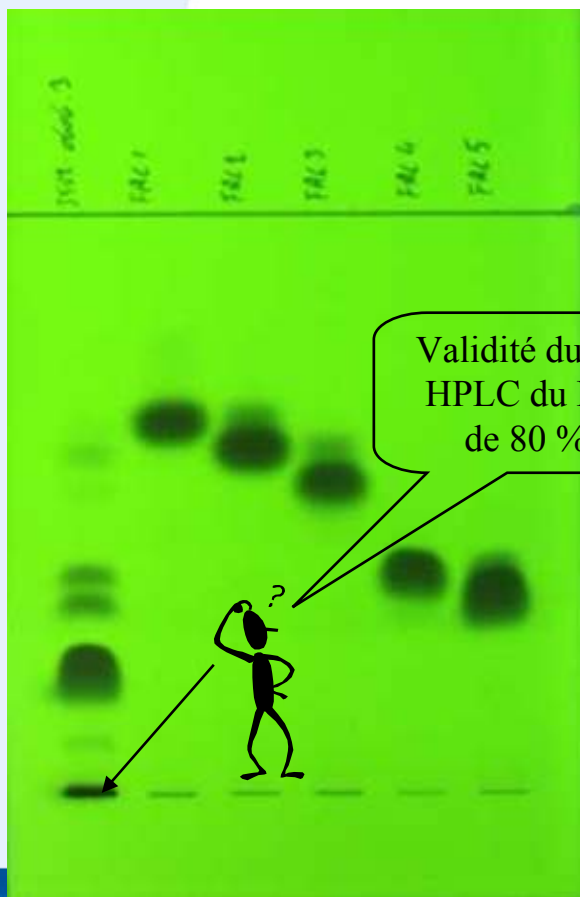
Phase stationnaire : Plaque CCM 5 x 20 (i.e. Merck 60F254)
Elution : Elution sur 10 cm
Dépôts : 100 µg
Détection : UV 254 nm

Spectre UV

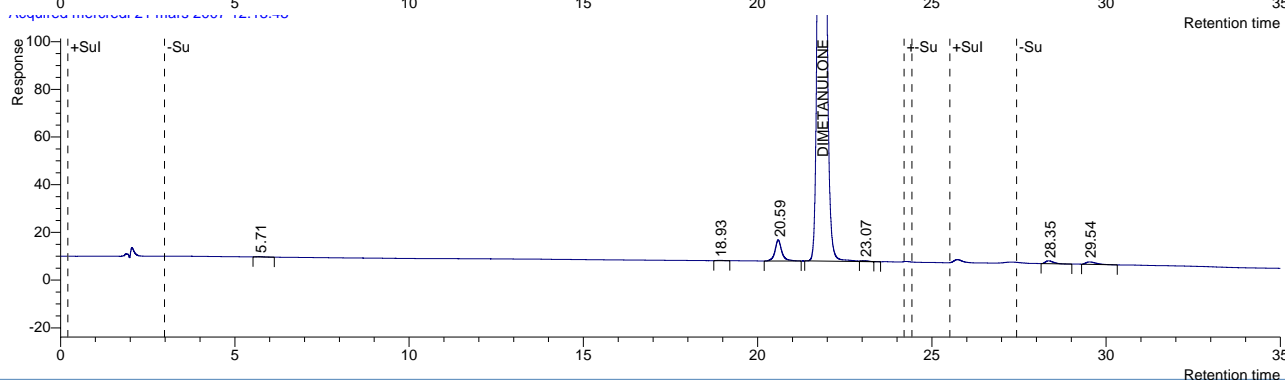
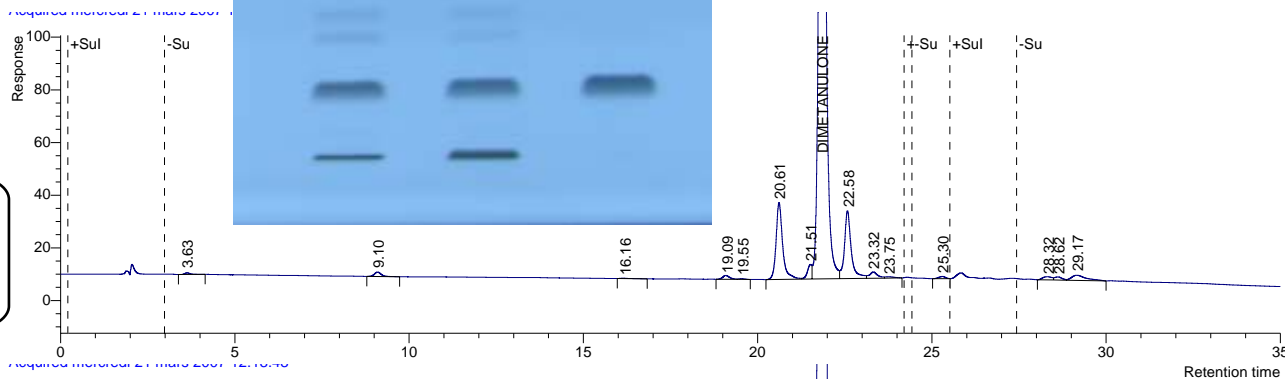
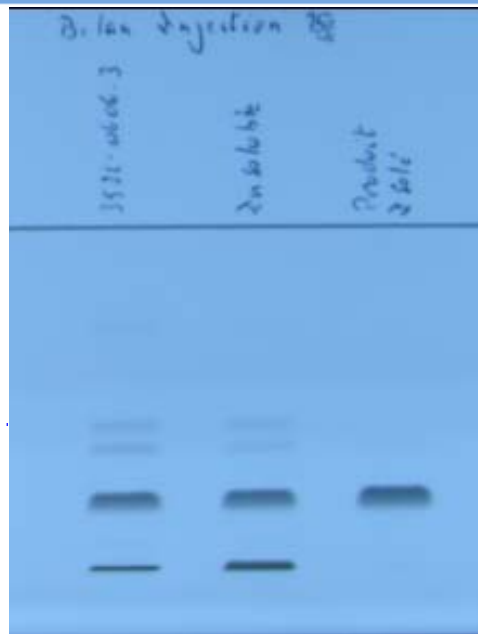


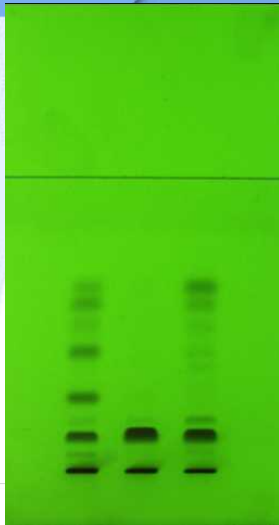
Récupération de 40 g de produit purifié soit un rendement de 53 %. Titre HPLC: brut 80 % purifié: 97 %.

Isolement de 5 impuretés identifiées par RMN



Validité du titre HPLC du Brut de 80%?





Colonne : Prochrom diamètre 450 mm

Phase Stationnaire: Silice normale MERCK 15-40 μm 25 Kg

Packing: 40 bars

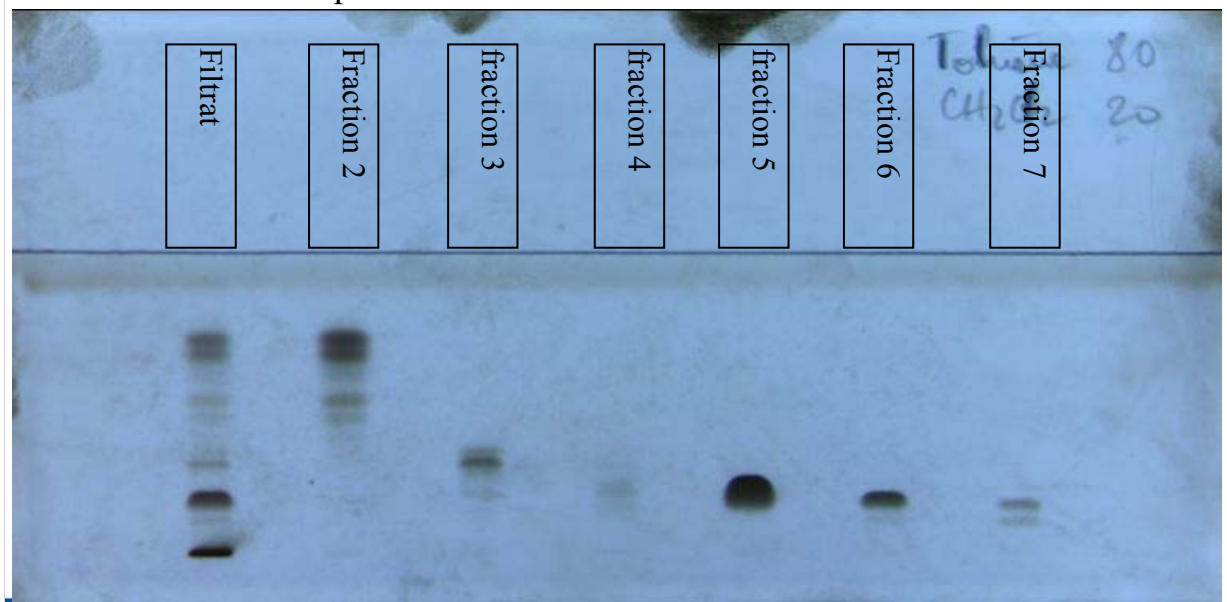
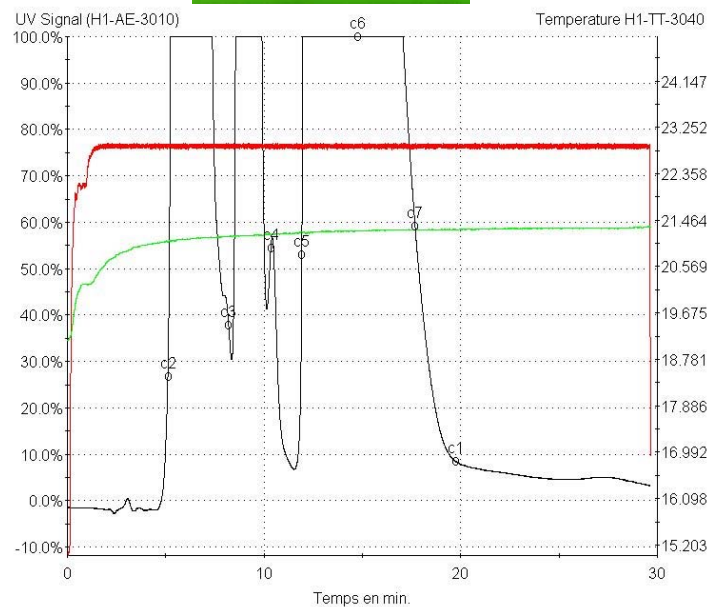
Eluant: Toluène – Dichlorométhane 80-20

Débit : 6.5 l/min

Injection : 297 g de brut dans 1350 ml d'éluant

Détection : UV 280 nm

Durée d'une opération : 30 min



Isolement d'impuretés d'un produit en développement

Colonne : Prochrom diamètre 110 mm

Phase Stationnaire: Silice normale MERCK 15-40 μm 1800 g

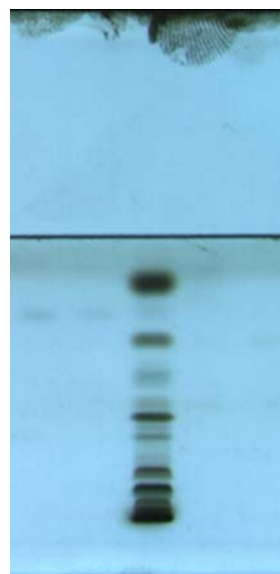
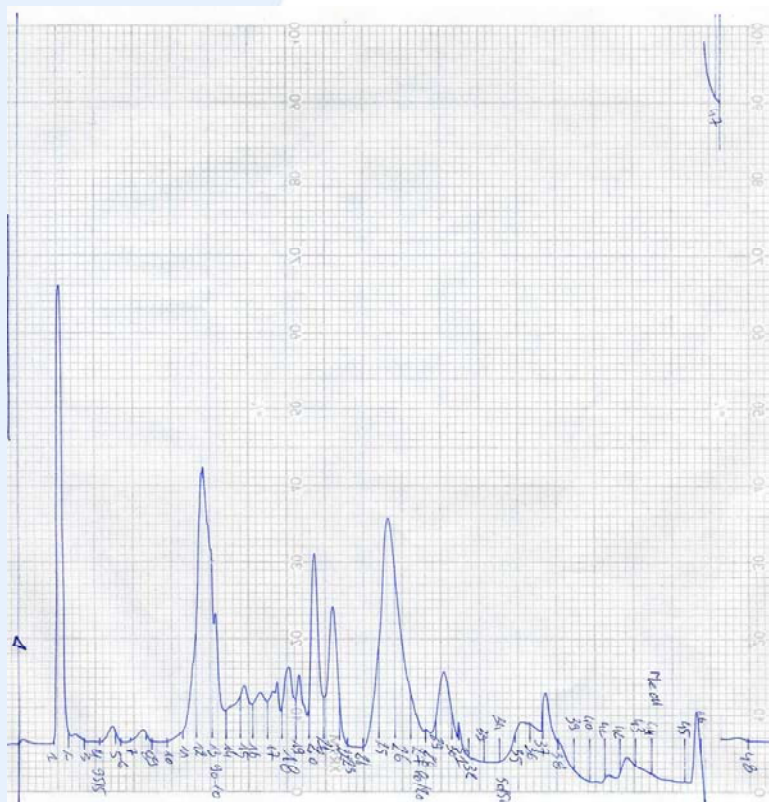
Packing: 40 bars

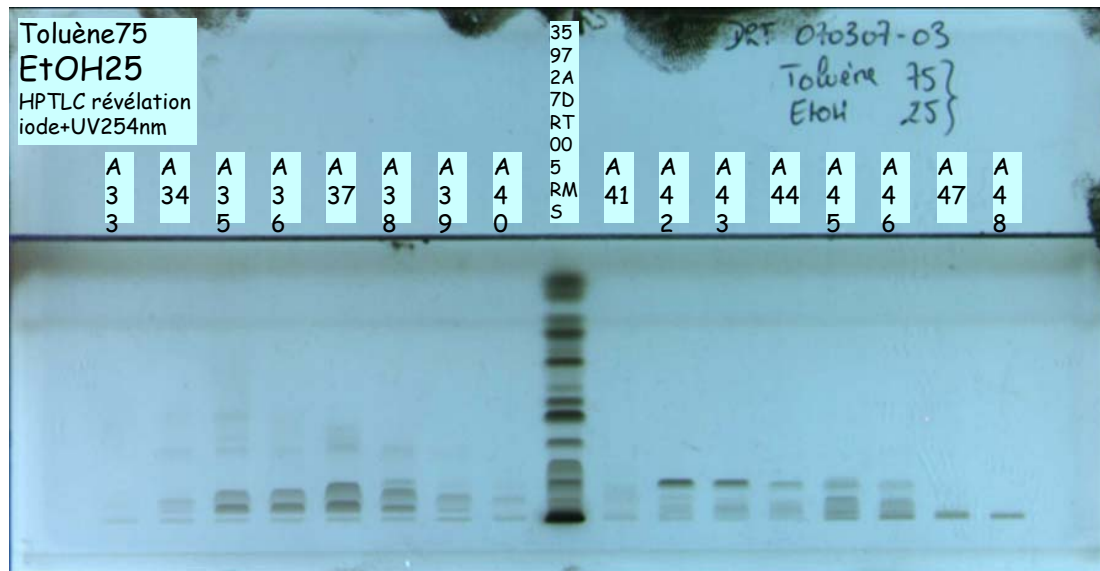
Eluant: Toluène – Éthanol 98-2 puis 95-5 90-10 80-20 50-50 puis méthanol

Débit : 500 ml/min

Injection : 40 g de brut dans 140 ml de dichlorométhane

Détection : UV 280 nm





- La Flash chromatographie est une technique simple, très rapide qui permet l'isolement d'impuretés pour identification structurale et la purification de produits de synthèse.
- Elle est basée sur la Chromatographie sur Couche Mince qui est une méthode qui permet de visualiser tout ce qui est déposé et notamment les produits à $R_f=0$.
- La CCM est une méthode complémentaire à la HPLC. Une impureté ayant un TRR proche du produit principal en HPLC peut être bien séparé en CCM
- La CCM et la flash chromatographie sont désormais des techniques performantes grâce à des instruments automatisés disponibles commercialement (déposeur, cuve d'éluion et densitomètre permettant la quantification et appareils de flash chromatographie)

**Merci
de
votre
attention**

