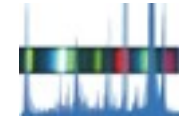


Intérêt de l'HPTLC comme aide à l'amélioration des procédés de synthèse, méthode complémentaire, alternative et orthogonale

Louise Vicard Club CCM (ex-Sanofi, Neuville)

Introduction



- La plupart du temps, dans l'industrie pharmaceutique, c'est la technique HPLC qui est majoritairement utilisée, principalement pour sa précision, sa fiabilité et sa reproductibilité. L'HPTLC est plutôt utilisée pour l'analyse des plantes médicinales, cependant, dans quelques cas, l'HPLC a plus d'inconvénients que l'HPTLC (grande consommation de solvants, temps d'équilibrage long, effets de matrice, nécessité d'absorption dans l'UV, fiabilité de l'appareillage en terme de pannes).
- A l'aide de quelques exemples nous allons voir les avantages de l'utilisation de l'HPTLC dans l'industrie pharmaceutique.

Exemple 1 : Réaction d'epoxydation



■ Objectif analytique :

- Déterminer la fin d'une réaction d'epoxydation directement dans le mélange réactionnel (en suspension CH_2Cl_2) alors que les composants n'absorbent pas dans l'UV et que la matrice est complexe (présence de substances minérales et organiques)

■ Action attendue :

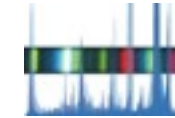
- Poursuivre la réaction si les spécifications ne sont pas obtenues

■ Conditions analytiques retenues :

- Plaques : HPTLC silica gel 60 F254 (Merck) 20x10 cm
- Dépôts : en spray par bandes de 6 mm
- Solvant de dissolution : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1
- Phase mobile : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 97/3
- Développement : cuve ADC, sur 50 mm avec pré-conditionnement de 5 mn
- Révélation par pulvérisation : réactif phosphomolybdique, chauffage ~5 mn à 130°C

➔ (25g $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]\cdot x\text{H}_2\text{O}$, 500mL CH_3COOH , 25 mL H_2SO_4)

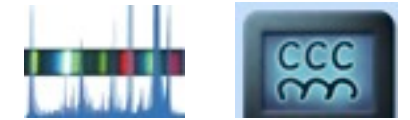
Exemple 1 : Appareillage



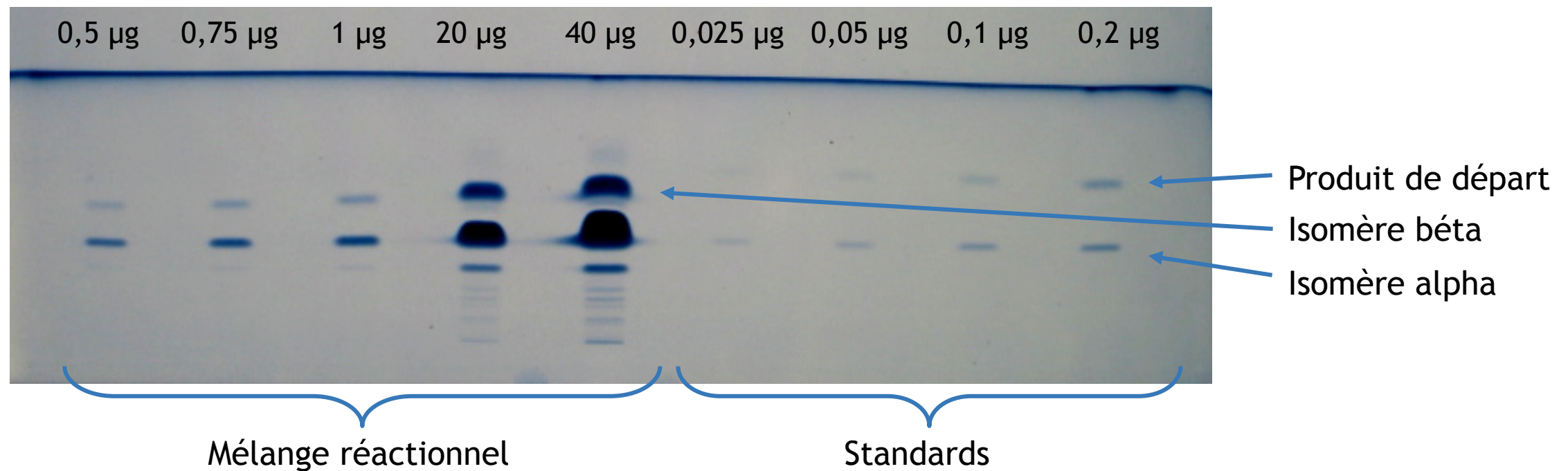
- Temps d'analyse total : 35 mn
 - Préparation des solutions : 7 mn
 - Dépôt: 8 mn
 - Pré-conditionnement : 5 mn
 - Migration : 10 mn
 - Révélation : ~5 mn

- Appareillage
 - Camag ATS 3
 - Camag ADC
 - Desaga ChromaJet DS20
 - Camag TLC Plate Heater III

Exemple 1 : Résultats



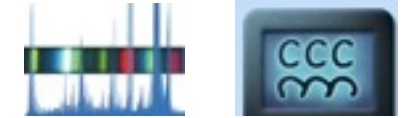
- Plaque HPTLC après révélation, sous lumière blanche :



- Résultats :

- Produit de départ : < 0,5 %
- Isomère bêta: entre 5 et 10 % (indicatif)

Exemple 2 : Fin d'extraction



■ Objectif analytique :

Vérifier l'efficacité de la purification par extraction liquide-liquide du milieu réactionnel

■ Action attendue :

- Ajouter une étape d'extraction si les spécifications ne sont pas obtenues

■ Conditions analytiques retenues :

- Plaques : HPTLC silica gel 60 F254 (Merck) 10x10 cm

- Dépôts : en spray par bandes de 6 mm

- Solvant de dissolution : MeOH + NH₄OH

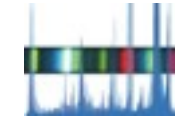
- Phase mobile : CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH : 47/6/1

- Développement : cuve TTC, sur 70 mm

- Révélation par pulvérisation : réactif Nihydrine, chauffage ~2 mn à 130° C

➔ (1g Nihydrin, 50mL EtOH, 10 mL CH₃COOH)

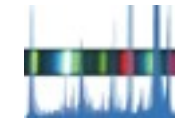
Exemple 2 : Appareillage



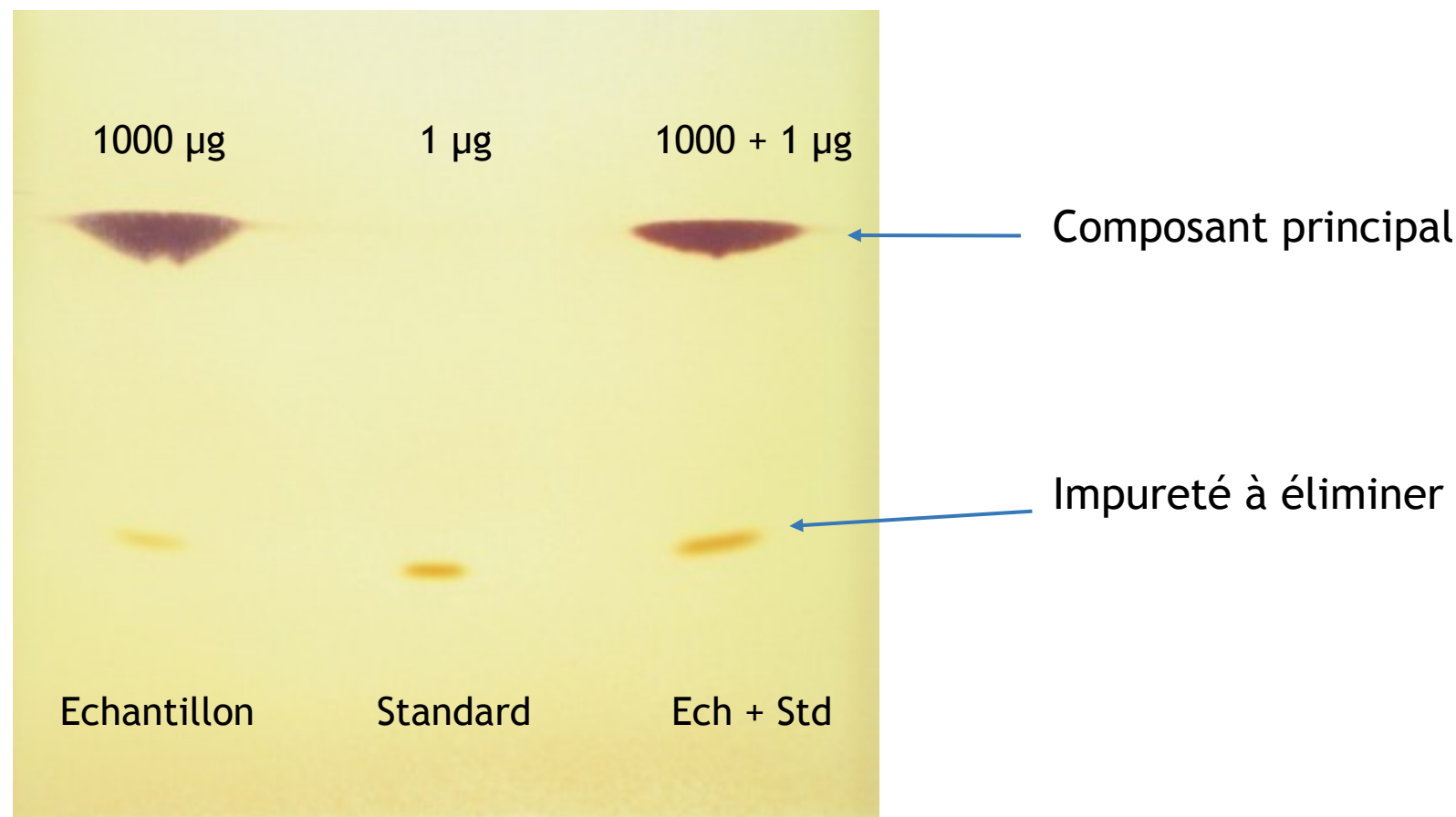
- Temps d'analyse total : 35 mn
 - Préparation des solutions : 5 mn
 - Dépôt : 5 mn
 - Migration : 20 mn
 - Révélation : ~5 mn

- Appareillage
 - Camag ATS 4
 - Camag TTc et SmartALERT
 - Pulvérisateur manuel
 - Camag TLC Plate Heater III

Exemple 2 : Résultats



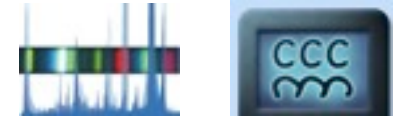
- Plaque HPTLC après révélation, sous lumière blanche :



- Résultats :

- Impureté : < 0,1 %

Exemple 3 : Réaction de réduction



■ Objectif analytique :

- Mettre en place une méthode d'analyse simple, rapide et efficace pour être appliquée par des opérateurs de fabrication en cours de procédé. Pour cela, comparer 2 méthodes analytiques disponibles (HPLC et HPTLC)
- Vérifier que la réaction de réduction est bien terminée après 3H de palier

■ Actions attendues :

- Choisir la meilleure méthode pour application en routine
- Poursuivre la réaction si les spécifications ne sont pas obtenues

Exemple 3 : Méthode HPLC

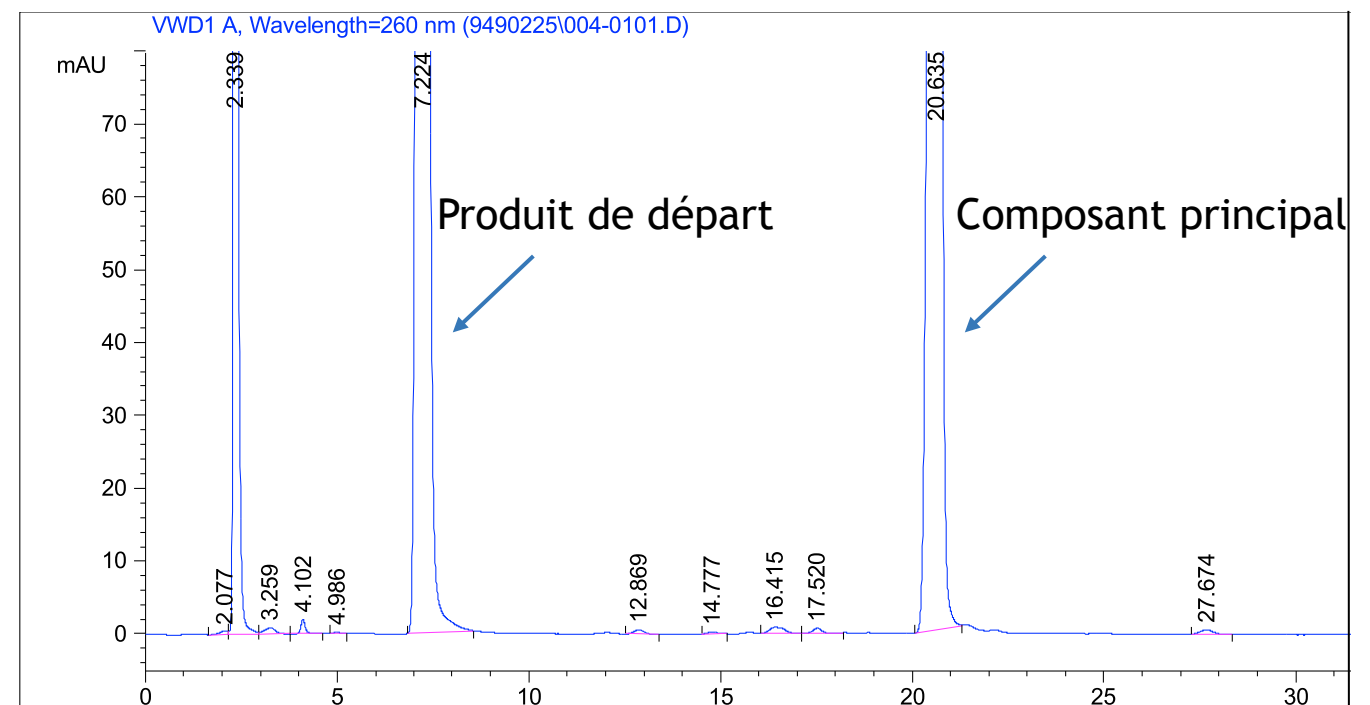


■ Conditions analytiques :

- Colonne : Inertsil C4, 5 μ m, 4,6x150 mm
- Phase mobile A : KH_2PO_4 (0,02 M)/ACN : 55/45
Phase mobile B : KH_2PO_4 (0,02 M)/ACN : 45/55
- Gradient d'élution :

| | | |
|----------|-----------|-----------|
| temps 0 | PMA 100 % | PMB 0 % |
| temps 10 | PMA 100 % | PMB 0 % |
| temps 16 | PMA 0 % | PMB 100 % |
| temps 40 | PMA 0 % | PMB 100 % |
- Débit : 1 mL/mn
- Détection : UV 260 nm
- Température : 22 °C

■ Temps d'analyse total : 35 mn



Exemple 3 : Méthode HPTLC



■ Conditions analytiques :

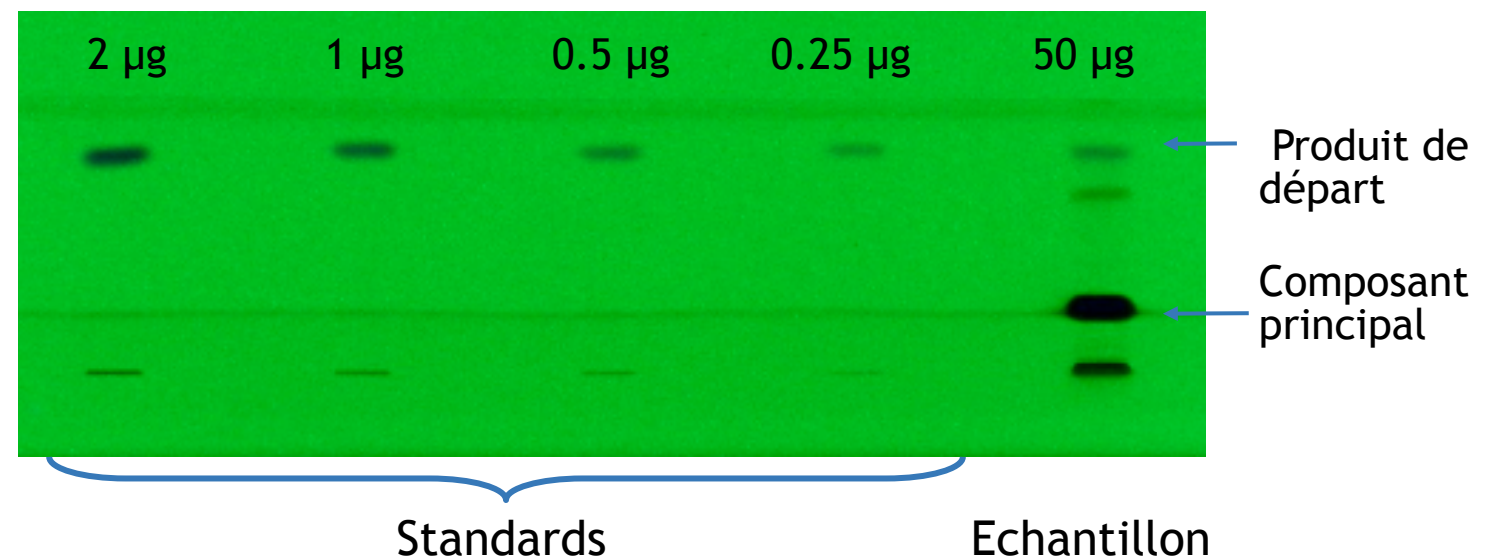
- Plaques : HPTLC silica gel 60 F254 (Merck) 20x10 cm
- Dépôts : en spray par bandes de 6 mm
- Phase mobile : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 97/3
- Développement : cuve ADC, sur 40 mm
- Examen : UV 254 nm

■ Temps d'analyse total : 35 mn

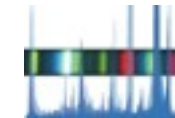
- Préparation des solutions : 5 mn
- Dépôt : 5 mn
- Migration : 10 mn

■ Résultats :

- Impureté : $\leq 1\%$

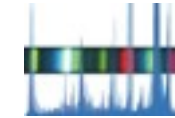


Exemple 3 : Conclusion



- Pour une analyse en routine effectuée par des opérateurs de fabrication postés en 3 x 8, la méthode HPTLC a été choisie pour sa simplicité de mise en oeuvre :
 - Pas de préparation d'appareillage
 - Pas de tests ni d'injection de standard préliminaires
 - Faible consommation de solvant
 - Faible risque de panne
 - Précision satisfaisante
 - Temps d'analyse équivalent

Exemple 4 : Fin de réaction d'hydrolyse



■ Objectif analytique :

- Vérifier que la réaction d'hydrolyse est complète (moins de 1% du produit de départ restant)
- La méthode analytique doit être aussi simple que possible afin de minimiser l'investissement en matériel, le temps d'analyse et la mise en place en atelier de production
- Vérifier que la réaction de réduction est bien terminée après 3H de palier

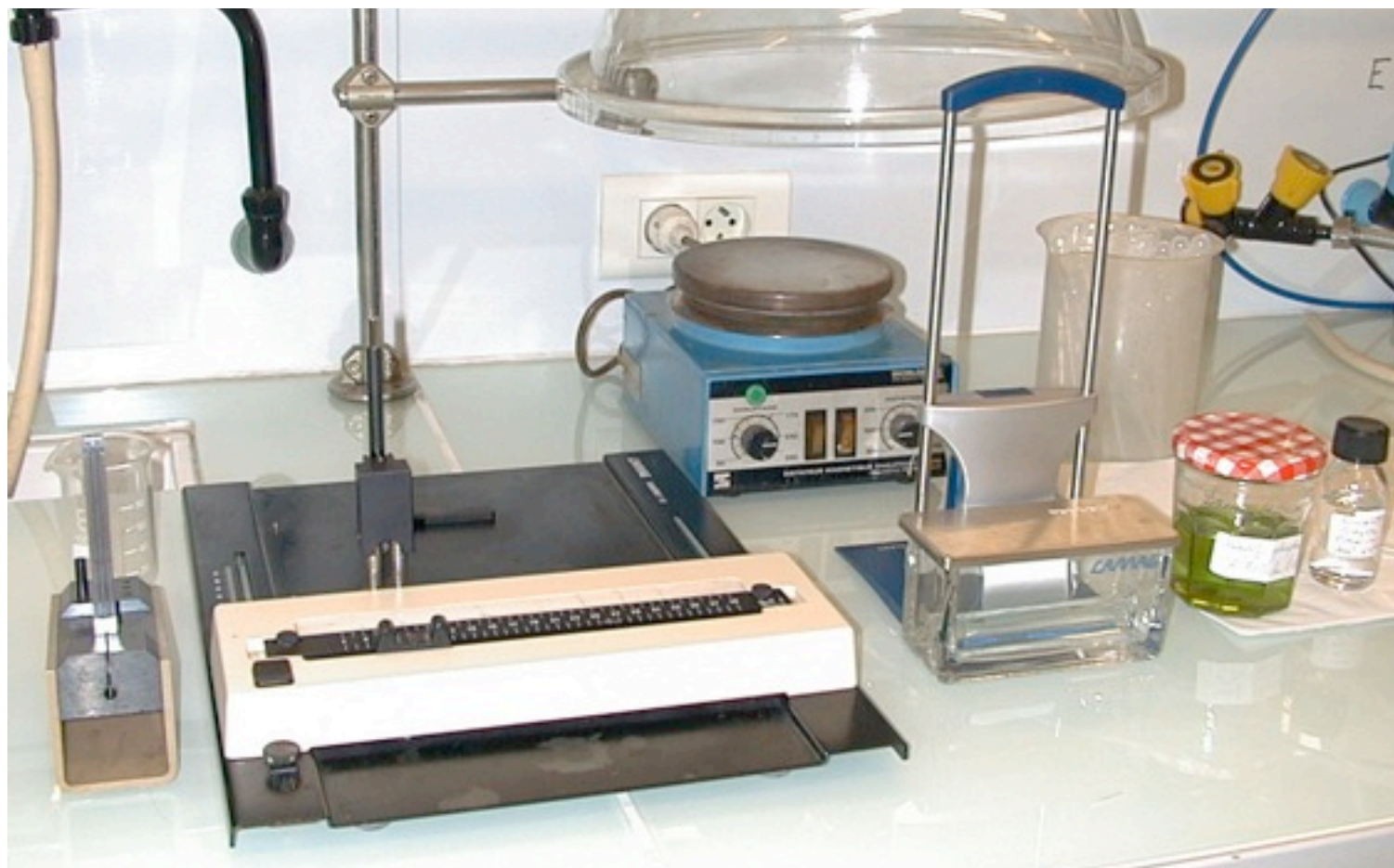
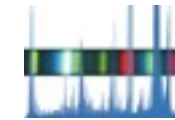
■ Actions attendues :

- Poursuivre la réaction si les spécifications ne sont pas obtenues

■ Conditions analytiques :

- Plaques : HPTLC silica gel 60 F254 (Merck) 5x5 cm
- Dépôts : par contact d'un capillaire
- Phase mobile : CH_2Cl_2 /Ether Isopropylique/AcOEt : 42/2/6
- Développement : cuve TTC 10x5, sur 35 mm
- Révélation par immersion : réactif phosphomolybdique dilué à 50% dans le MeOH, chauffage ~5 mn à 130°C

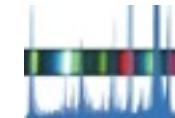
Exemple 4 : Appareillage



- Temps d'analyse total : 20 mn
 - Préparation des solutions : 7 mn
 - Dépôt : 1 mn
 - Migration : 7 mn
 - Révélation : ~5 mn

- Appareillage
 - Camag Nanomat
 - Camag Capillary dispenser
 - Camag TTC et SmartALERT

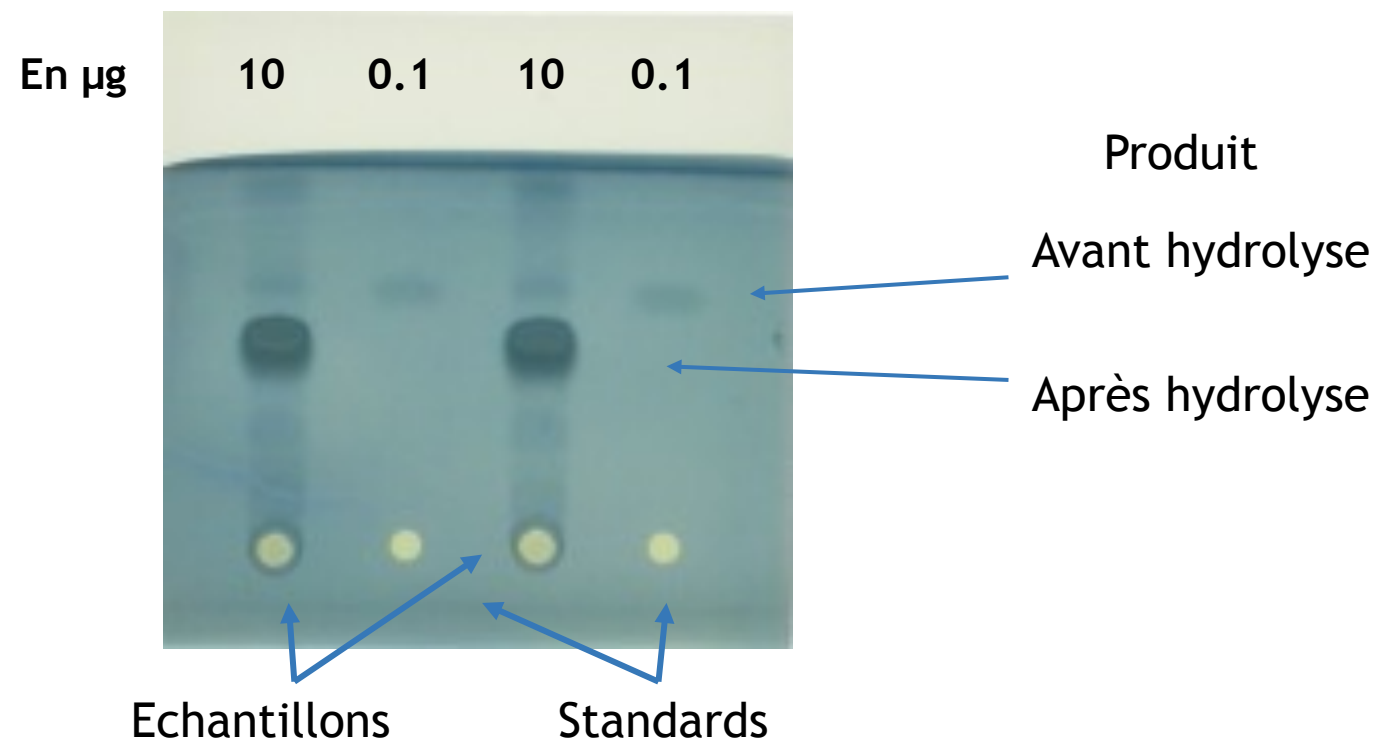
Exemple 4 : Résultats et conclusion



- Plaque HPTLC après révélation, sous lumière blanche :

- Résultats :

- Impureté : $\leq 1\%$



- La méthode HPTLC a été acceptée pour sa rapidité, elle permet de détecter rapidement une grosse anomalie réactionnelle, avec un matériel simple, peu coûteux, présentant l'avantage de ne jamais tomber en panne.

Exemple 5 : Suivi d'un procédé de fermentation



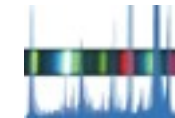
■ Objectif analytique :

- Connaître le profil des composés d'un milieu réactionnel après fermentation afin d'améliorer le rendement et la qualité du procédé d'isolement
- La méthode d'évaluation de ce profil en routine est l'HPLC alors que le contrôle qualité du produit final est l'HPTLC : il s'agit de montrer quelle méthode doit être retenue
- A cause de la faible absorbance UV de la plupart des composés de la fermentation, l'HPTLC, après révélation, a été retenue comme méthode alternative à l'HPLC.

■ Contraintes :

- Milieux complexes issus de la fermentation : nombreux composés polaires et non polaires, minéraux et organiques
- Hétérogénéité des prélèvements
- Faible absorbance UV des composés d'intérêt

Exemple 5 : Suivi d'une fermentation

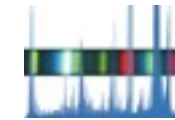


- Plusieurs essais ont montré qu'il n'était pas possible de séparer les différents composés sur une seule plaque. Sans accès à l'AMD, il a fallu réaliser 2 chromatographies pour obtenir la séparation.
- L'étude a été menée directement sur les milieux réactionnels
 - Mise au point de 2 CCM permettant de repérer toutes les composés
 - CCM 1 : pour les composés plus mobiles
 - CCM 2 : pour les composés moins mobiles
 - Mise en solution dans le CH_2Cl_2 puis filtration des substances minérales
 - Plaques : Gel de silice HPTLC F254
 - Solvants de développement :

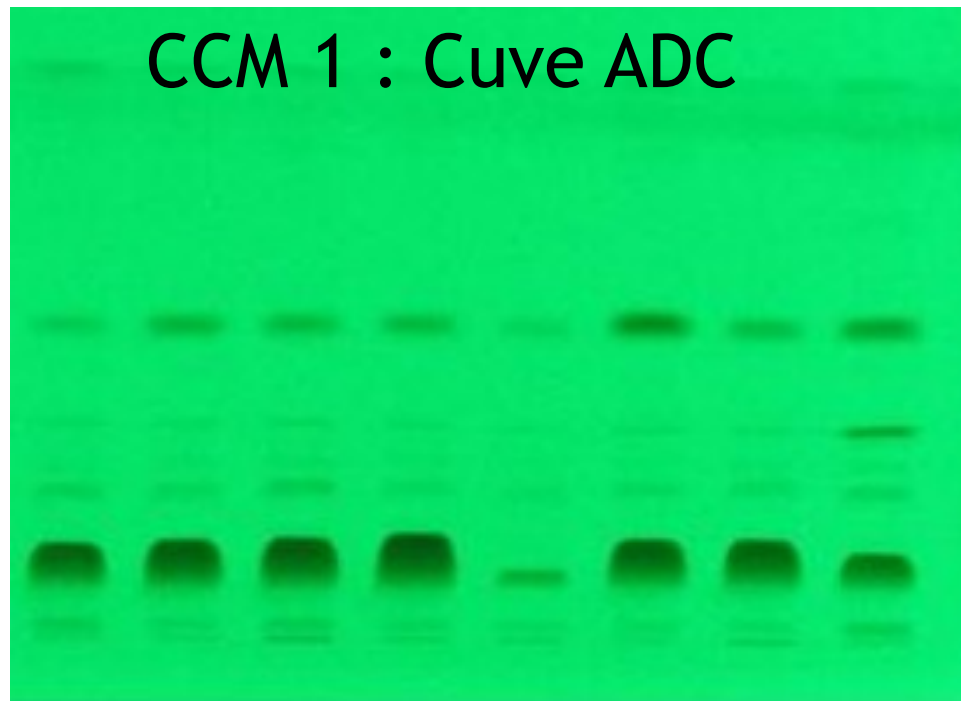
| | CCM 1 | CCM 2 |
|--------------------------|-------|-------|
| • Chloroforme | 95 V | 80 V |
| • Acétone | 5 V | 20 V |
| • Acide acétique glacial | 1 V | 2 V |
 - Développement :

| | cuve ADC | cuve saturée |
|--------------------------------------|----------|--------------|
| • A partir du bas de la plaque sur : | 60 mm | 85 mm |
 - Révélation :
 - UV 254 puis au Réactif Phosphomolybdique → chauffage à 120°C

Chromatogrammes obtenus

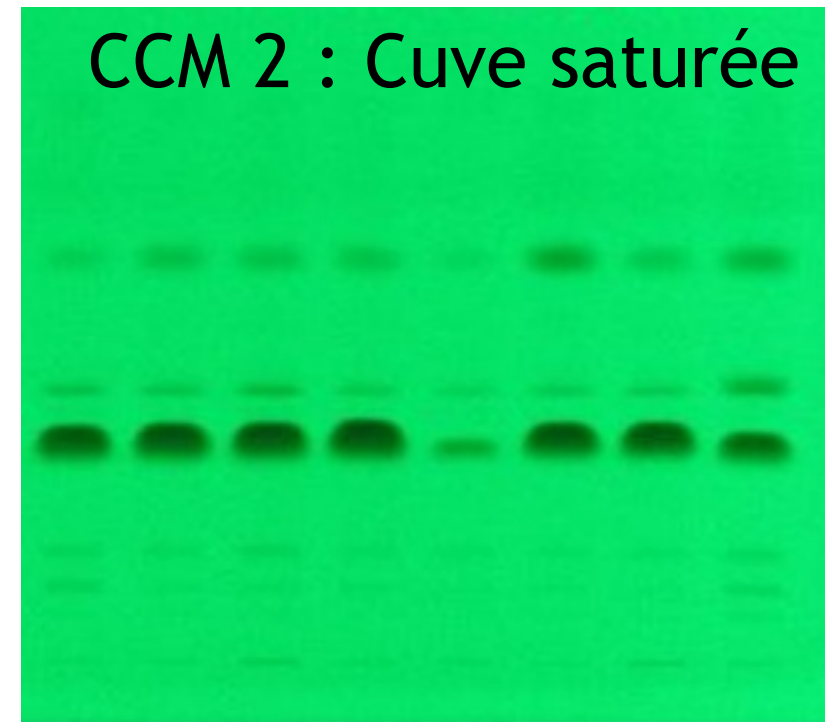


CCM 1 : Cuve ADC



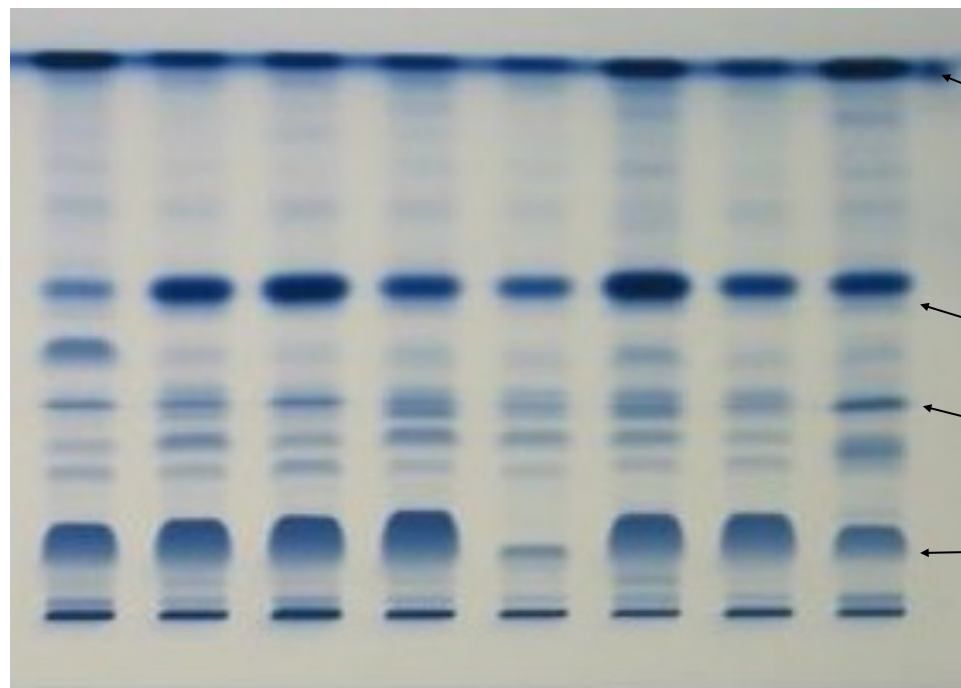
Etude comparative de 8
lots de Milieux
réactionnels

CCM 2 : Cuve saturée



Révélation UV 254

Révélation phospho



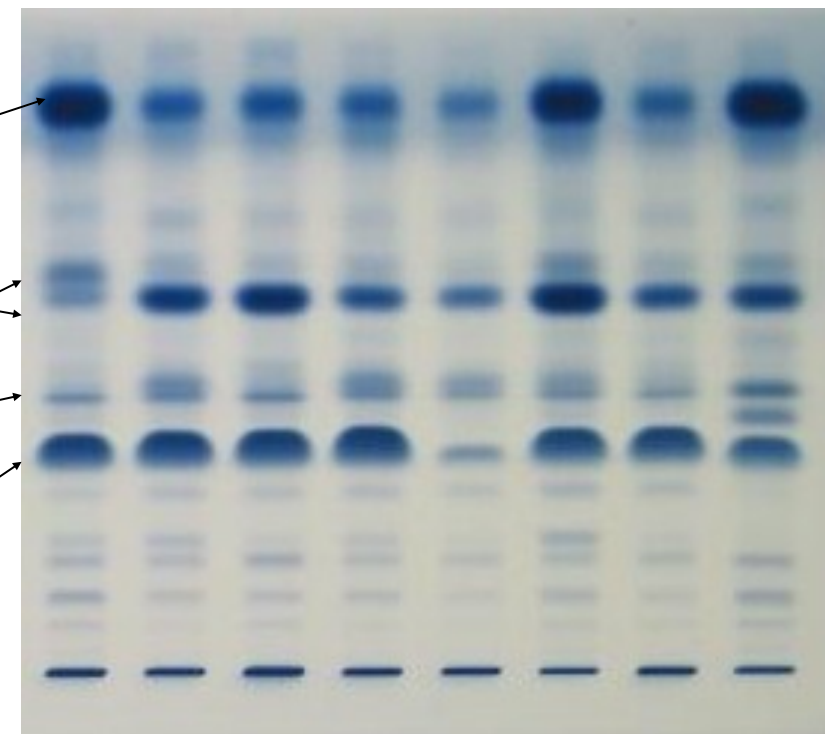
Réactif A

Réactif B

Composé A

Composé B

Produit attendu

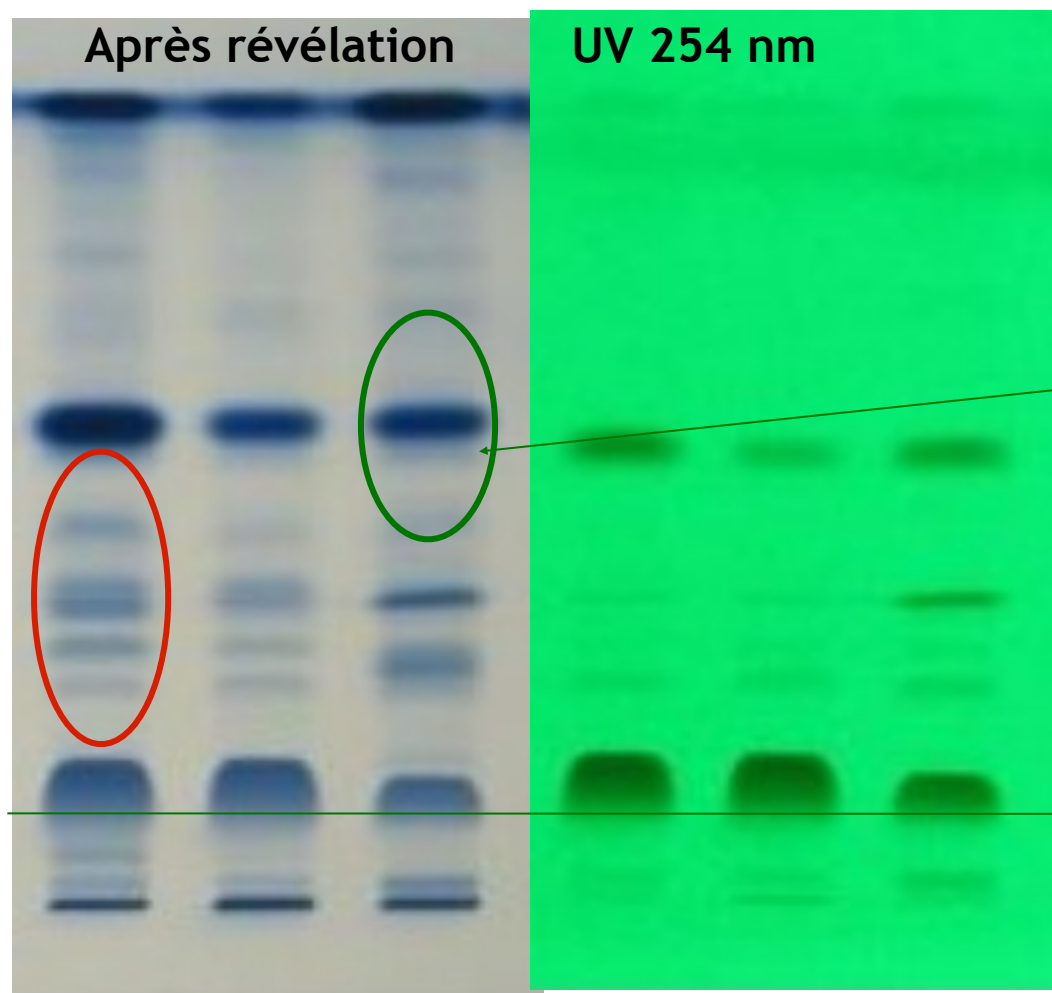


Repérage des impuretés



CCM 1 : Composés plus mobiles

CCM 2 : Composés moins mobiles

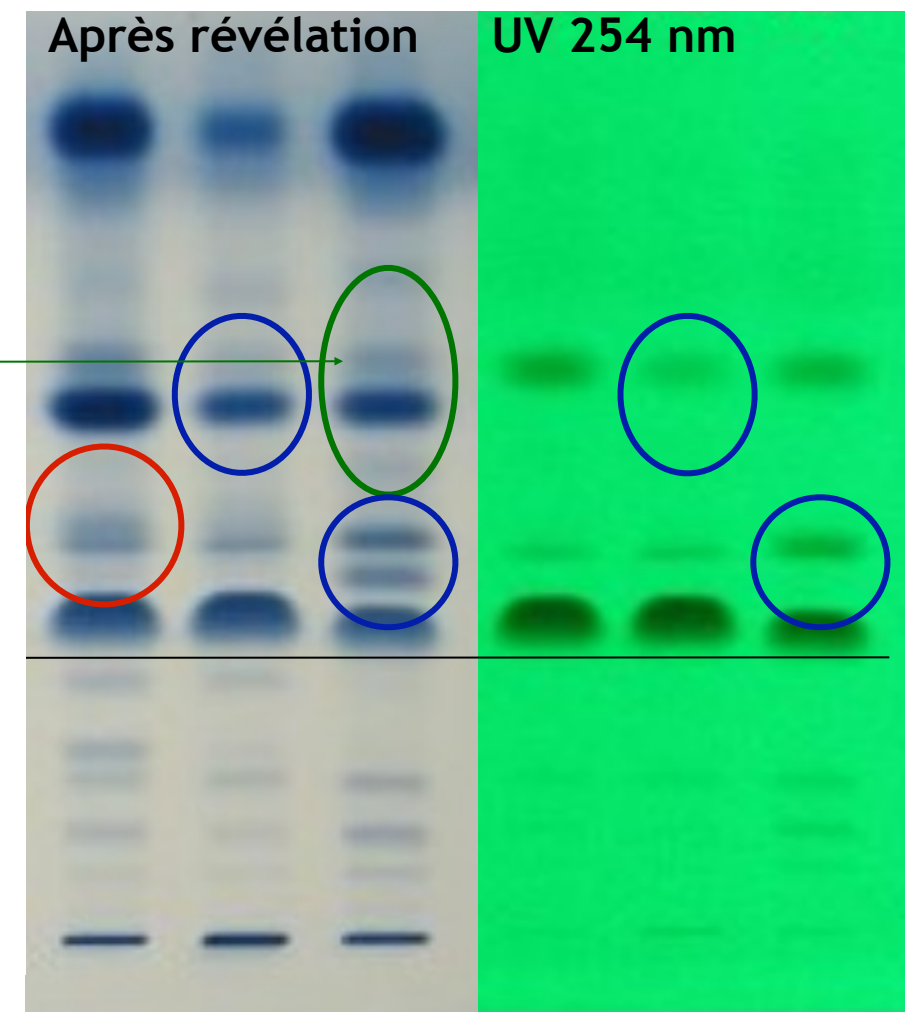


Légende

Coélution

Inversion

Non visibles
sous UV



Mise en évidence

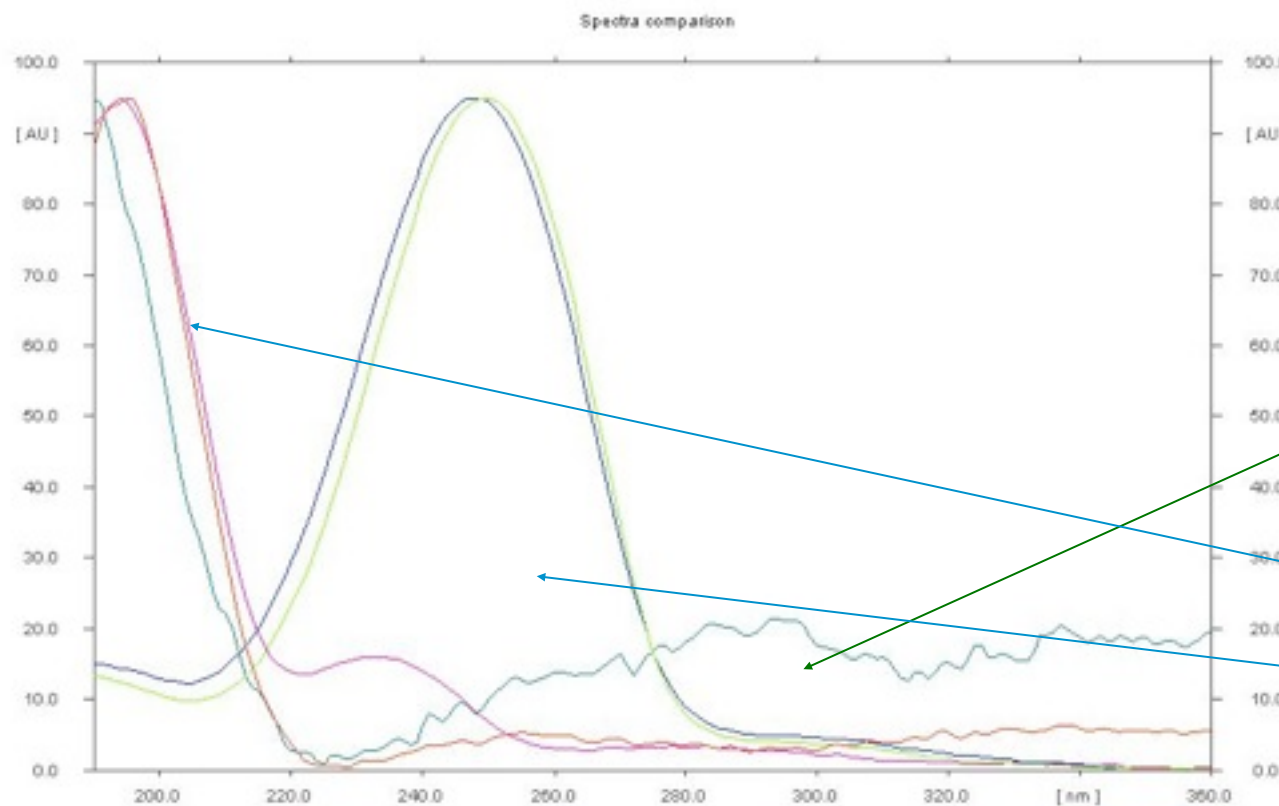
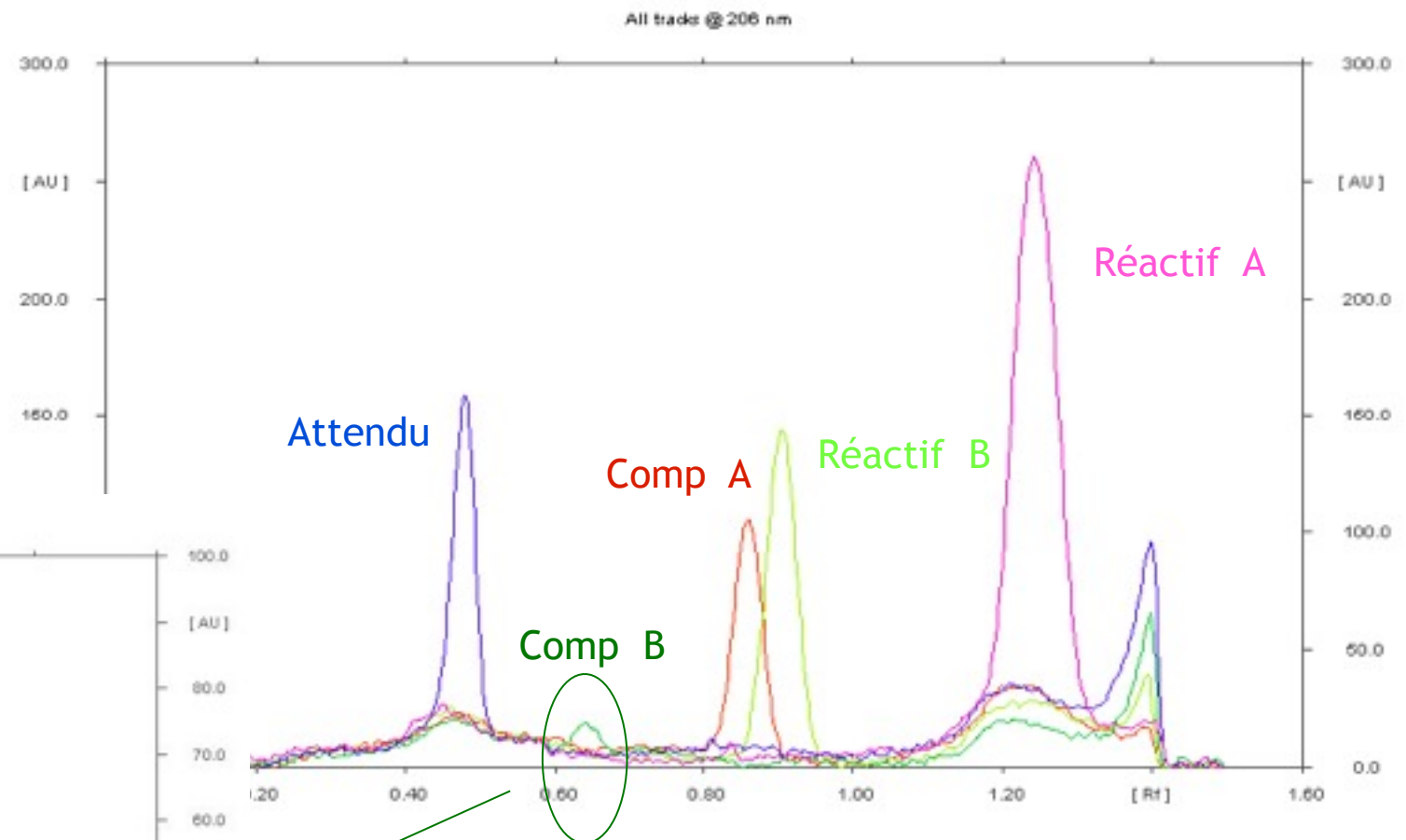
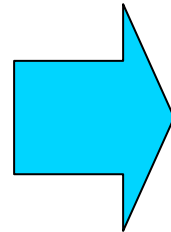
- De nombreux composés **coélus** dans la CCM 2
- **Inversion** de l'ordre d'éluion de certains composés
- Composés **non visibles** sous UV

Analyse des spectres d'absorbance UV



Dépôts de 0,5 - 1 et 2 μg des 5 principaux composés connus ou identifiés

Chromatogrammes après lecture scanner à 206 nm : les coefficients de réponse sont différents

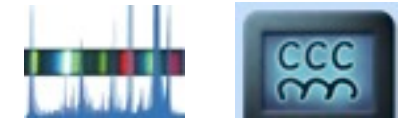


Spectres UV des composés :

- 3 sur 5 absorbent à 190 nm
- 2 sur 5 absorbent à 250 nm

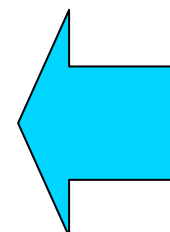
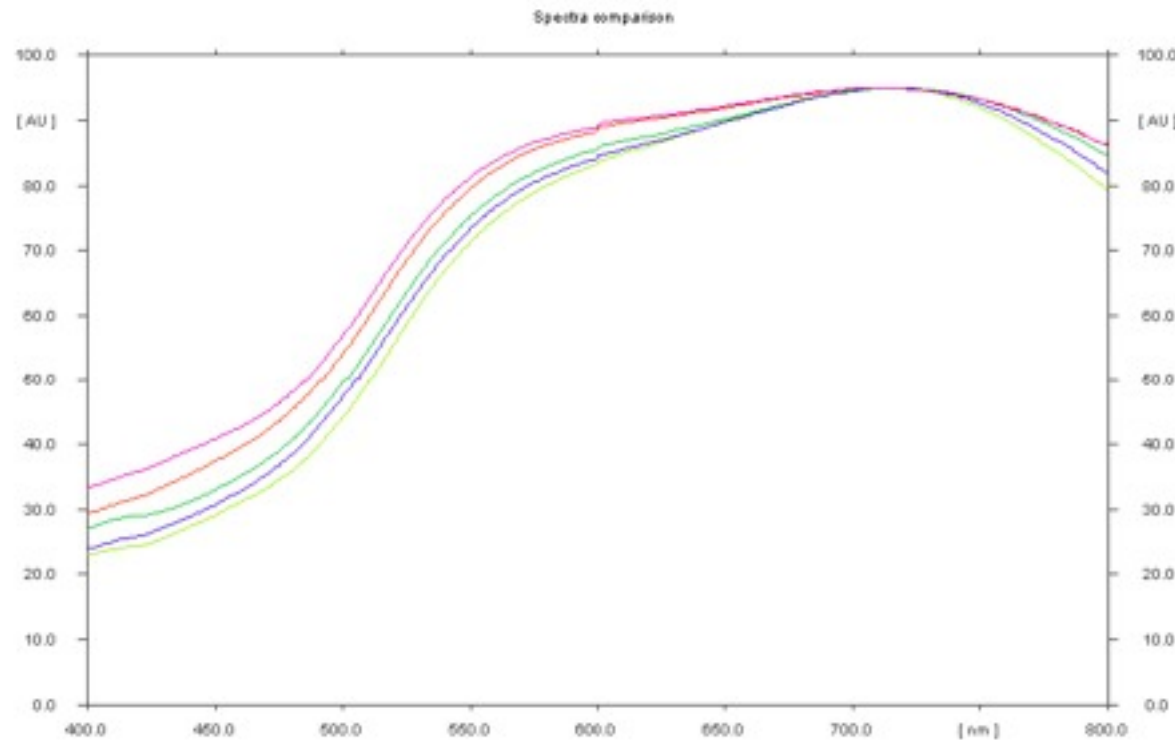
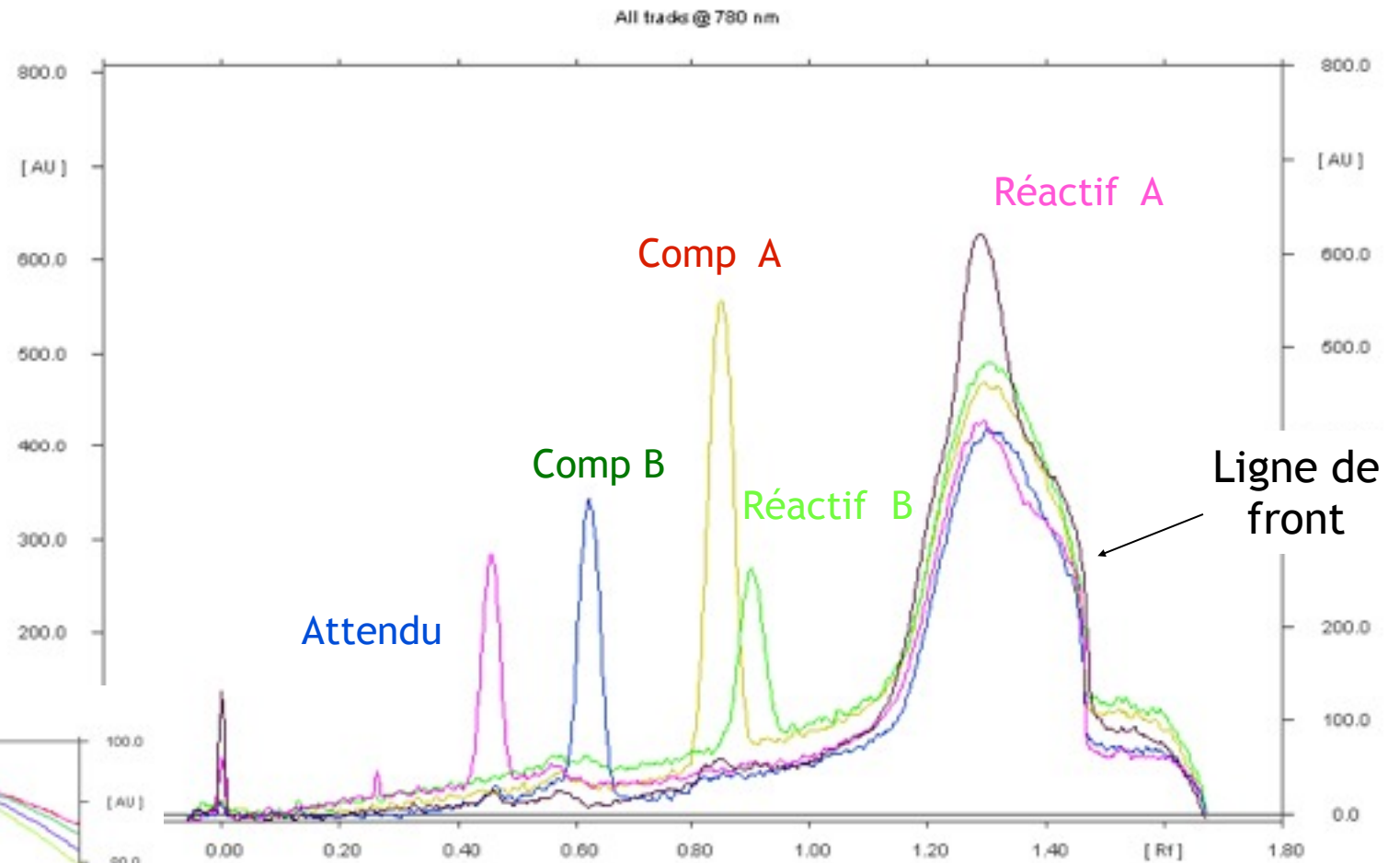
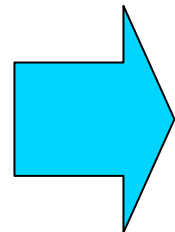
Pas de longueur d'onde commune aux 2 séries

Analyse des spectres après révélation



Révélation phosphomolybdique

Chromatogrammes
après lecture scanner à
720 nm



Spectres dans le visible :
- les absorbances sont lissées

Analyse des spectres : résultat

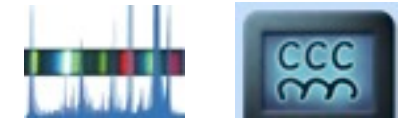


| | Dépôts | λ max | Absorbance à λ maximum | Absorbance à 241 nm | Coef de réponse |
|-----------|-----------|---------------|--------------------------------|---------------------|-----------------|
| Réactif A | 3 μ g | 190 nm | 579 AU | 13.4 | 0.15 |
| Réactif B | 3 μ g | 190 nm | 277 AU | 3.4 | 0.04 |
| Composé A | 3 μ g | 250 nm | 666 AU | 84.4 | 1 |
| Composé B | 3 μ g | 190 nm | 140 AU | 7.9 | 0.1 |
| Attendu | 3 μ g | 250 nm | 597 AU | 88.2 | 1 |

Conclusion

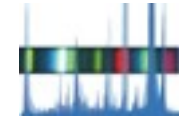
- L'absorbance spécifique de chaque composé est différente, il faut lire à 2 λ
- A 241 nm il n'est pas possible de quantifier correctement les réactifs A et B et le composé B
- La variation importante des coefficients de réponse (de 1 à 25) montre que l'HPLC n'est pas suffisamment performante pour évaluer tous les composés
- La révélation phosphomolybdique nivelle les absorbances

Exemple 5 : Conclusion



- Dans cet exemple, l'HPTLC apporte un complément d'information au dosage HPLC par
 - L'amélioration de la détection des composés absorbant mal en UV
 - La détection des composés apolaires trop retenus en HPLC en phase inverse
 - Évite la préparation de l'échantillon par extraction : pas de pollution de la plaque
- En conséquence, la méthode HPTLC a été retenue et le laboratoire s'est équipé en instrumentation CCM

Exemple 6 : Dosage d'un antibiotique dans les eaux usées après traitement biologique



■ Objectif analytique :

- Dosage d'un nouvel antibiotique, fabriqué sur le site dans les effluents rejetés en sortie de traitement biologique et dans les eaux propres rejetées (Eaux non en contact direct avec la fabrication)

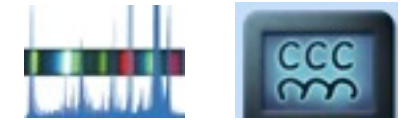
■ Contraintes :

- Eaux chargées en sels et résidus bactériens : effet de matrice
- Quantités recherchées de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ (ppm)
- Contrôles à effectuer trimestriellement sur une semaine complète de rejets soit 12 échantillons par séries

■ Méthodes analytiques envisagées :

- Enrichissement par extraction d'une eau enrichie à 50 mg/l d'antibiotique par différents solvants ou sur cartouche filtrante : extraction insuffisante
- Chromatographie : compte tenu du nombre et de la nature de l'échantillon, nous avons opté pour la CCM

Exemple 6 : Méthode retenue

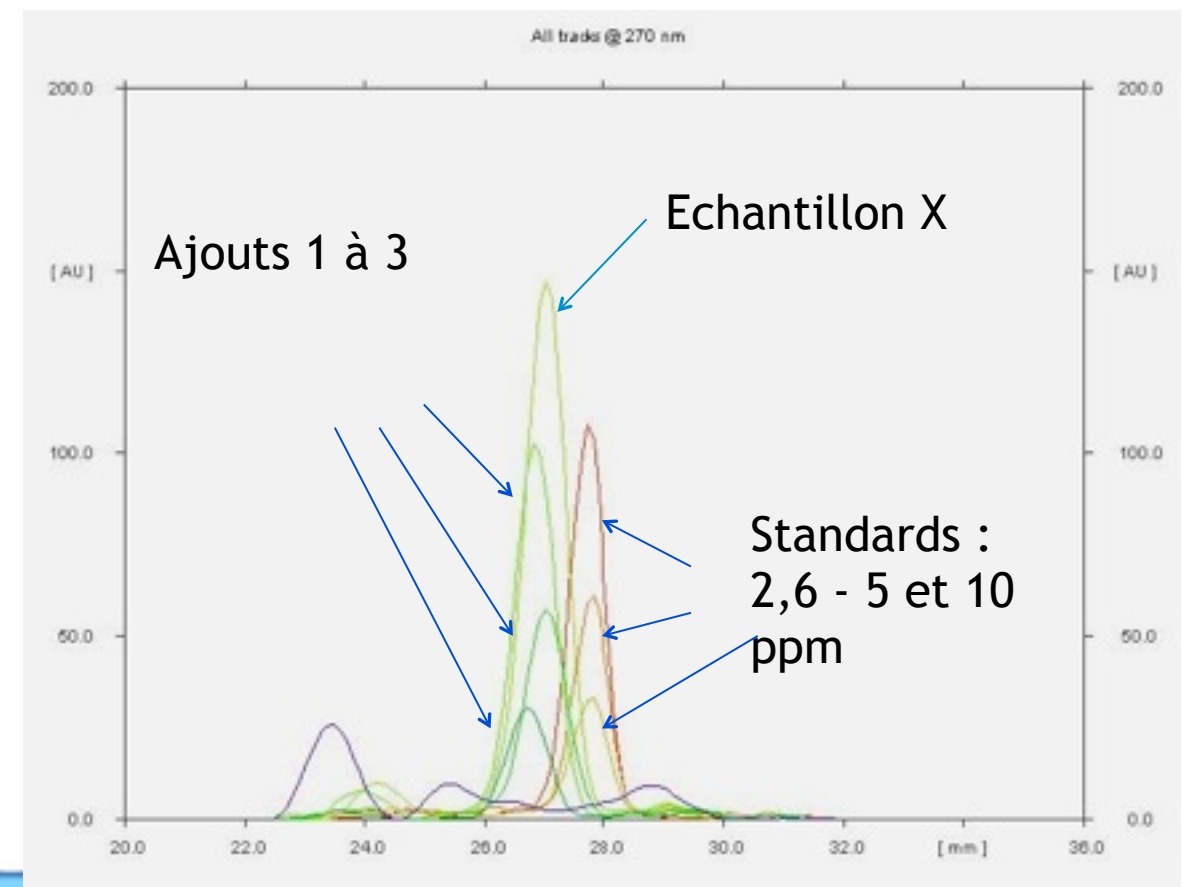


■ Conditions analytiques HPTLC :

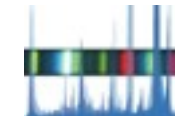
- Plaques : HPTLC silica gel 60 F254 (Merck) 20x10 cm
- Dépôts : en spray par bandes de 5 mm
 - Standard : 1300 - 2500 et 5000 nl d'une solution à 4 g/L d'antibiotique
 - Echantillon : 20 μ L de l'effluent tel quel
(La gamme d'étalonnage correspond à des concentrations de 2,6 - 5 et 10 mg/L)
- Phase mobile : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$: 90/10/1
- Développement : cuve ADC, sur 50 mm
- Lecture : UV 270 nm

■ Observation d'un effet de matrice :

- Comparaison de dépôts réalisés à partir de solutions d'antibiotique
 - Dilués dans l'eau pure = Standard 1 à 3
 - Dilués dans une matrice (un effluent n'en contenant pas) = Ajouts 1 à 3
 - Echantillon X = 20 μ L tel quel
- On note un déplacement du Rf



Vérification de la validité de la méthode : Etude de l'effet de matrice sur la quantification

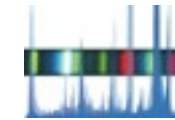


Résultats de la calibration précédente

| Dépôts | Quantité déposée dans les Standards | Quantité trouvée dans l'ajout : en surfaces | Quantité trouvée dans l'ajout : en hauteur |
|---------|-------------------------------------|---|--|
| 1300 nL | 56 ng | 46 ng | 45 ng |
| 2500 nL | 107 ng | 116 ng | 99 ng |
| 5000 nL | 214 ng | 226 ng | 192 ng |

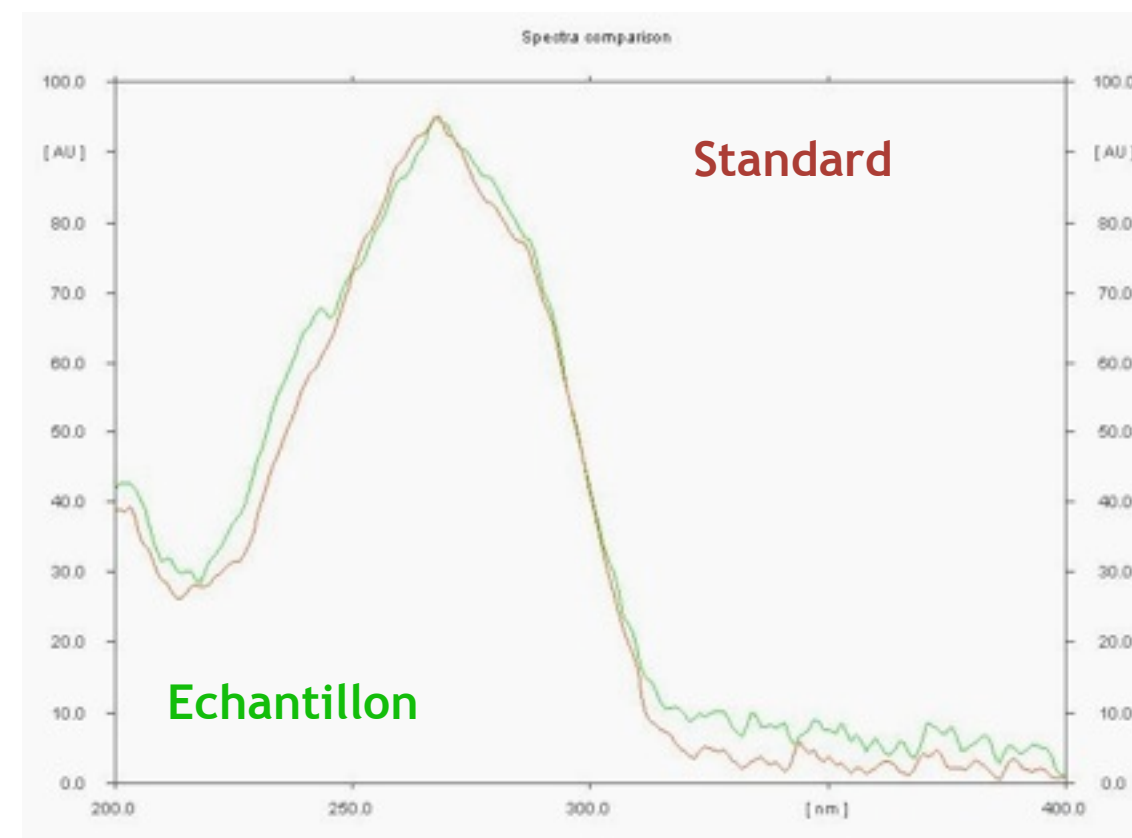
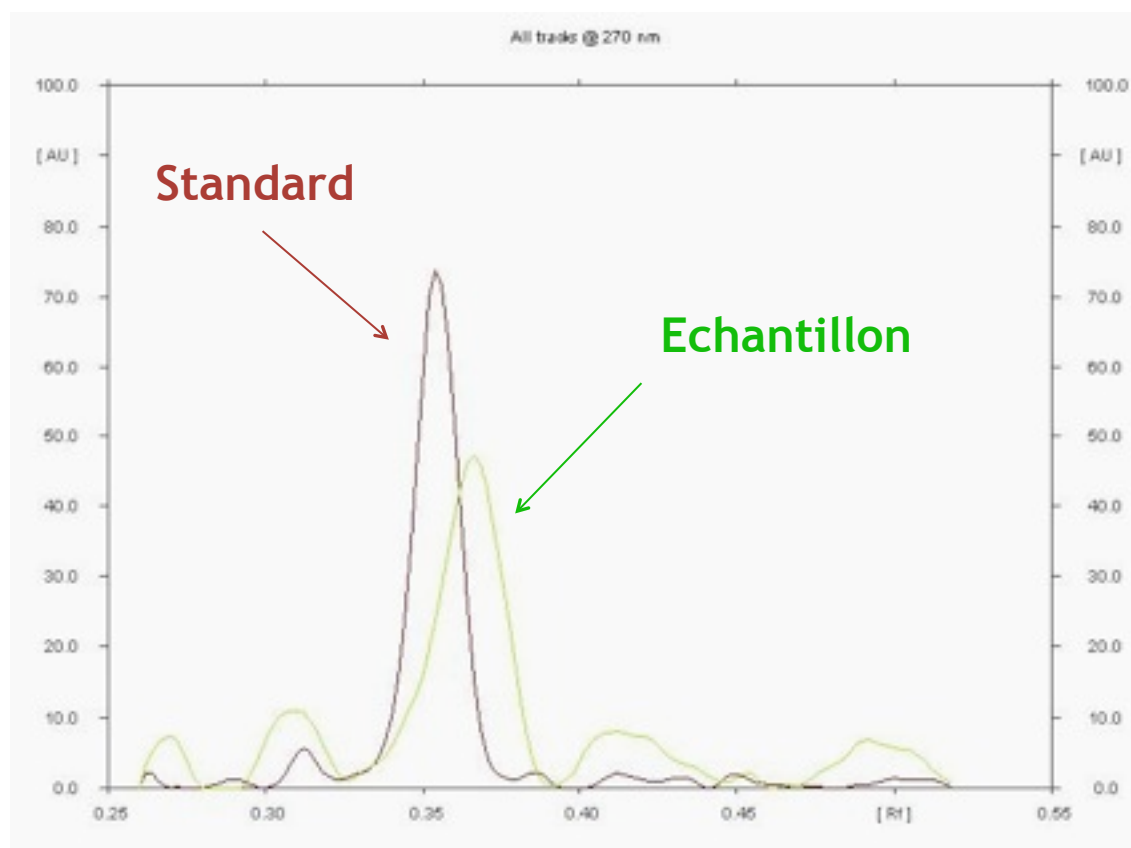
- Le taux de recouvrement est compris entre 80% et 120% : l'effet de matrice est acceptable

Vérification de la validité de la méthode : Vérification de l'identité du composé



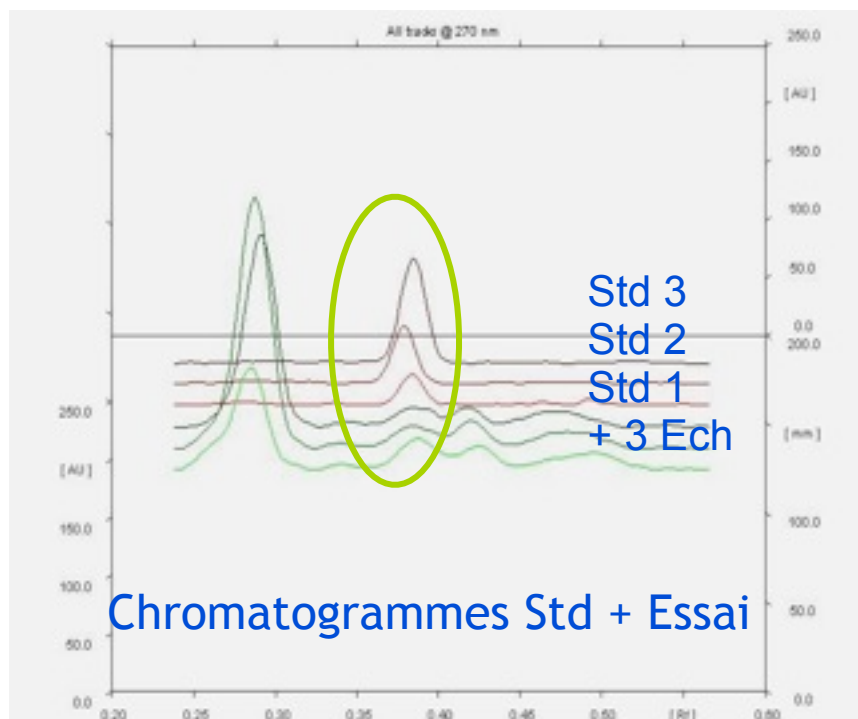
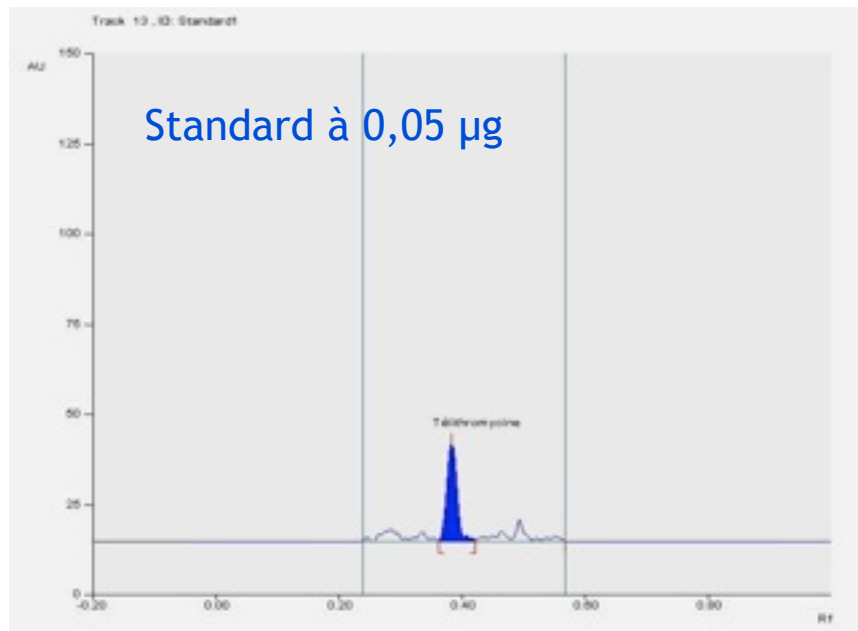
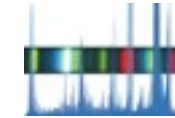
■ Vérification des spectres UV de la substance

- Compte tenu de la complexité de la matrice et afin de s'assurer que le repérage de l'antibiotique est juste



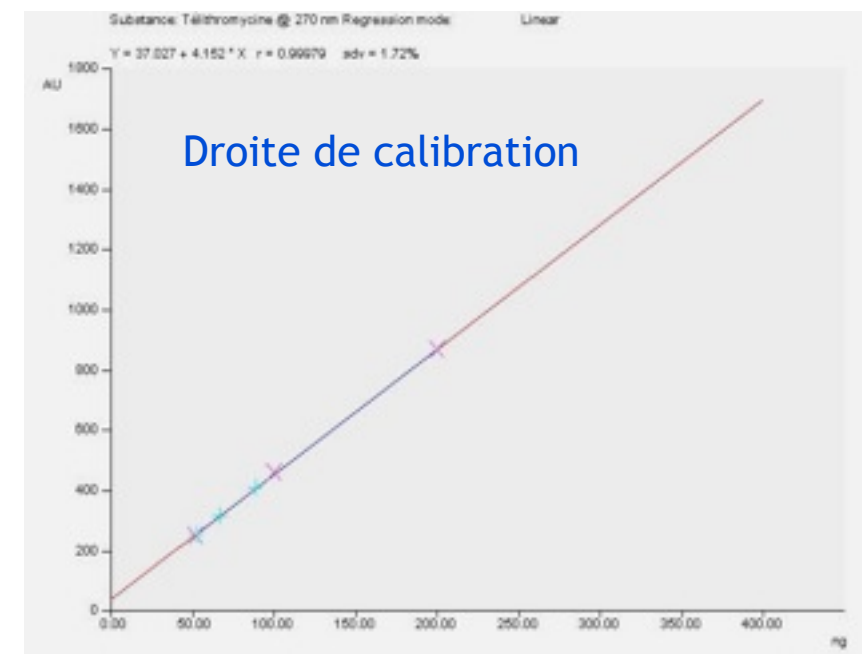
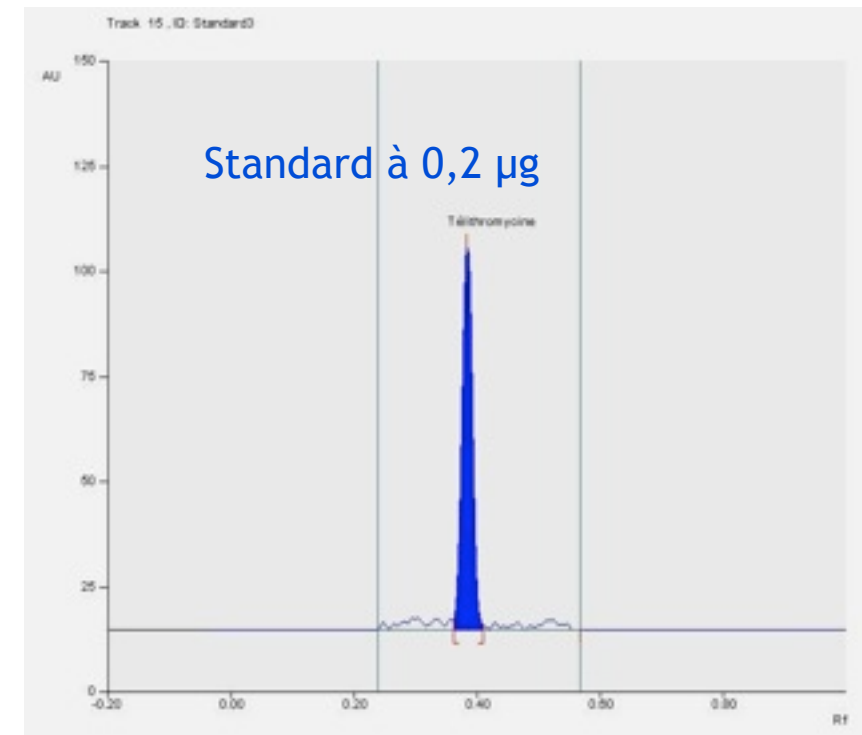
- Résultat : Les spectres UV du standard et de l'échantillon se superposent, confirmant la présence d'antibiotique

Exemple 6 : Résultat de la calibration

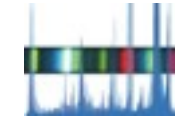


On note :

- Linéarité de la calibration dans le domaine étudié
- Capacité à détecter aisément au dessus de la limite interne de 2,5 ppm
- Limite de quantification interne retenue : 0,05 µg

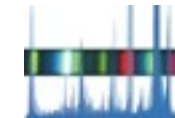


Exemple 6 : Conclusion



- La technique HPTLC est parfaitement adaptée à ce type de contrôle
 - **Bonne sensibilité**
 - On peut déceler jusqu'à 1 mg/L d'antibiotique dans les effluents
 - **Rapidité**
 - Pas de préparation de l'échantillon
 - L'analyse complète s'effectue en \approx 3 heures
 - **Faible impact de la matrice**
 - Pas de pollution du système chromatographique
 - Taux de recouvrement conforme
 - Identification du composé validée par le tracé du spectre UV
 - **Faible coût**
 - L'analyse des 12 échantillons s'effectue sur 1 seule plaque
 - Avec 10 ml d'éluant

CONCLUSION



Dans les exemples présentés

- La méthode HPTLC a été choisie pour :
 - Sa simplicité de mise en oeuvre aussi bien en laboratoire d'analyse qu'en atelier de production par des opérateurs de fabrication
 - Son faible risque de pannes et son faible coût
 - L'absence de préparation préliminaire d'appareillage : pas de conditionnement d'appareillage, de rinçage...
 - La possibilité de révélations multiples
 - L'absence de contamination de colonnes ou d'effets de matrice
- Les méthodes analytiques doivent être adaptées à l'objectif analytique :
 - Quand la précision est exigée : une calibration complète est nécessaire
 - Quand un temps d'analyse court est demandé : on réduit la dimension des plaques et la distance de migration
- L'HPTLC est toujours possible avec ou sans instrumentation sophistiquée