



Étude de l'impact de l'humidité relative lors des analyses d'identification de plantes par HPTLC

Plan

- **Présentation**
- **Étude de l'impact**
- **Conclusions**

Plan

- **Présentation**
- **Étude de l'impact**
- **Conclusions**

Le groupe Pierre Fabre

- **Laboratoire pharmaceutique créé en 1961**
- **9900 salariés dans le monde dont 70 % en France**
- **Structuré autour de 3 activités complémentaires :**
 - Pierre Fabre Médicament



Insuffisance veineuse



Anti-cancéreux



Urologie - Hypertrophie de la prostate

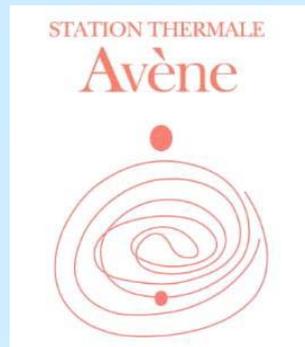


Anti-dépresseur



Le groupe Pierre Fabre

- Laboratoire pharmaceutique créé en 1961
- 9900 salariés dans le monde dont 70 % en France
- Structuré autour de 3 activités complémentaires :
 - Pierre Fabre Dermo-Cosmétique



Le groupe Pierre Fabre

- Laboratoire pharmaceutique créé en 1961
- 9900 salariés dans le monde dont 70 % en France
- Structuré autour de 3 activités complémentaires :
 - Pierre Fabre Santé



ORL



Sevrage tabagique



Soin bucco-dentaire



Dermatologie



Elusanes

Aromathérapie

Le groupe Pierre Fabre

- **Laboratoire pharmaceutique créé en 1961**
- **9900 salariés dans le monde dont 70 % en France**
- **Structuré autour de 3 activités complémentaires :**
 - Pierre Fabre Médicament
 - Pierre Fabre Dermo-Cosmétique
 - Pierre Fabre Santé

Le Centre de Recherche de Saint Augustin

- **Construction en 2005**
- **Effectif : 17 personnes**
- **Unité de R&D spécialisée dans les produits de phytothérapie du groupe Pierre Fabre**
 - Laboratoire Analytique
 - Laboratoire Microbiologique
 - Laboratoire Galénique
- **Prestataires pour divers clients internes au groupe**
 - Développement pharmaceutique de produits (70 %)
 - Contrôle et libération de produits (15 %)
 - Prospection pour approvisionnement (10 %)
 - Recherche de principes actifs (5 %)
 - Stockage conditions ICH (115 m² d'enceintes climatiques)

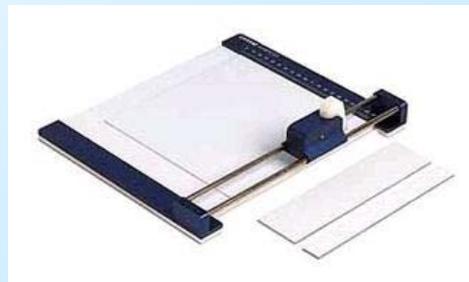
Activités

- **Analytique et microbiologique :**
 - Développement, mise au point et validation de méthodes
 - Études de stabilité
 - Transfert de méthodes aux laboratoires de contrôle qualité
- **Galénique :**
 - Caractérisation
 - Mise au point de formules, de process de fabrication
 - Transposition sur les sites de production
- **Rédaction des parties de dossiers réglementaires concernées**
 - AMM (Dossier CTD)
 - Compléments Alimentaires (Dossier Technique)

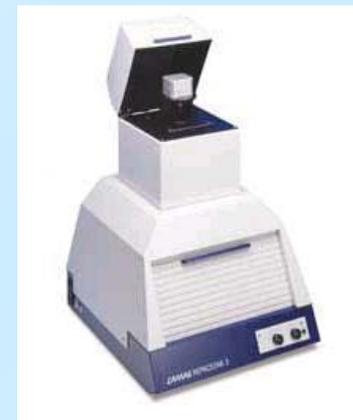
Équipements liés aux analyses CCM et HPTLC



Système de développement accéléré



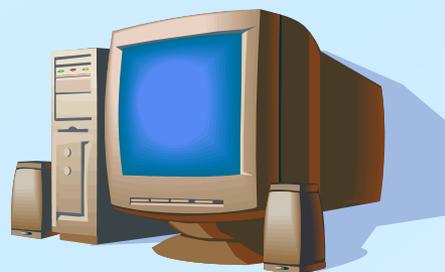
Coupe plaque



Caméra UV - Visible



Déposeur automatique



Appareils pilotés par ordinateur
(traçabilité et archivage des données)



Plaque chauffante



Cuves de migration



Migrateur automatique



Cabine de pulvérisation

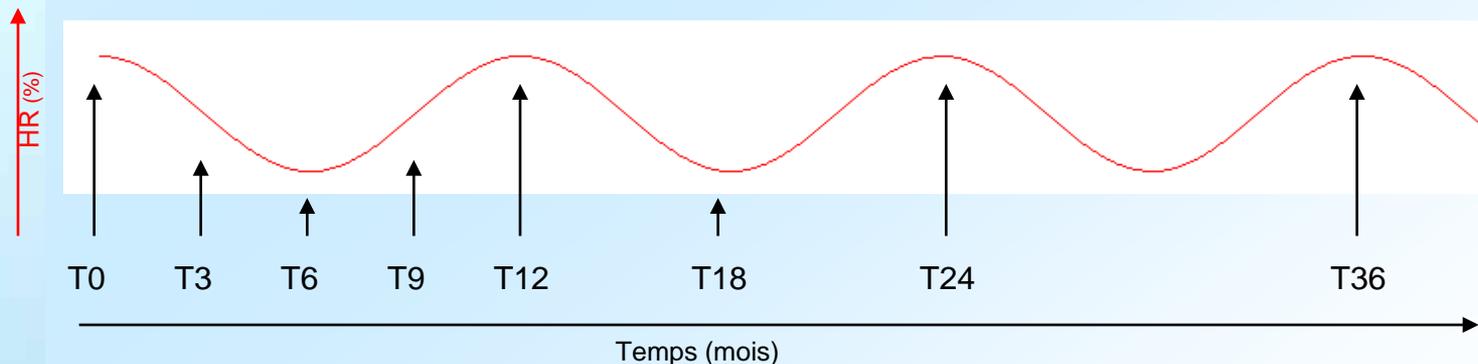
Plan

- **Présentation**
- **Étude de l'impact**
- **Conclusions**

Constat

- Analyses réalisées à 99,9 % sur plaque de silice
- Lors des analyses de stabilité, les profils CCM ou HPTLC peuvent évoluer au cours des différents pointages (T0, T3, T6, T9, T12, T18, T24, T36)
- Nous avons mis en évidence un rapport de saisonnalité avec les profils (T0 généralement proche de T12, T24, T36 et T6 généralement proche de T18)

→ **Impact de l'humidité relative** (variation pouvant aller de 20% en hiver à 80% en été)



Solutions envisagées

- **Réguler l'humidité relative de la plaque de silice** (stockage des plaques dans un dessiccateur / séchage des plaques en étuve)
→ Inutile : la silice réabsorbera immédiatement l'humidité de par ses propriétés intrinsèques
- **Réguler l'humidité relative de la pièce**
→ Investissement très lourd et très coûteux
- **Réguler l'humidité relative lors de l'analyse**
→ Possible via migrateur automatique (donc uniquement en HPTLC) avec ajout d'un module de contrôle d'humidité relative



Solutions envisagées

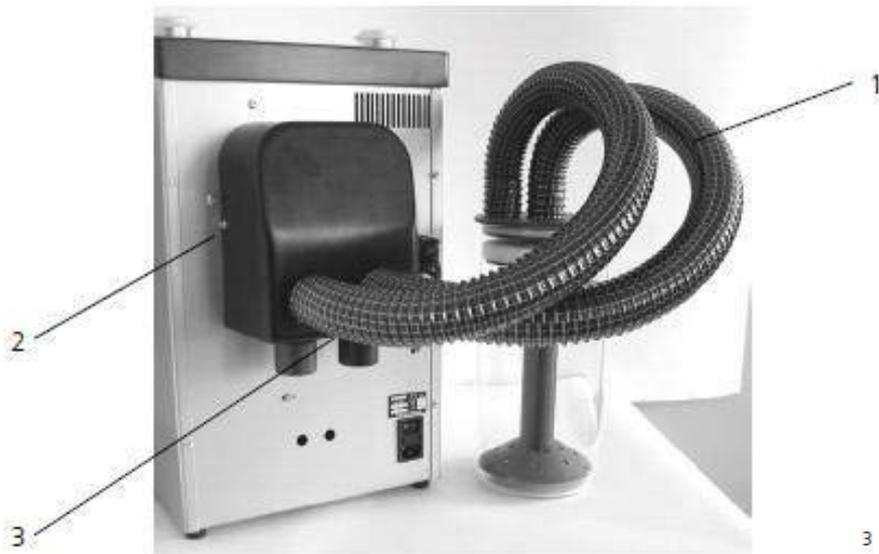
- **Réguler l'humidité relative de la plaque de silice** (stockage des plaques dans un dessiccateur / séchage des plaques en étuve)
→ Inutile : la silice réabsorbera immédiatement l'humidité de par ses propriétés intrinsèques
- **Réguler l'humidité relative de la pièce**
→ Investissement très lourd et très coûteux
- **Réguler l'humidité relative lors de l'analyse**
→ Possible via migrateur automatique (donc uniquement en HPTLC) avec ajout d'un module de contrôle d'humidité relative



Piste privilégiée :

**Prêt du module par la société
Chromacim**

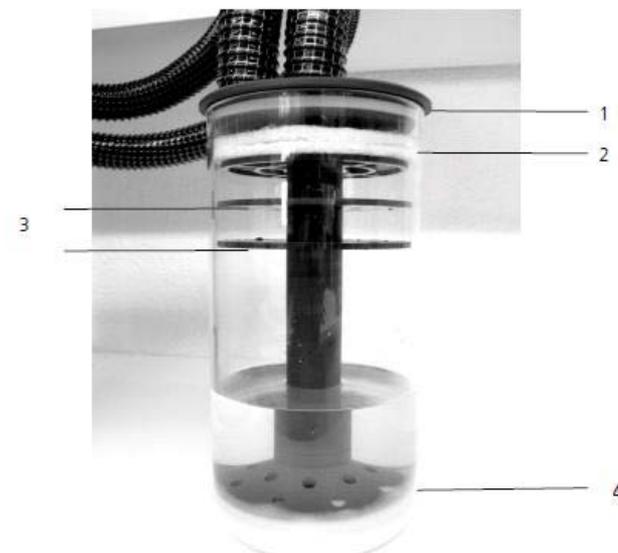
Migrateur automatique



Migrateur automatique de dos
Module de contrôle d'humidité relative

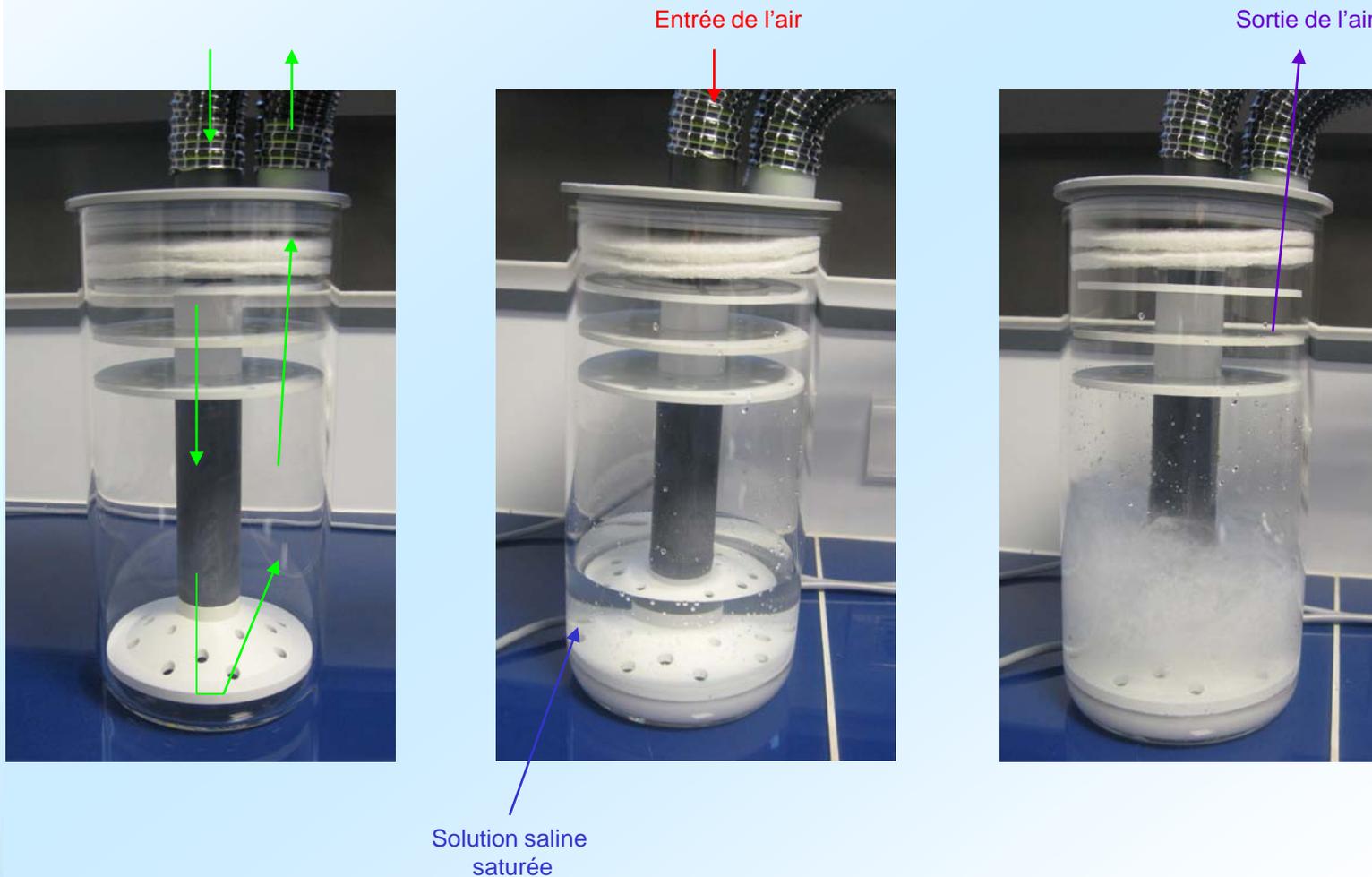


Migrateur automatique



Vase du module de contrôle
d'humidité relative

Principe de fonctionnement

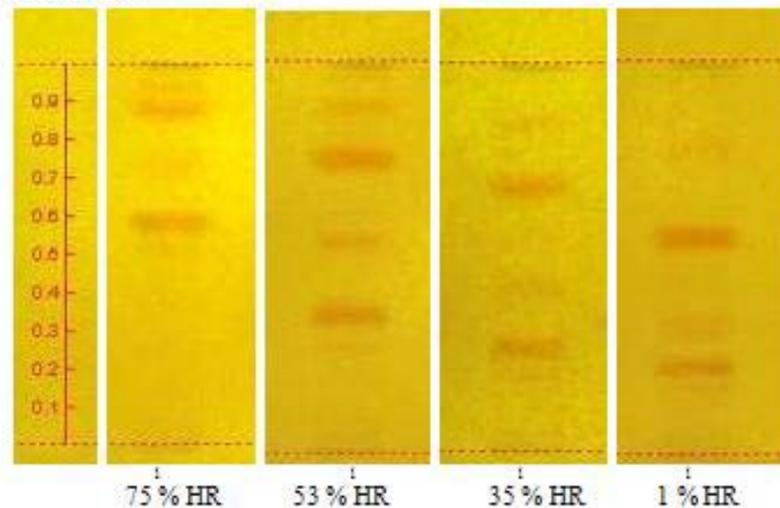


Méthodologie

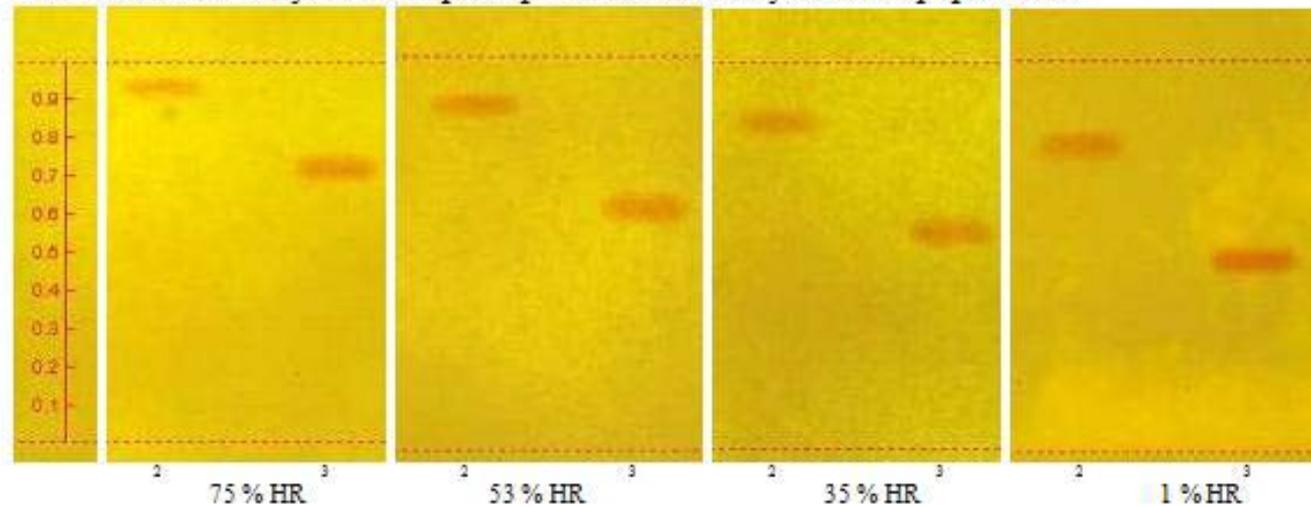
- **Sélection d'analyses CCM et HPTLC très impactées par l'humidité relative fluctuante du laboratoire.**
- **Adaptation / Transfert des CCM en HPTLC.**
- **Réalisation des analyses à 4 conditions (à ~ 20°C) :**
 - ~ 75 % HR (solution de chlorure de sodium saturée)
 - ~ 47 % HR (solution de thiocyanate de sodium saturée)
 - ~ 33 % HR (solution de chlorure de magnésium saturée)
 - < 10 % HR (tamis moléculaire) en théorie 0 %

Résultats obtenus : Produit 1

Essai PF



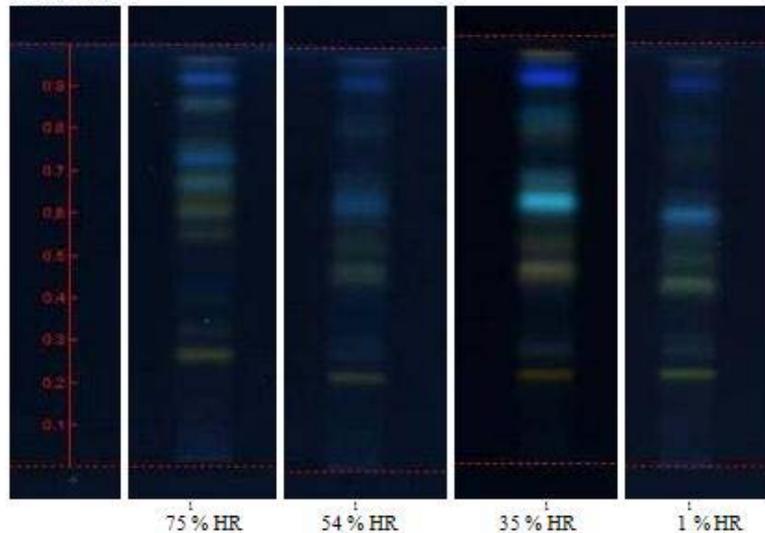
Témoins de chlorhydrate de protopine et de chlorhydrate de papavérine



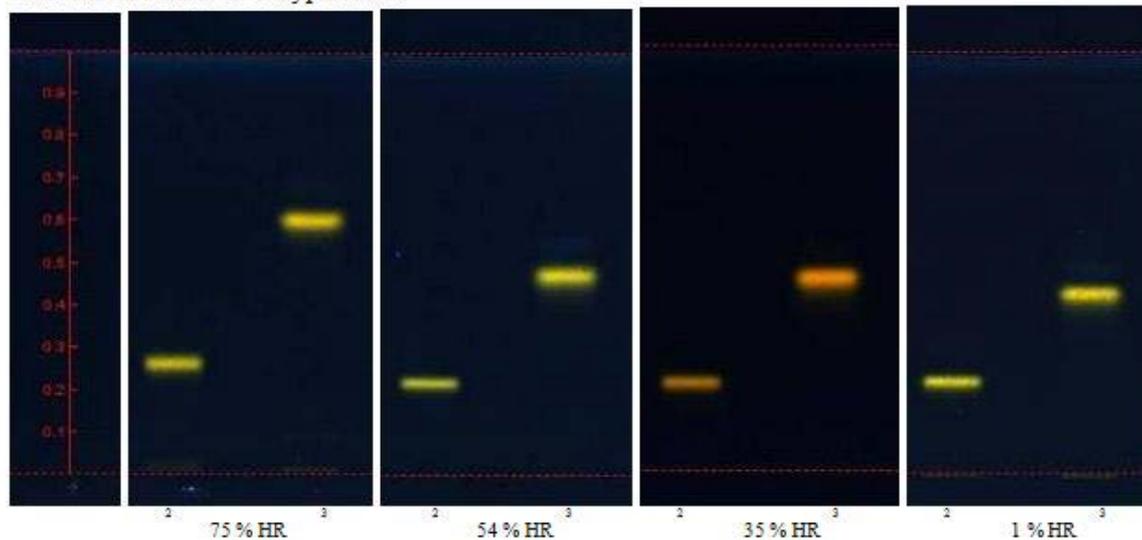
- **Famille de molécules** :
Alcaloïdes
- **Phase mobile** :
Ammoniaque cc R 4V
Méthyléthylcétone R 32V
Ether R 64V
- **Révéléateur** :
Solution d'iodobismuthate
de potassium R

Résultats obtenus : Produit 2

Essai PF



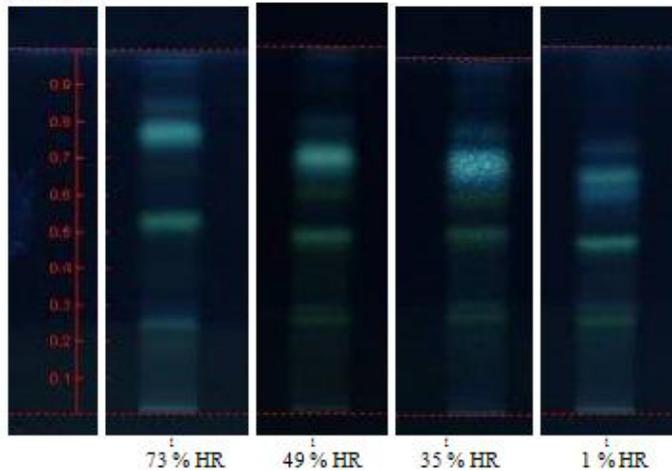
Témoin de rutine et d'hypéroside



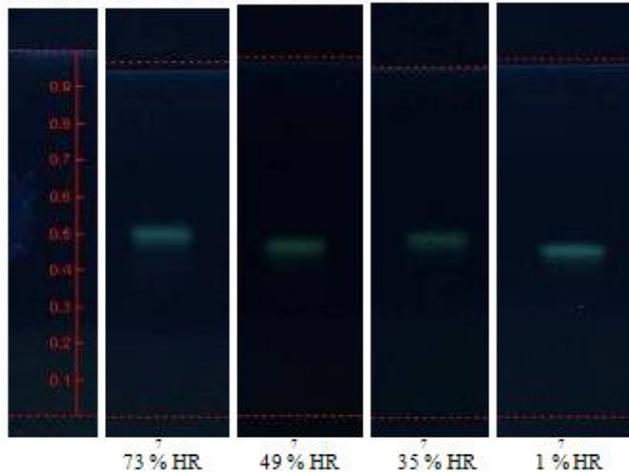
- **Famille de molécules** :
Flavonoïdes
- **Phase mobile** :
Acétate d'éthyle R - 100V
Eau R - 10V
Acide formique R - 10V
- **Révéléateur** :
Solution de diphenylborate
d' aminoéthanol R à 10 g/L
dans le méthanol R et
solution de macrogol 400 R
à 50 g/L dans le méthanol R

Résultats obtenus : Produit 3

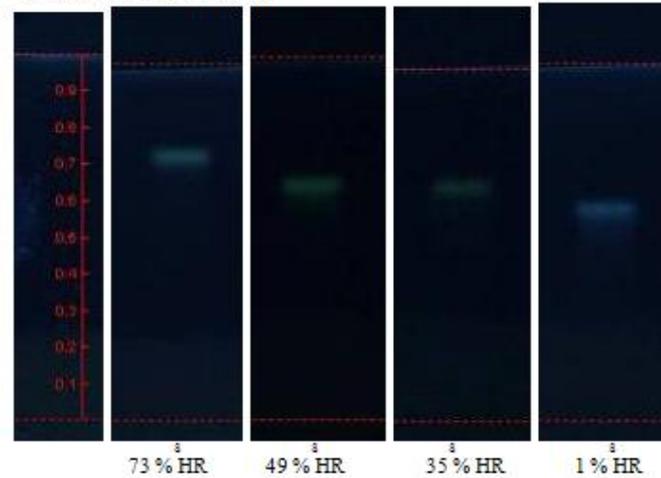
Essai PF



Témoin de vitexine-2-O-rhamnoside

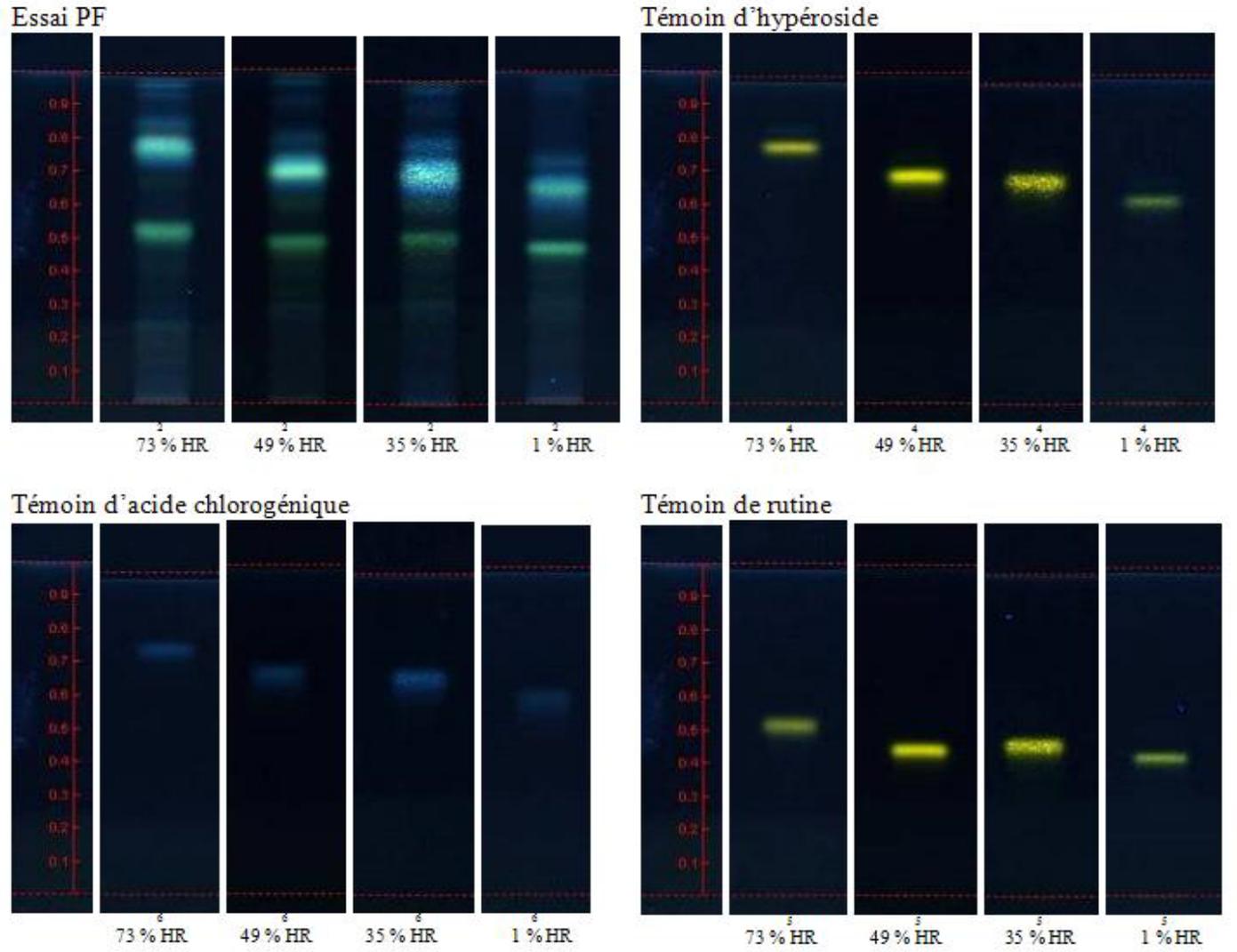


Témoin d'isovitexine



- **Famille de molécules** : Flavonoïdes
- **Phase mobile** :
Acide formique R - 10V
Eau R - 10V
Méthyléthylcétone R 30V
Acétate d'éthyle R - 60V
- **Révéléteur** :
Solution de diphénylborate d' aminoéthanol R à 10 g/L dans le méthanol R et solution de macrogol 400 R à 50 g/L dans le méthanol R

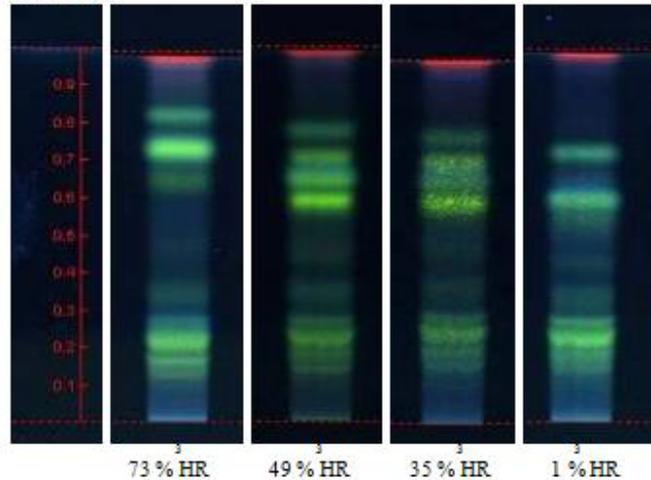
Résultats obtenus : Produit 4



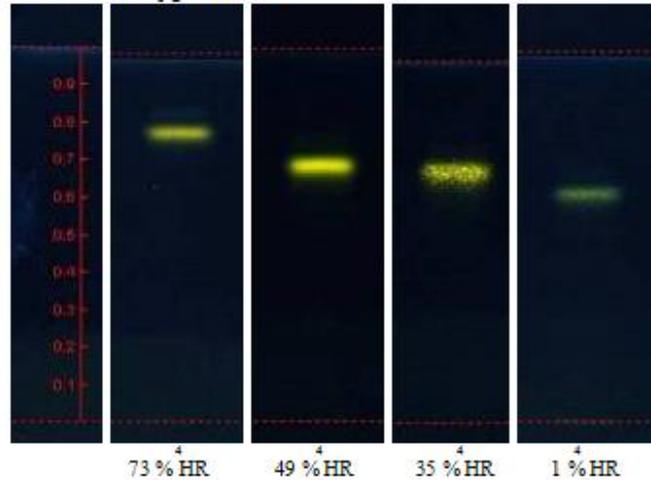
- **Famille de molécules** :
Flavonoïdes
- **Phase mobile** :
Acide formique R - 10V
Eau R - 10V
Méthyléthylcétone R 30V
Acétate d'éthyle R - 50V
- **Révélateur** :
Solution de diphénylborate
d' aminoéthanol R à 10 g/L
dans le méthanol R et
solution de macrogol 400 R
à 50 g/L dans le méthanol R

Résultats obtenus : Produit 5

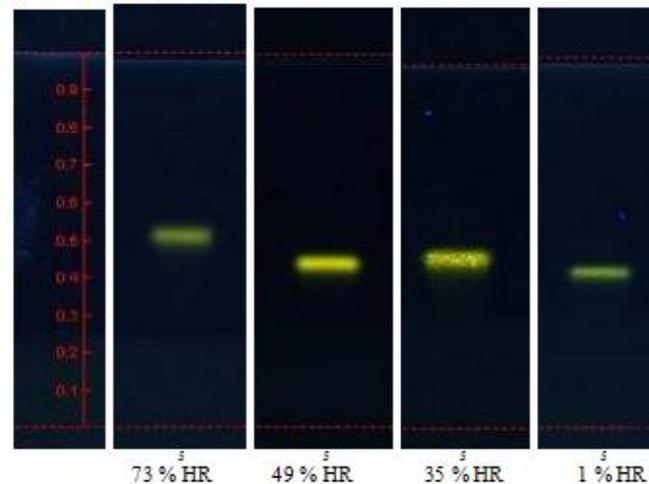
Essai PF



Témoin d'hypéroside



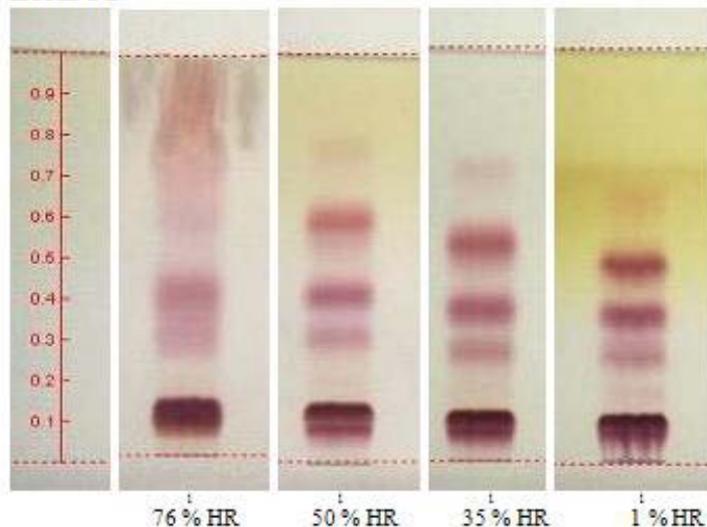
Témoin de rutine



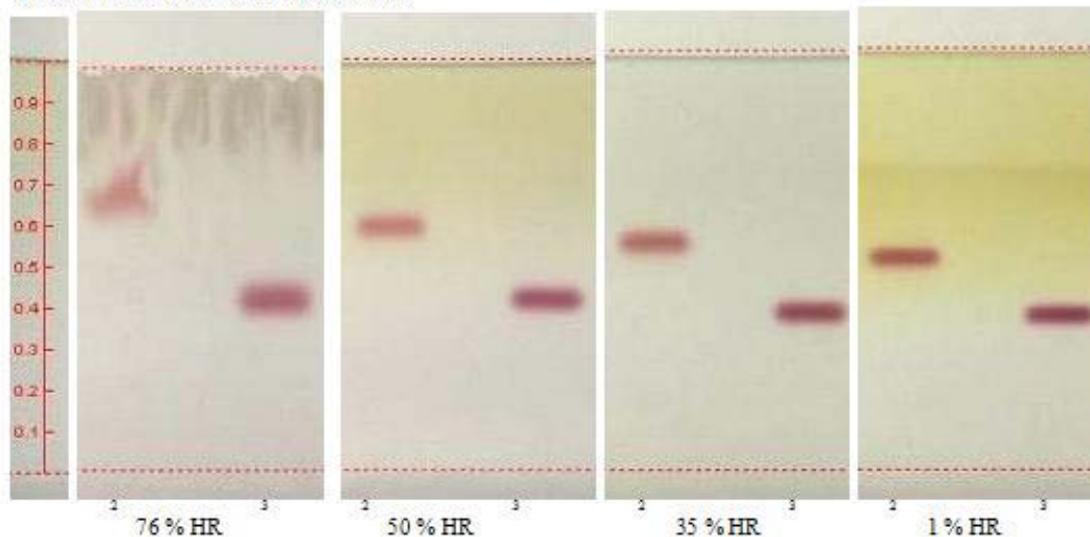
- **Famille de molécules** :
Flavonoïdes
- **Phase mobile** :
Acide formique R - 10V
Eau R - 10V
Méthyléthylcétone R 30V
Acétate d'éthyle R - 60V
- **Révéléur** :
Solution de diphénylborate
d' aminoéthanol R à 10 g/L
dans le méthanol R et
solution de macrogol 400 R
à 50 g/L dans le méthanol R

Résultats obtenus : Produit 6

Essai PF



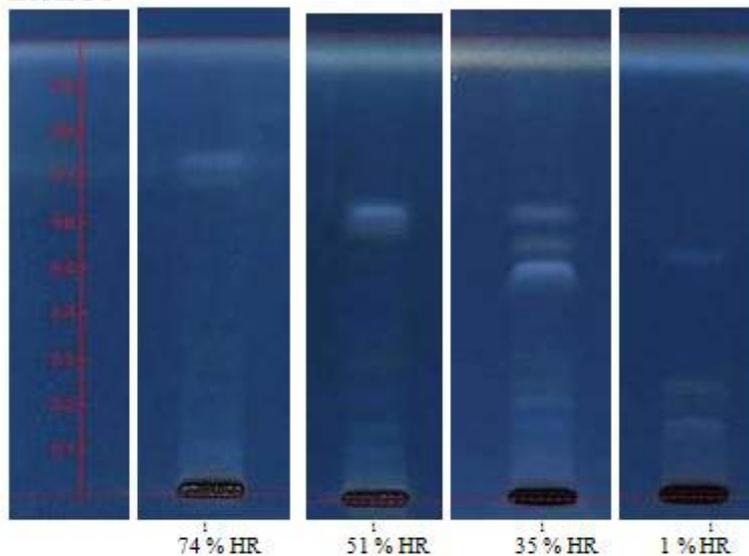
Témoins d'alliine et d'alanine



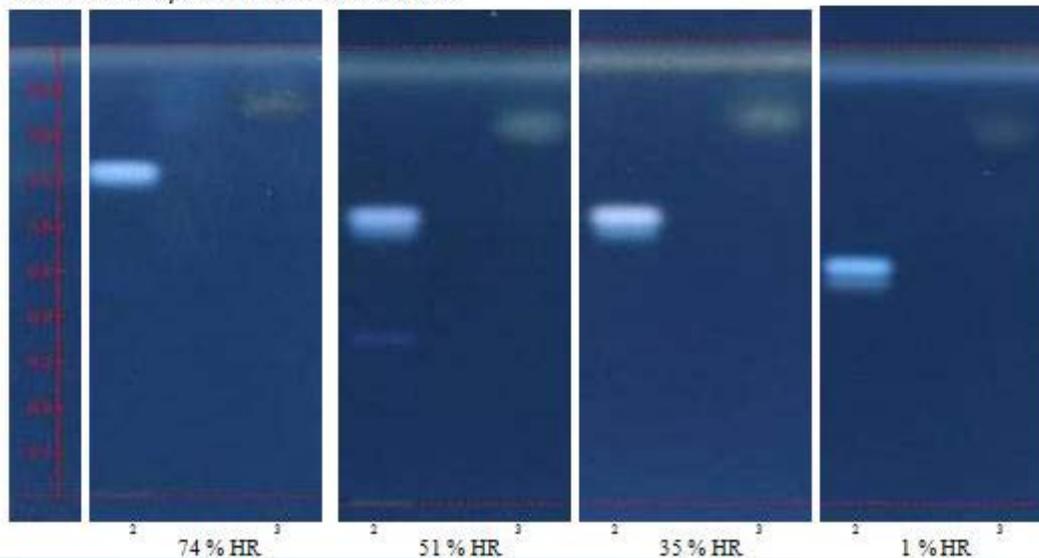
- **Famille de molécules** :
Acides aminés
Thiosulfinate
- **Phase mobile** :
Méthanol R - 2V
Eau R - 3V
Acide acétique g. R - 8V
Dichloromethane R - 15V
- **Révélateur** :
Ninhydrine R 0,5 % m/V
solubilisé dans la phase
mobile (avant migration) +
chauffage

Résultats obtenus : Produit 7

Essai PF



Témoins de β -sitostérol et de citral



- **Famille de molécules** :
Stéroïdes
- **Phase mobile** :
Acétate d'éthyle R – 40V
Toluène – 60V
- **Révéléteur** :
Solution d'acide sulfurique
R à 10 % (v/v) dans l'eau R
+ chauffage

Plan

- **Présentation**
- **Étude de l'impact**
- **Conclusions**

Conclusion analytique

- **Caractéristiques spécifiques à chaque analyse et fonction de nombreux facteurs (matrice, molécules, diluants, phases mobiles...) : Pas de généralisation possible.**
- **Les principales tendances observées, si l'analyse est sensible à l'humidité relative, sont :**
 - Plus l'humidité relative diminue, plus les R_f diminuent.
 - Tous les composés ne sont pas impactés de la même manière.
 - Aux humidités relatives extrêmes, les profils sont les plus impactés :
 - 75 % HR
 - < 10 % HR

Conclusion technique

- **Positif :**

- Facilité de mise en œuvre
- Coût de l'analyse peu impacté (temps technicien / temps équipements / consommables)
- Limitation des retests si profil non cohérent d'un pointage à l'autre
- Robustesse de l'analyse dans le temps
- Anticipation de l'impact de l'humidité relative lors du développement (avant transfert méthode sur site non équipés)

- **Négatif :**

- Possible uniquement en HPTLC (technique de + en + utilisée)
- Coût équipement (possible uniquement via le migrateur automatique)

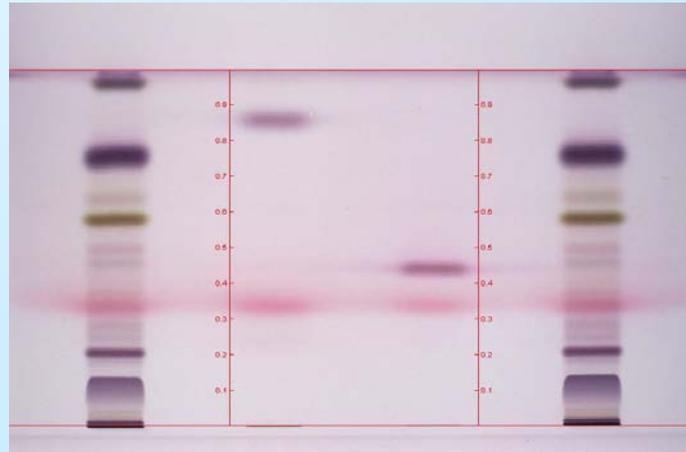


Merci pour votre attention



Présence d'une pollution à l'installation

- **CCM révélée à l'aldéhyde anisique R (Ph Eur)**
⇒ Avec migration : présence d'une bande d'impureté sur chaque piste déposée



- ⇒ Sans migration et sans vial : présence d'une bande d'impureté sur chaque piste déposée



⇒ **Pollution par corps gras suspectée**

Investigation et conclusion

- **Vérification de l'ensemble du circuit d'azote de la bouteille à la buse de dépôt du déposeur automatique**
 - ⇒ Mise en cause de la connexion métallique entre les 2 tuyaux (de diamètres différents) permettant l'arrivée de l'azote dans le déposeur automatique
 - La pièce a été usinée dans un bain d'huile



- **Test de dégraissages successifs de cette connexion métallique**
 - ⇒ Sans résultats
- **Remplacement de la connexion métallique initiale par des tubulures en cuivre spécifiques à la chromatographie en phase gazeuse**
 - ⇒ Plus de pollution après 9 mois d'investigation pour résoudre définitivement le problème.