



Club CCM – Forum
Labo & Biotech

01 avril 2015

Dosage d'un traceur dans un actif végétal par HPTLC

Stage Licence Pro. Maxime BROS



Pierre Fabre

Lasbennes Laurent – Institut de Recherche Pierre Fabre



Présentation de l'étude

Transposition et développement de la méthode

Transposition de la méthode CCM

Optimisation des paramètres analytiques

Quantification de l'acide ursolique

Quantification après révélation

Quantification avant révélation

Validation de la méthode

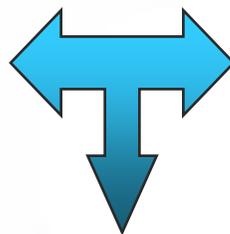
Analyse par spectrométrie de masse

Origine des principes actifs

Synthèse Chimique



Extraction Végétale

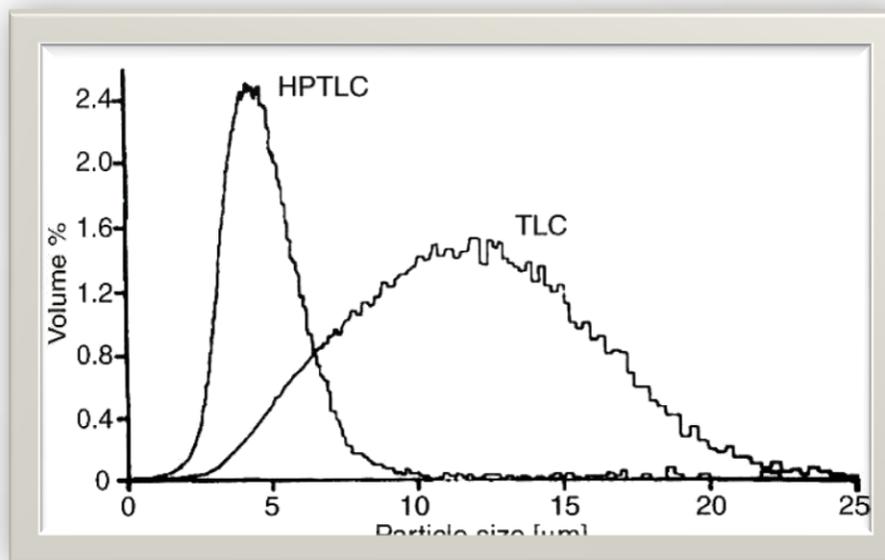


Hémisynthèse



Apport de l'HPTLC dans notre laboratoire

- Évolution de la CCM
- Granulométrie plus faible
 - 15-20 μm CCM
 - 5-7 μm HPTLC
- Meilleure distribution



Présentation de l'appareillage

Le déposeur



déposeur HPTLC, CAMAG automatic TLC sampler 4

- dépôt par vaporisation
- Flux d'azote (≈ 5 bar)
 - Dépôt moins diffus

Le système de développement



système de développement, CAMAG automatic developing chamber (ADC2)

- 5 étapes :
 - Ajout de l'éluant dans la cuve
 - Saturation
 - Pré-conditionnement
 - Développement
 - Séchage

Présentation de l'appareillage

Le système de révélation



système d'immersion, CAMAG
chromatogram immersion device

- Révélation homogène
- Révélation répétable
- Révélation reproductible

Le scanner

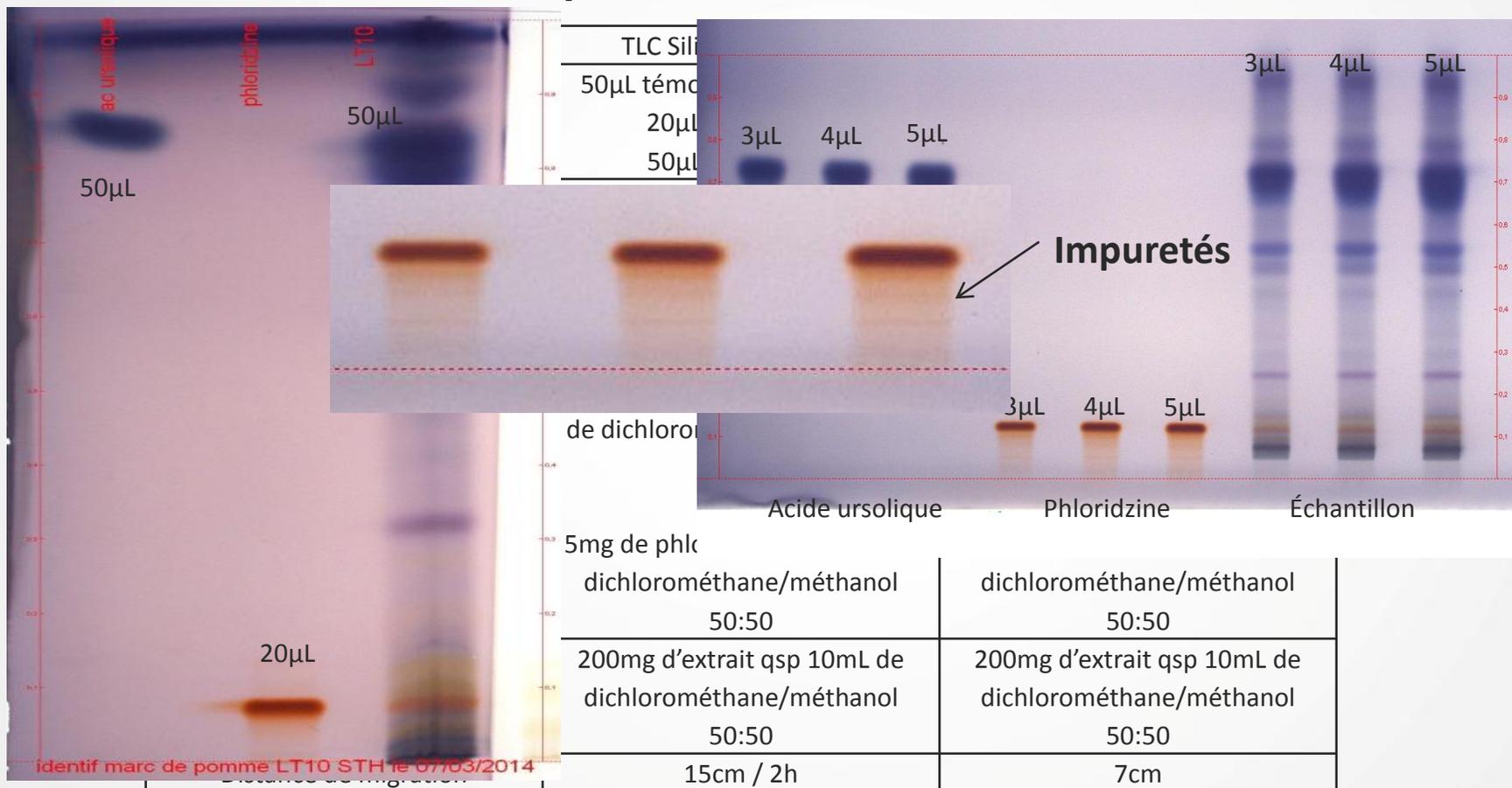


scanner, CAMAG TLC scanner 4

- Trois lampes
 - Tungstène
 - Mercure
 - Deutérium
- Multi-longueur d'onde

- 1. Transposition et développement de la méthode
- 2. Quantification de l'acide ursolique
- 3. Analyse par spectrométrie de masse

Transposition de la méthode



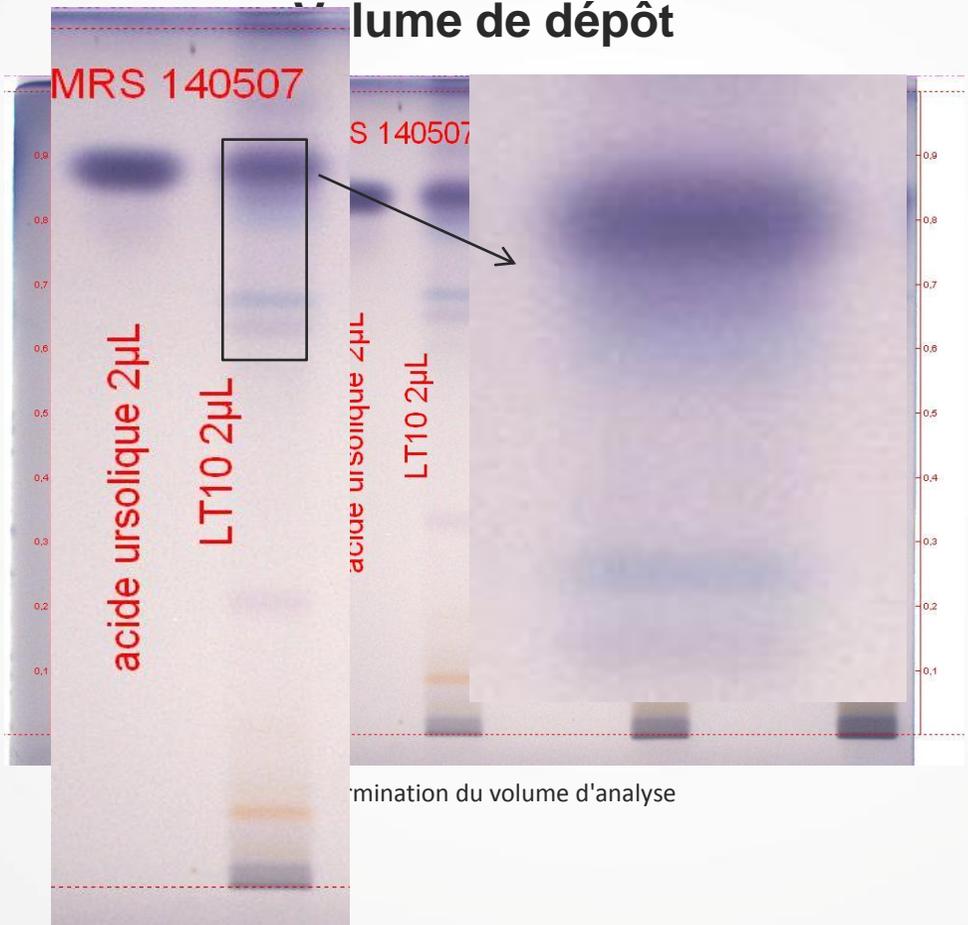
1. Transposition et développement de la méthode

2. Quantification de l'acide ursolique

3. Analyse par spectrométrie de masse

Optimisation de la méthode :

Volume de dépôt

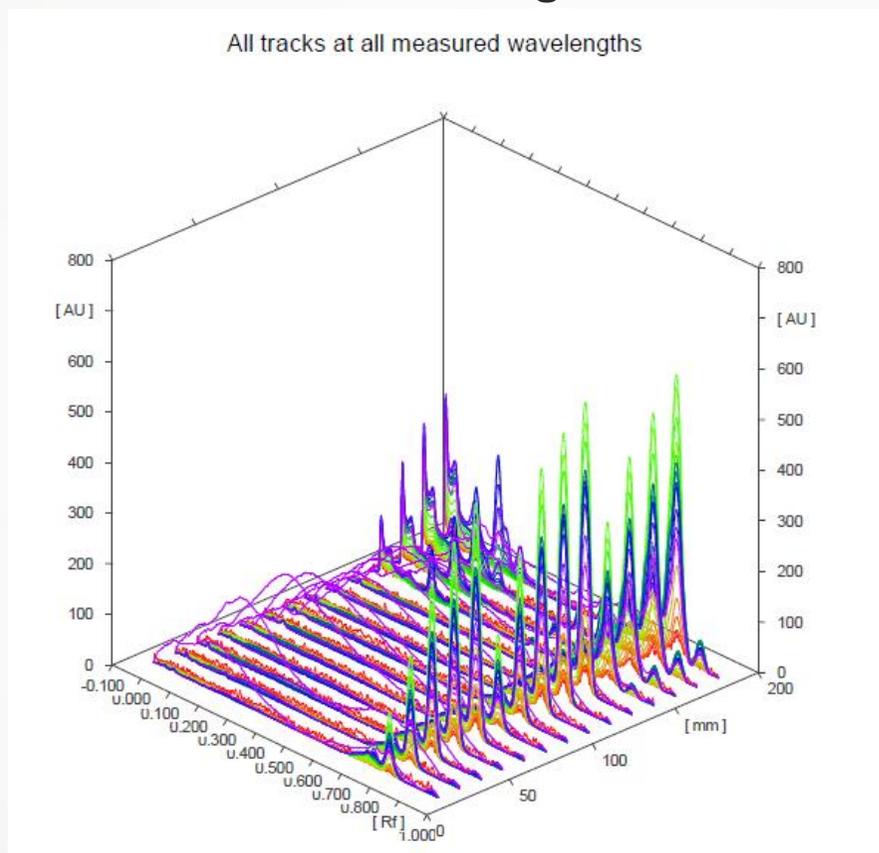


1. Transposition
et développement
de la méthode

2. Quantification
de l'acide
ursolique

3. Analyse par
spectrométrie de
masse

Détermination de la longueur d'onde



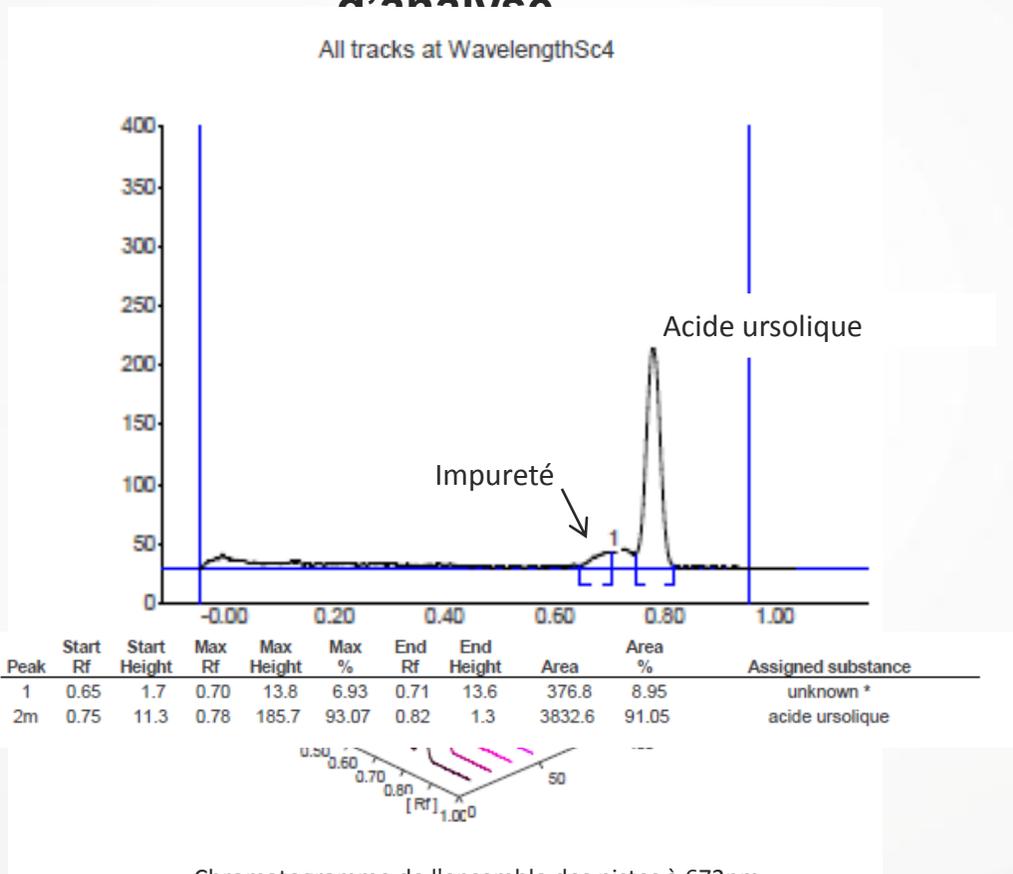
Superposition des chromatogrammes aux différentes longueurs d'onde étudiées

1. Transposition et développement de la méthode

2. Quantification de l'acide ursolique

3. Analyse par spectrométrie de masse

Détermination de la longueur d'onde d'analyse

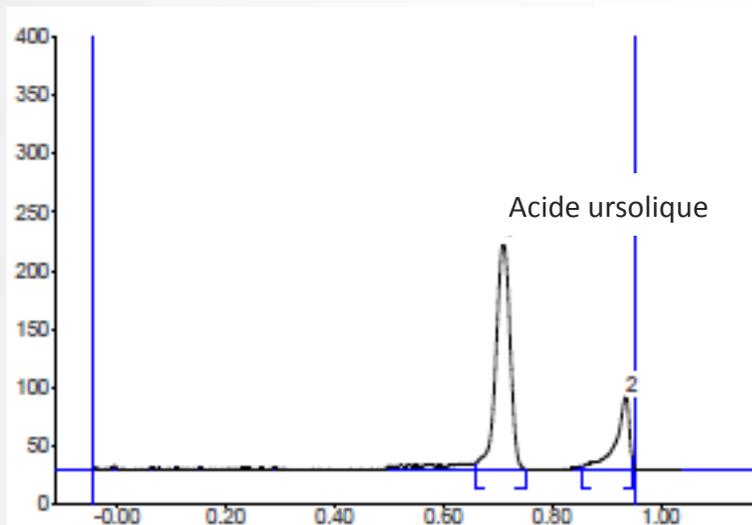




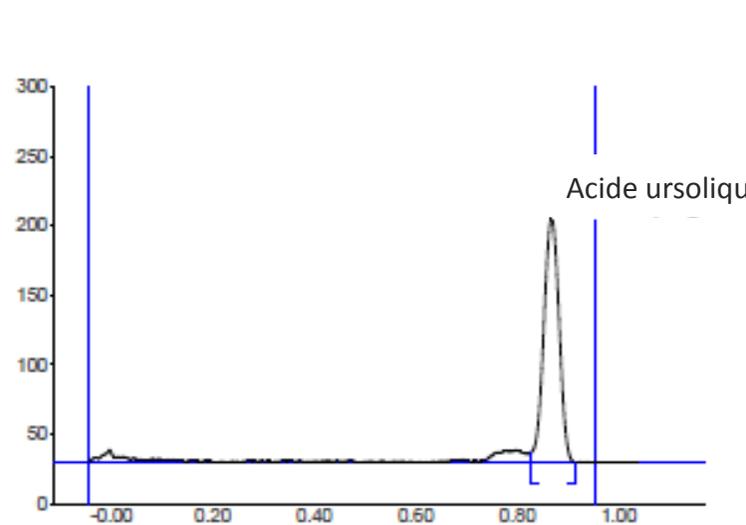
Modification de l'éluant

Toluène/formiate d'éthyle/acide formique 60:50:10

Toluène/formiate d'éthyle/acide formique 40:70:10



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1m	0.66	5.8	0.71	194.1	75.70	0.75	0.5	4179.6	76.18	unknown *
2	0.85	2.9	0.94	62.3	24.30	0.95	8.9	1306.9	23.82	unknown *

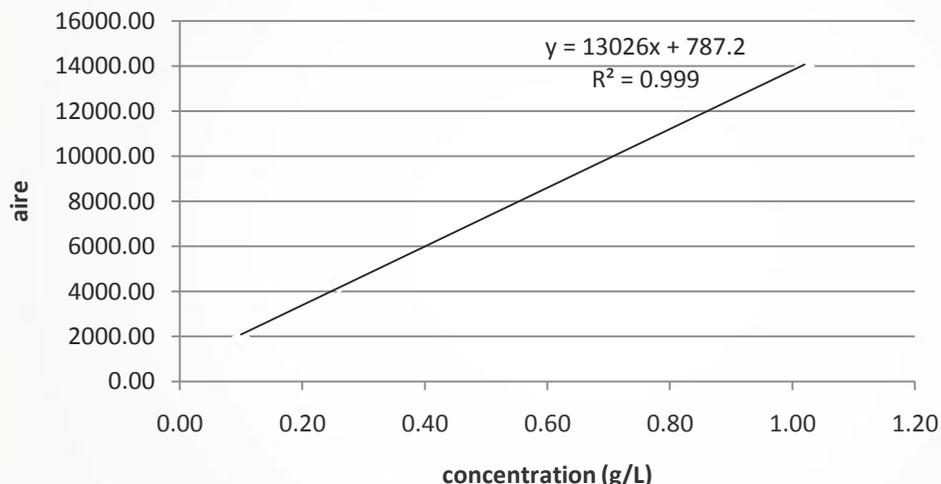


Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.83	5.9	0.87	175.8	100.00	0.92	0.1	4365.0	100.00	acide ursolique



Quantification après révélation

aire = f(concentration)



Courbe de calibration de l'analyse après révélation

Solution	Pourcentage HPTLC (%)	Pourcentage HPLC (%)	Ecart relatif (%)
A	7.5	4.5	66.7
B	7.2	4.5	60.0
C	7.3	4.5	62.2

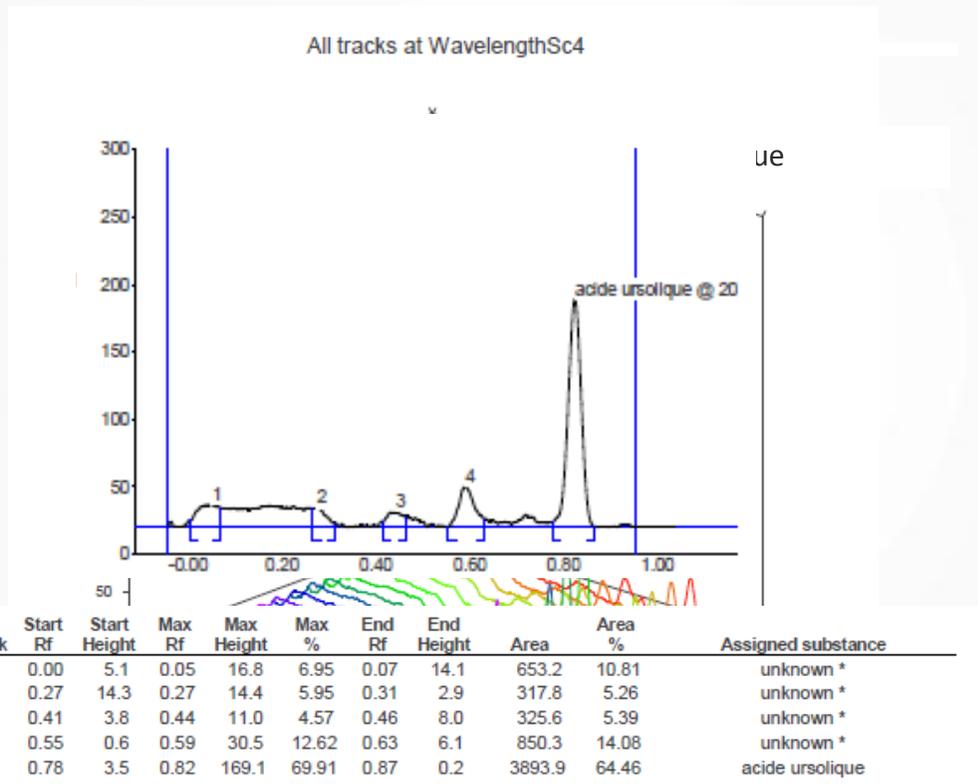
Comparaison des résultats HPTLC après révélation et HPLC

1. Transposition et développement de la méthode

2. Quantification de l'acide ursolique

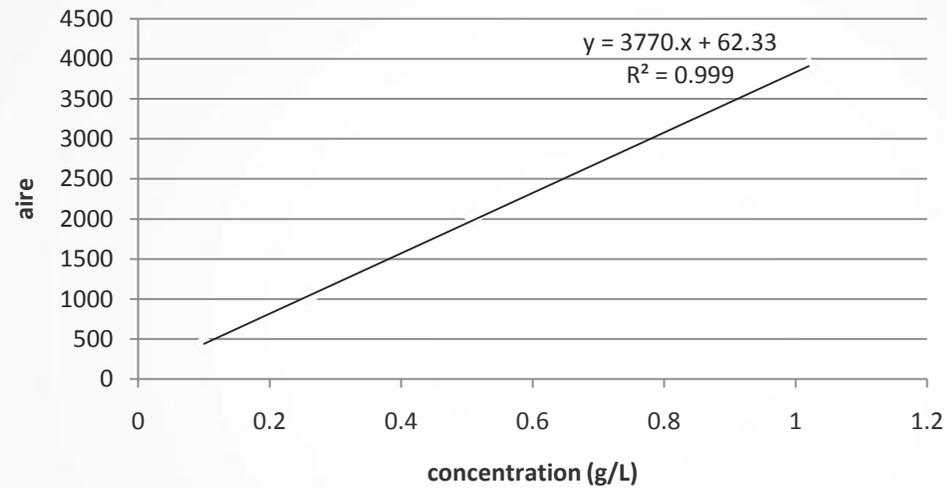
3. Analyse par spectrométrie de masse

Quantification avant révélation



Chromatogramme de l'ensemble des pistes à 205nm

aire=f(concentration)



Lot	Pourcentage HPTLC (%) m/m	Pourcentage HPLC (%) m/m	Ecart relatif (%)
A1	5.7	4.5	26.7
A2	5.8	4.5	28.9
B1	5.8	5.2	11.5
B2	6.0	5.2	15.4
C1	6.0	4.5	33.3
C2	5.4	4.5	20.0

Comparaison des résultats HPTLC avant révélation et HPLC

Validation de la méthode

- **Guideline ICH^{*1} Q2(R1)** : Validation of analytical procedures (2005)
- **Pharmacopée Européenne** : Guide technique pour l'élaboration des monographies (2011)
- **SFSTP^{*2}** : Validation des procédures analytiques quantitatives ; Harmonisation des démarches.

Partie I – Généralités – STP Pharma Prat., 7, 101-138, 2003

Partie II – Statistiques – STP Pharma Prat., 16, 1-31, 2006

^{*1}**ICH** : International Conference on Harmonization

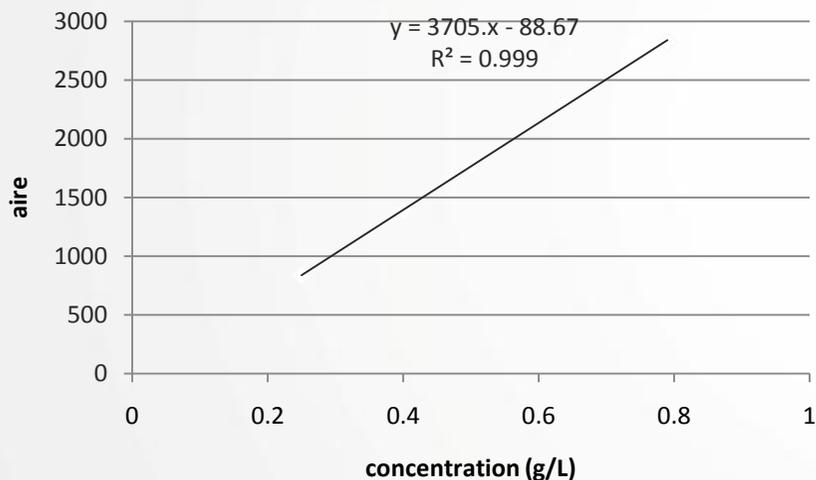
^{*2}**SFSTP** : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques



Validation de niveau 1

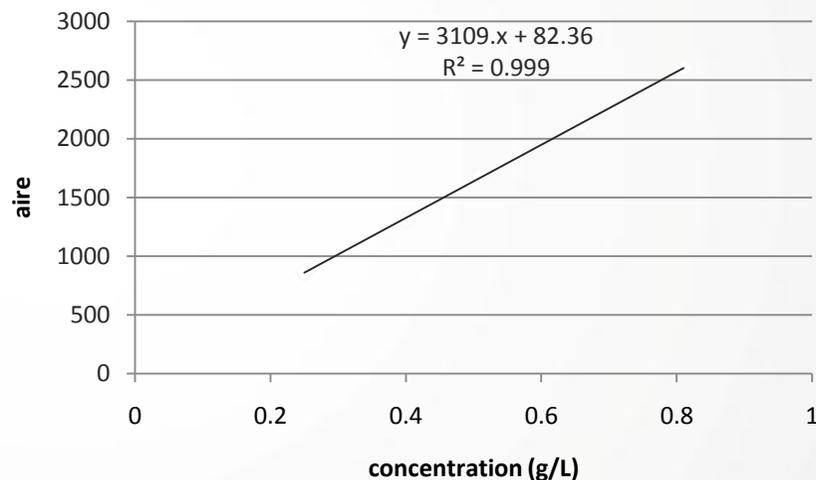
Étude de la linéarité

aire=f(concentration)



Courbe de calibration de la gamme étalon 1

aire=f(concentration)



Courbe de calibration de la gamme étalon 2

1. Transposition
et développement
de la méthode

2. Quantification
de l'acide
ursolique

3. Analyse par
spectrométrie de
masse

Validation de niveau 1

Étude de la répétabilité

Essai	R _F	Aire	Pesée (mg)	Pourcentage massique (%) m/m	Ecart type	Moyenne	CV (%)
A1	0,83	1021,6	204,0	5,7	0,36	5,45	6,54
A2	0,83	1052,7	213,3	5,5			
A3	0,83	1048,3	206,6	5,7			
A4	0,83	1056,6	207,0	5,7			
A5	0,84	925,8	198,0	5,3			
A6	0,84	874,2	207,5	4,8			

- Test de Dixon
 - Supérieur à 0,560 pour un niveau de risque de 5%

$$r = \frac{5.3-4.8}{5.7-4.8} = 0.556$$

1. Transposition
et développement
de la méthode

2. Quantification
de l'acide
ursolique

3. Analyse par
spectrométrie de
masse

Détermination des LOD et LOQ

	Avant révélation	Après révélation
LOD	0.08g/L	0.02g/L
LOQ	0.25g/L	0.06g/L

Limite de détection et de quantification de l'acide ursolique

1. Transposition
et développement
de la méthode

2. Quantification
de l'acide
ursolique

3. Analyse par
spectrométrie de
masse

le module de transfert masse



système de transfert masse

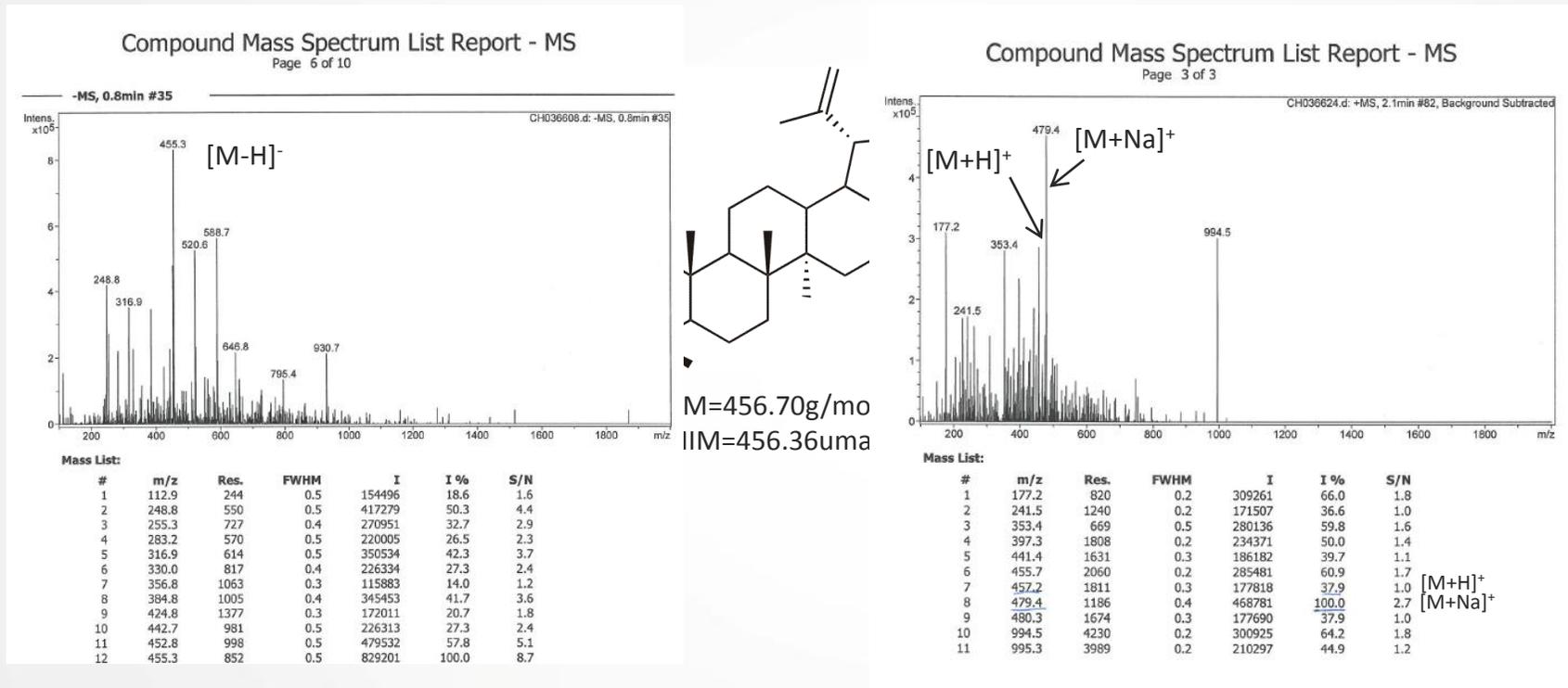
- Désorbe le composé de la plaque
- Solvant adapté
- Infusion masse

1. Transposition et développement de la méthode

2. Quantification de l'acide ursolique

3. Analyse par spectrométrie de masse

Analyse par spectrométrie de masse



Spectre de masse issu d'une bande HPTLC témoin en mode ESI⁻ sur une trappe ionique Agilent 1100 Series LC/MSD-SL

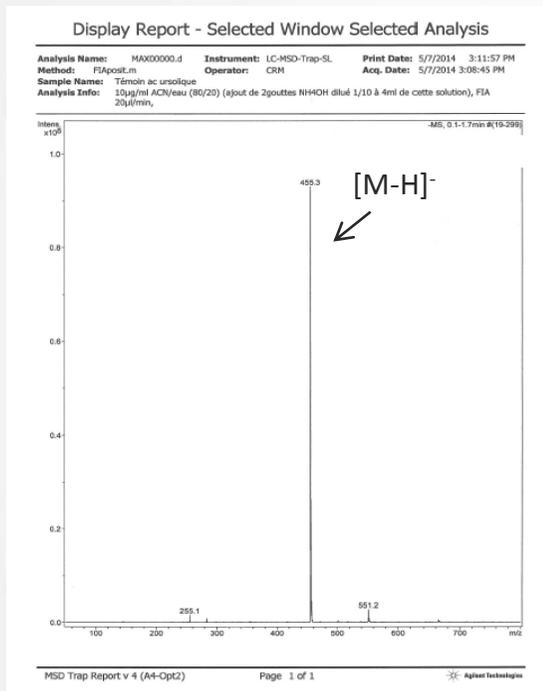
Spectre de masse issu d'une bande HPTLC témoin en mode ESI⁺ sur une trappe ionique Agilent 1100 Series LC/MSD-SL

1. Transposition et développement de la méthode

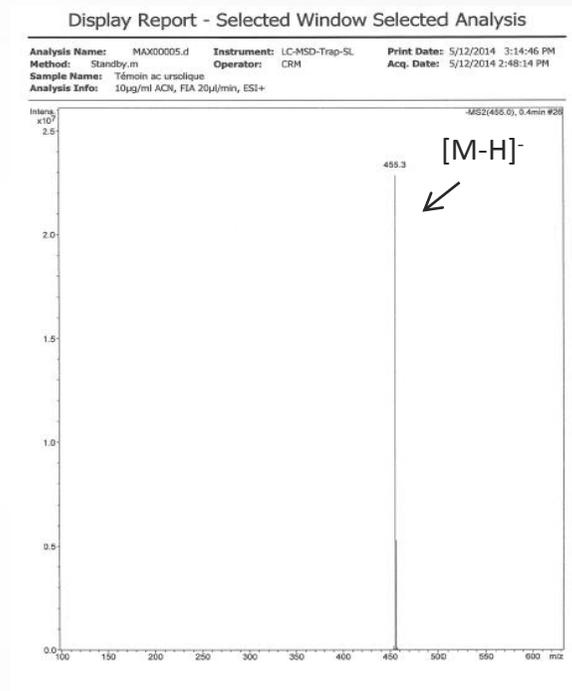
2. Quantification de l'acide ursolique

3. Analyse par spectrométrie de masse

Analyse par spectrométrie de masse



Spectre de masse d'un témoin d'acide ursolique en solution en mode ESI⁻ sur une trappe ionique Agilent 1100 Series LC/MSD-SL



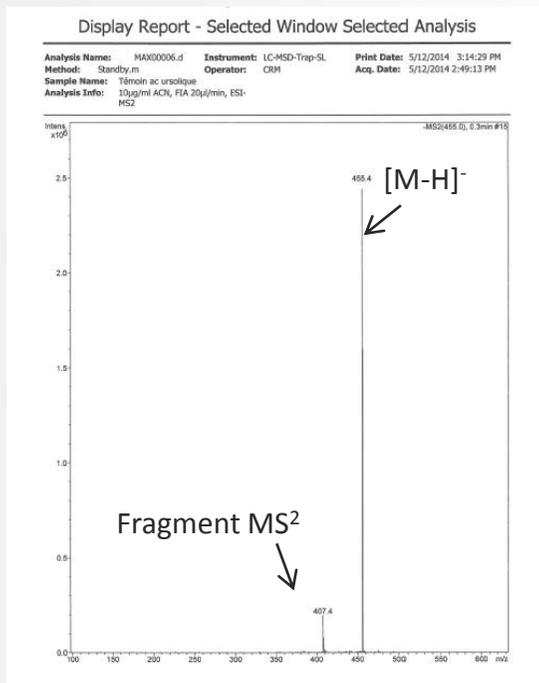
Spectre de masse d'une bande HPTLC témoin en mode ESI⁻ sur une trappe ionique Agilent 1100 Series LC/MSD-SL

1. Transposition et développement de la méthode

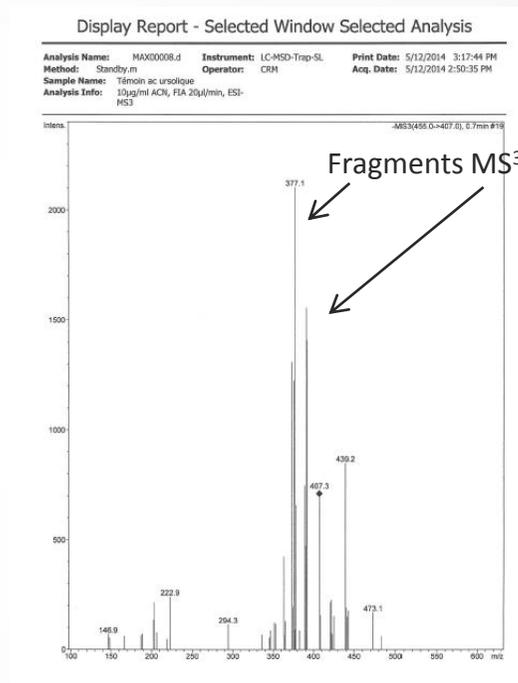
2. Quantification de l'acide ursolique

3. Analyse par spectrométrie de masse

Analyse par spectrométrie de masse



Spectre MS² en mode ESI⁻



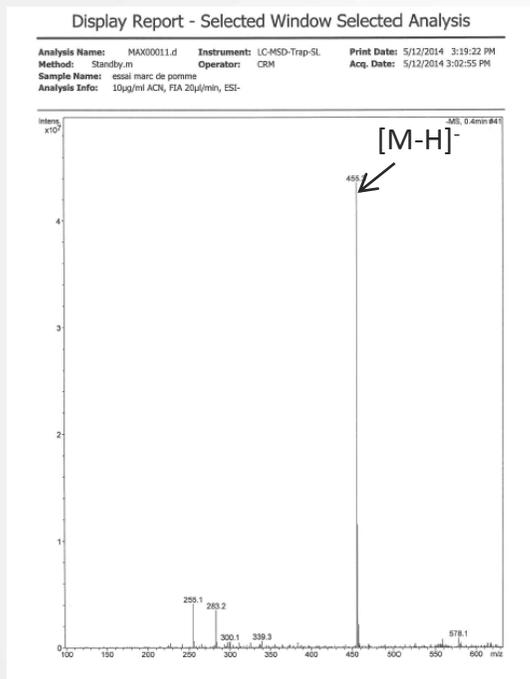
Spectre MS³ en mode ESI⁻

1. Transposition et développement de la méthode

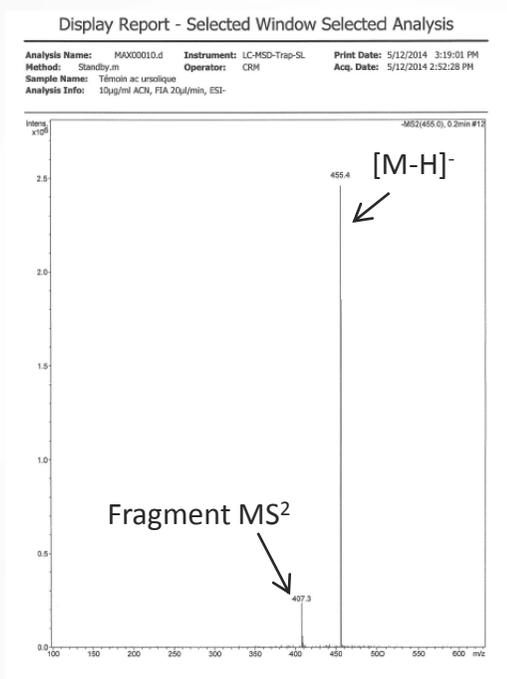
2. Quantification de l'acide ursolique

3. Analyse par spectrométrie de masse

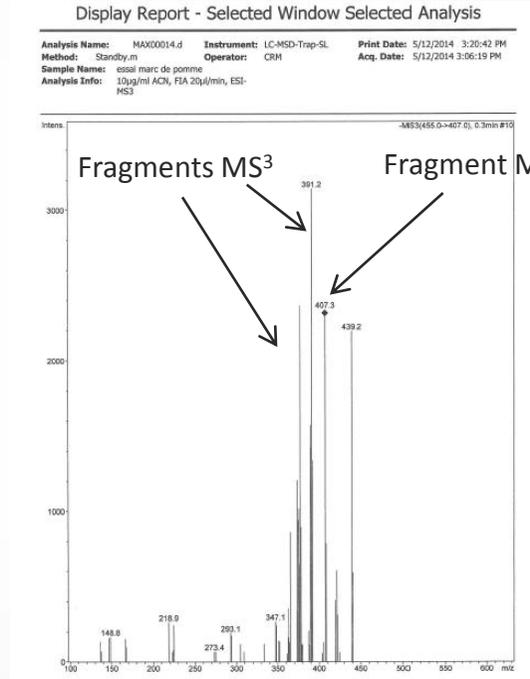
Analyse par spectrométrie de masse



Spectre de masse d'une bande HPTLC du lot A en mode ESI⁻ sur une trappe ionique Agilent 1100 Series LC/MSD-SL



Spectre MS² en mode ESI⁻ du lot A



Spectre MS³ en mode ESI⁻ du lot A

Conclusion

Points positifs	Points négatifs
Mise en œuvre	Volume de révélateur nécessaire important
Temps d'analyse	Mise au point de méthode Plus complexe (vs HPLC)
Phase stationnaire neuve Pas de contamination croisée	Prix
Répétabilité	
Sensibilité	
Quantification	
Analyse masse	

Autres résultats

Projet	Famille	Point positif	Point négatif
1	Sucres	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6) Quantification réalisé	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)
2	Lipides polaires	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6)	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)
3	Triterpène	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6)	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)
4	Lipides polaires	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6) Meilleur séparation	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)
5	Polyphénols	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6) Meilleur séparation	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)
6	Dérivés coumariques	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6)	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)

Autres résultats

Projet	Famille	Point positif	Point négatif
7	Diterpène	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6)	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)
8	Diterpène	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6)	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)
9	Acide aminé	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6) Quantification possible sur 5 point de gamme. LD à 0.01 % m/m. Soutient sur les investigations prod.	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)
10	Stérol	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6) Meilleur séparation Observation de plus de tâche	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)
11	Triterpène Polyphénols	Diminution du volume de dépôt et du temps de migration (temps migration diviser par 6) Meilleur séparation Quantification réalisé avec pré-validation de la méthode. Investigations module MS	Volume de révélateur utilisé élevé (~200mL)



**MERCI DE VOTRE
ATTENTION**

Laurent.lasbennes@pierre-fabre.com

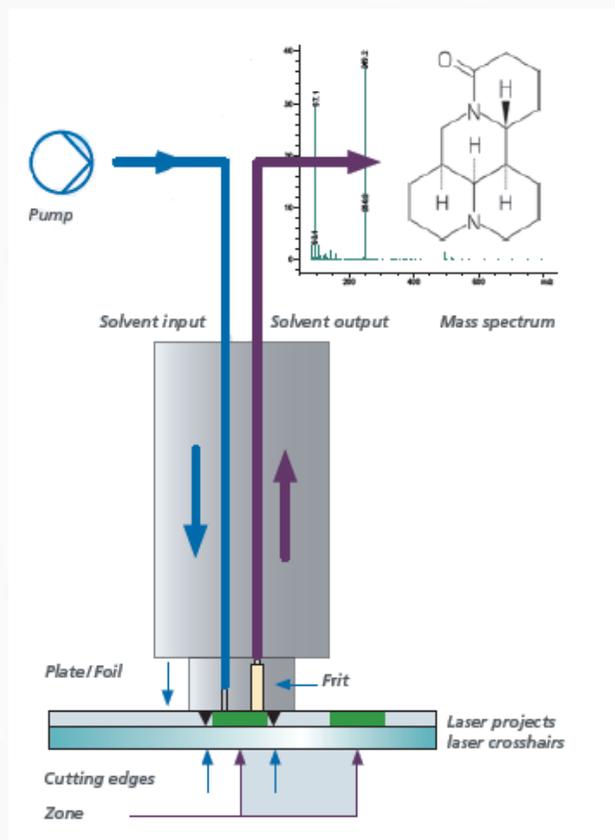
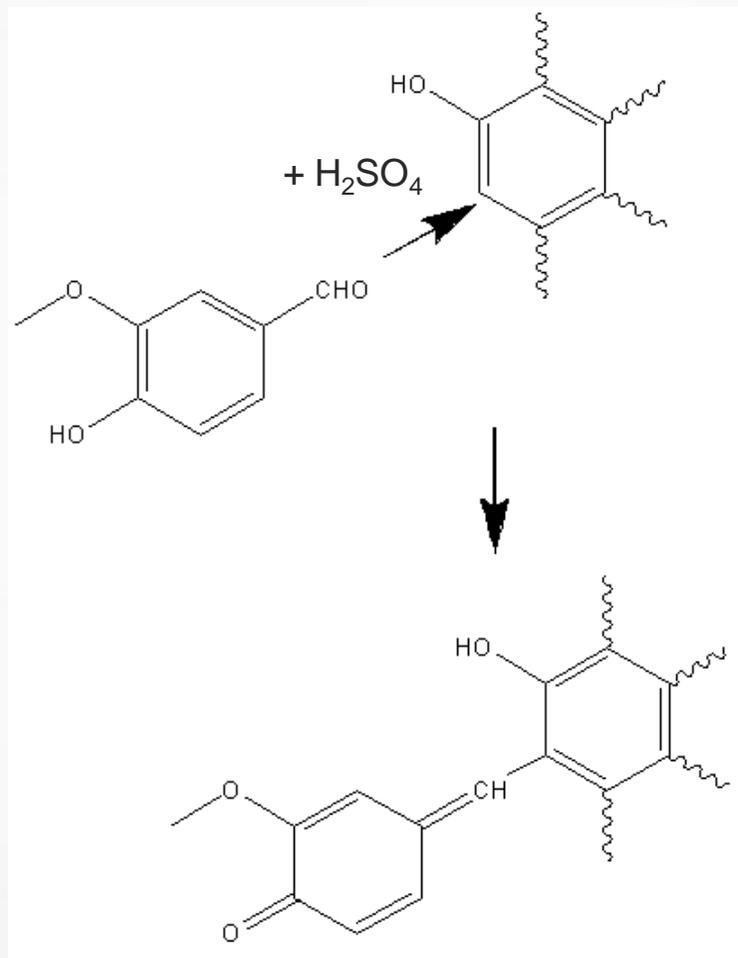


Schéma de fonctionnement du module de transfert masse



Dosage de l'acide ursolique par HPTLC