

Intérêt stratégique de l'HPTLC-MS sur un site de production de principes actifs pharmaceutiques

Amélie HAVARD, Spécialités Analytiques
Oril Industrie

Club de CCM
Merck Biopharma, Lyon
17 Décembre 2015



- Présentation du Groupe SERVIER, d'Oril Industrie et des Spécialités Analytiques

- Mise en place du couplage TLC/HPTLC-MS

- Différentes applications sur des produits en développement à ORIL
 - Exemple 1: Identification d'une nouvelle impureté
 - Exemple 2 : Problème de coloration
 - Exemple 3 : Impuretés non vues en LC

- Exemple sur un produit de production

- Conclusion et perspectives

Quelques chiffres



Fondé en **1954** par le Dr Jacques SERVIER
21 400 employés
25^{ème} groupe pharmaceutique mondial
2^{ème} groupe pharmaceutique français

R&D



25 % du CA
investi en R&D en 2014

3 000 collaborateurs



- **4 Milliards** de CA
- **92 %** des princeps consommés hors de France
- Excédent de la balance commerciale pour la Chimie et la Pharmacie : **46 % de l'excédent de la balance commerciale française pharma + chimie pharmaceutique**

Domaines Thérapeutiques

Cardiologie



Oncologie



Métabolisme



Rhumatologie



Neuropsychiatrie



L'industrie SERVIER dans le monde

Direction
Industrie

Atteindre l'excellence pour faire
de notre Industrie un avantage
concurrentiel pour la Maison

11
sites
de production

2970
personnes

416
millions
de boîtes / an



Les grandes phases de développement d'un médicament



IMPD: Investigational Medicinal Product Dossier
CTD: Common Technical Document

Quelques chiffres

- **100 %** Filiale du Groupe SERVIER
- **800** collaborateurs
- **220 M€ CA**
- **2** sites

Nos activités

Production :

- **250** collaborateurs
- **1600 Tonnes** produites en 2014
- Capacités : de **10 L à 10 000 L**

Recherche et développement : 1 Centre de Recherche Industriel

- **145** collaborateurs
- Process et développement analytique
- Production pilote
- Réglementaire

CMO / CDMO

4 entités opérationnelles :

- Développement Chimique
- Développement Analytique
- Pilote
- Spécialités



Sites de Bolbec et Baclair

Laboratoire des **Techniques Séparatives et Préparatives**

Missions :

- Produire des lots de référence
- Purifier des intermédiaires de synthèse
- Purifier des lots de PA destinés à des études toxicologiques, galéniques et cliniques
- Isolement des impuretés d'intérêts

Moyens :

- Matériel Camag : ATS4, ADC2, AMD 2, Visualiseur ...
- Colonnes : NOVASEP diamètres 50mm, 110 mm, 200mm et 450 mm

Laboratoire d'Analyse **Structurale**

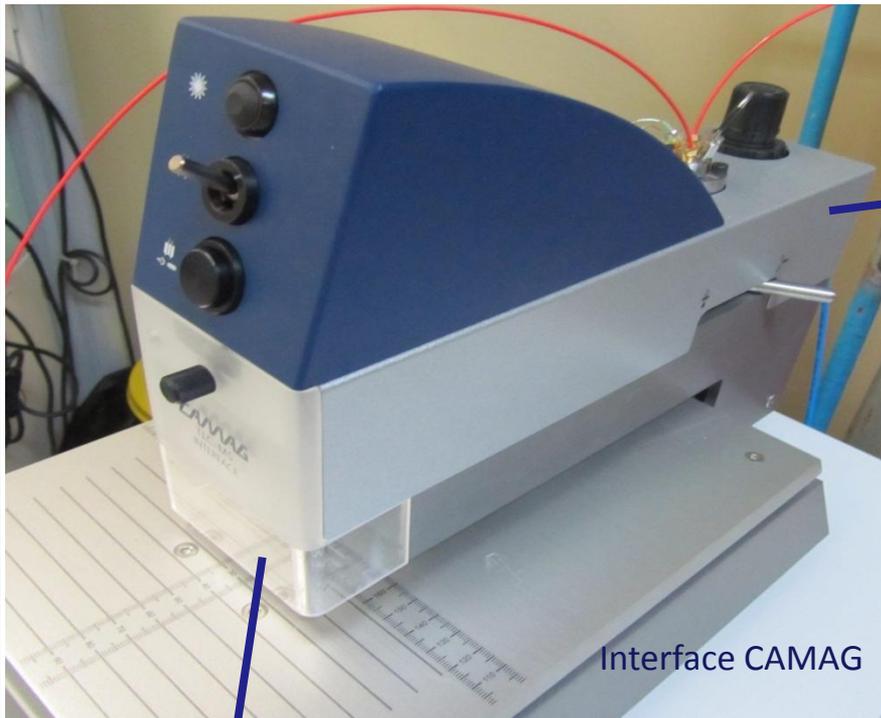
Missions :

- Identification par RMN et/ou MS de tous les intermédiaires de synthèse
- Identification d'impuretés d'intérêts

Moyens :

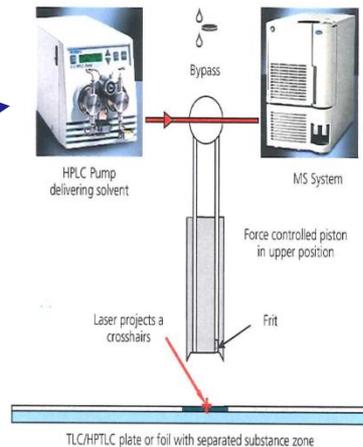
- 2 RMN : 400 MHz
- MS :
 - HPLC-MS : Xévo G2S Q-TOF, *Waters* et IT-TOF, *Shimadzu*
 - GC-MS : MSD 5975, *Agilent Technologies*
 - CCM-MS

a) L'interface

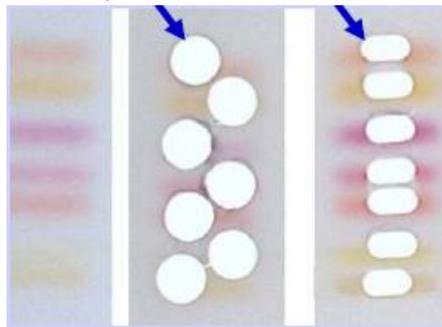
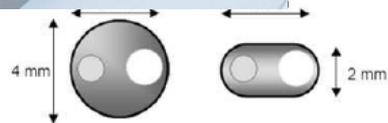
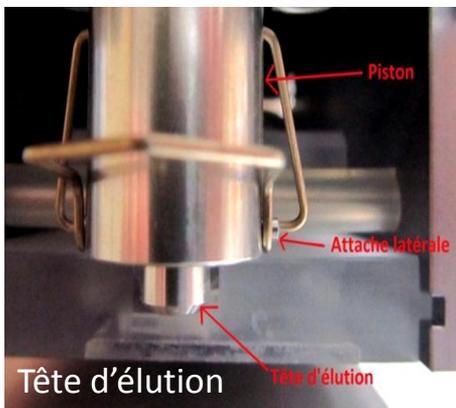
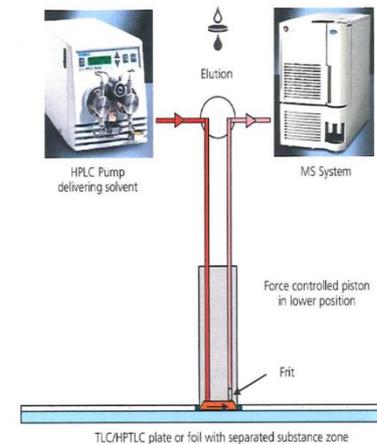


Interface CAMAG

Mode Bypass



Mode Elution



Xévo G2-S Q-TOF

b) Optimisation des paramètres

- TLC

- Choix du type de plaque :

- ✓ TLC avec support en verre ou aluminium
- ✓ HPTLC avec support en verre
- ✓ HPTLC MS avec support en verre

➔ Dépend de la résolution et sensibilité souhaitées

- Quantité déposée :

- ✓ TLC : 50 µg pour un composé « pur », et 100 µg pour un composé présent à très faible teneur
- ✓ HPTLC : 2 µg et 6 µg pour un composé « pur », 10 µg et 30 µg pour un composé présent à très faible teneur
- ✓ HPTLC MS : même chose que pour les plaques HPTLC

- Nettoyage des plaques :

- ✓ MeOH, MeOH/H₂O ...

➔ MeOH/H₂O 3:1 (v/v)

- Paramètres sur le déposeur automatique :
 - ✓ Mode de dépôt : vaporisation
 - ✓ Largeur des bandes : 6 mm
 - ✓ Espacement entre les bandes : 25 mm



- **Pompe / Interface**

- Débit : 0,2 mL/min
- Nature des éluants : MeOH, CH₃CN, MeOH/CH₃CN, CH₃CN/H₂O 80:20, MeOH + 10 mM formate ammonium 95:5 (v/v), MeOH + 0,1 % Acide formique ...

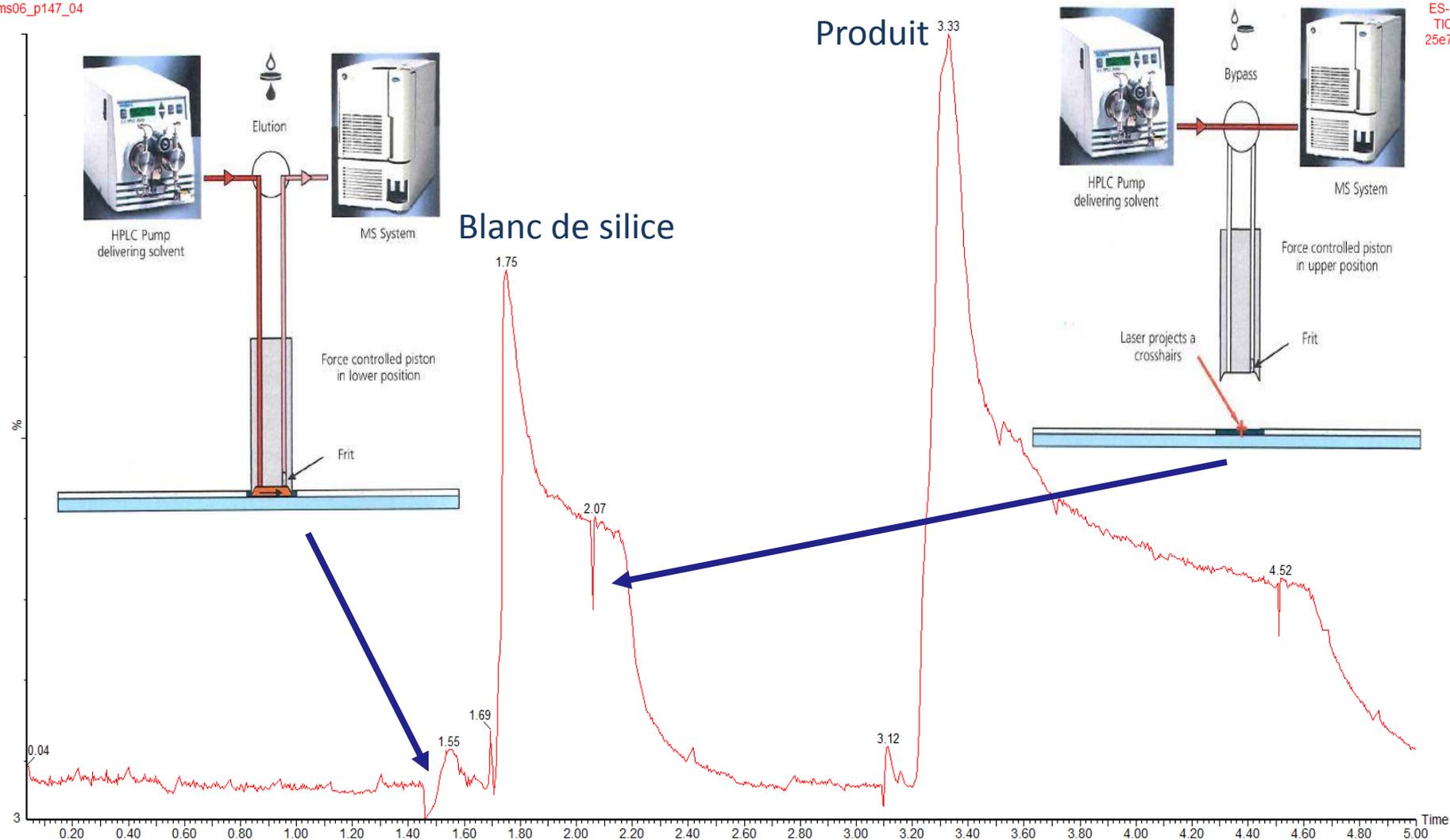
➔ MeOH

- **MS**

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ Source d'ionisation (ESI) et modes (+ ou -) ➤ Tension de capillaire : 3 kV ➤ Température source : 120 °C ➤ Température désolvatation : 500 °C ➤ Débit gaz de désolvatation : 800 L/h | <ul style="list-style-type: none"> ➤ MS et/ou MS/MS ➤ Durée de l'analyse 5 minutes |
|--|--|

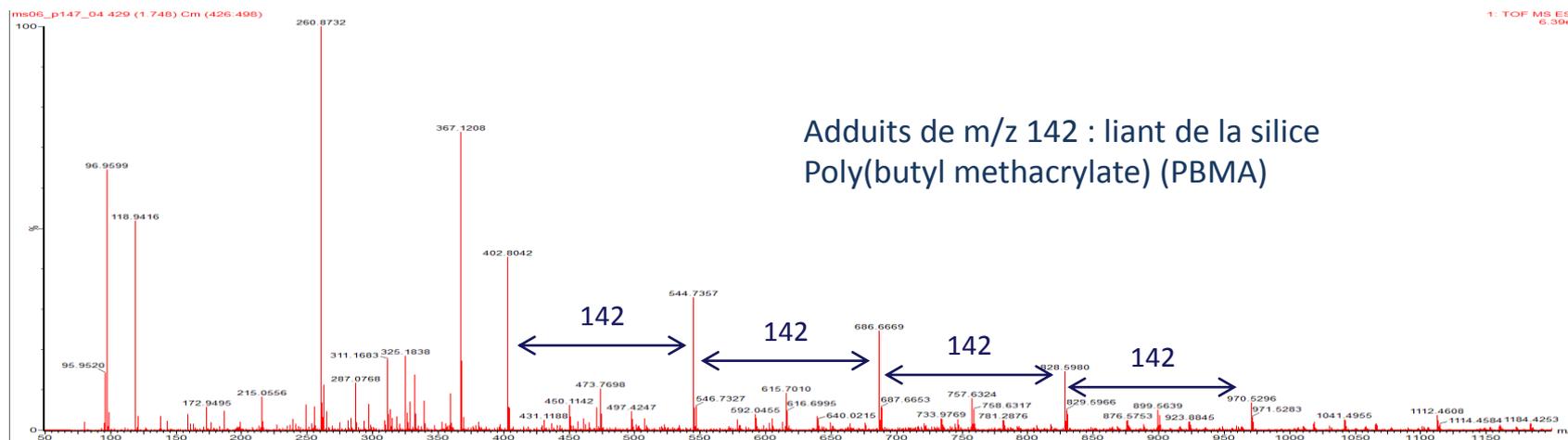
c) Résultats : obtention du TIC

ms06_p147_04

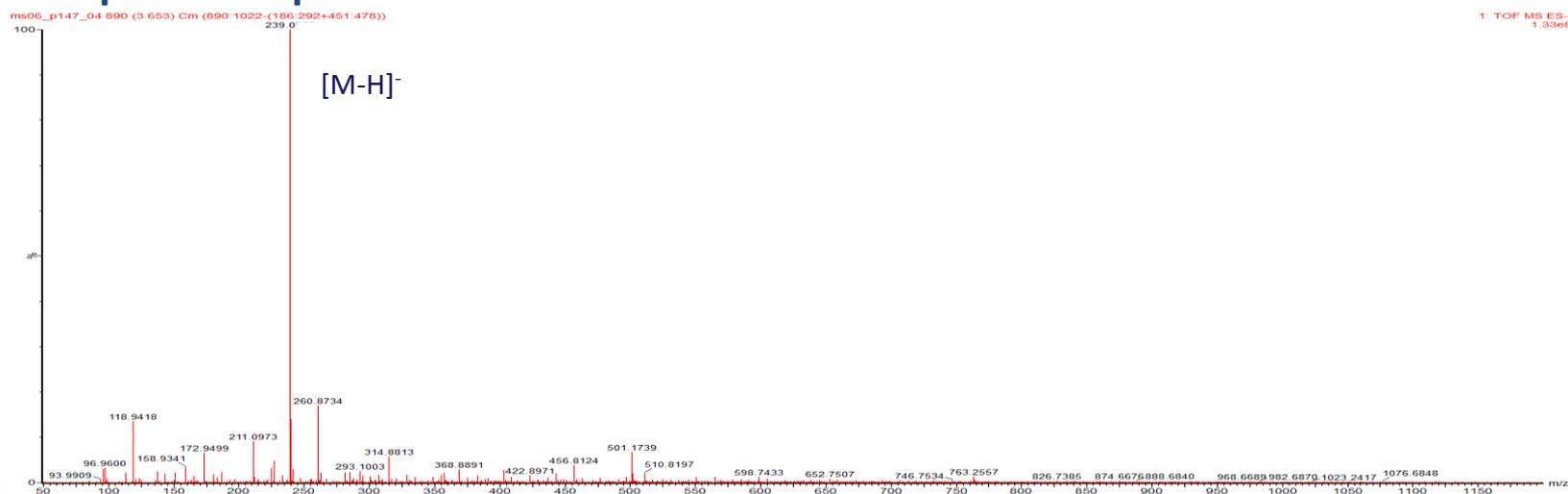


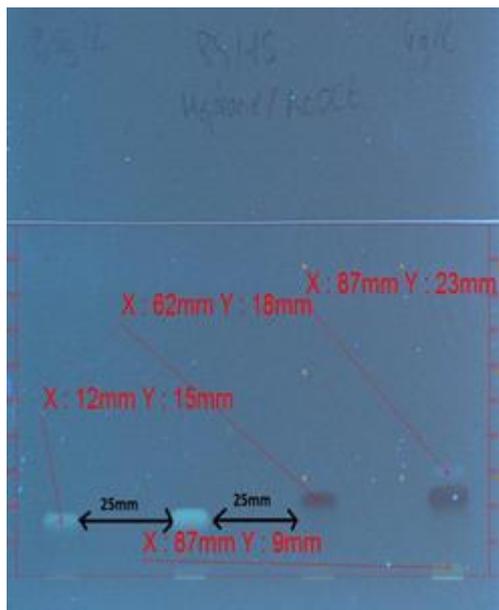
c) Résultats : obtention des spectres de masse

- Spectre du blanc de silice



- Spectre du produit attendu



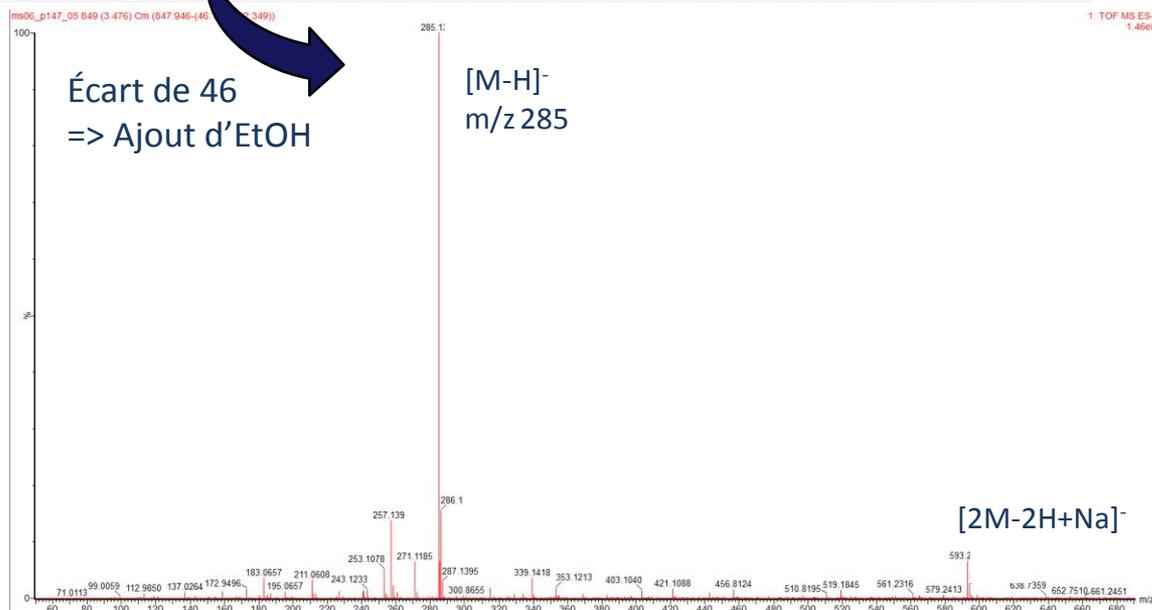
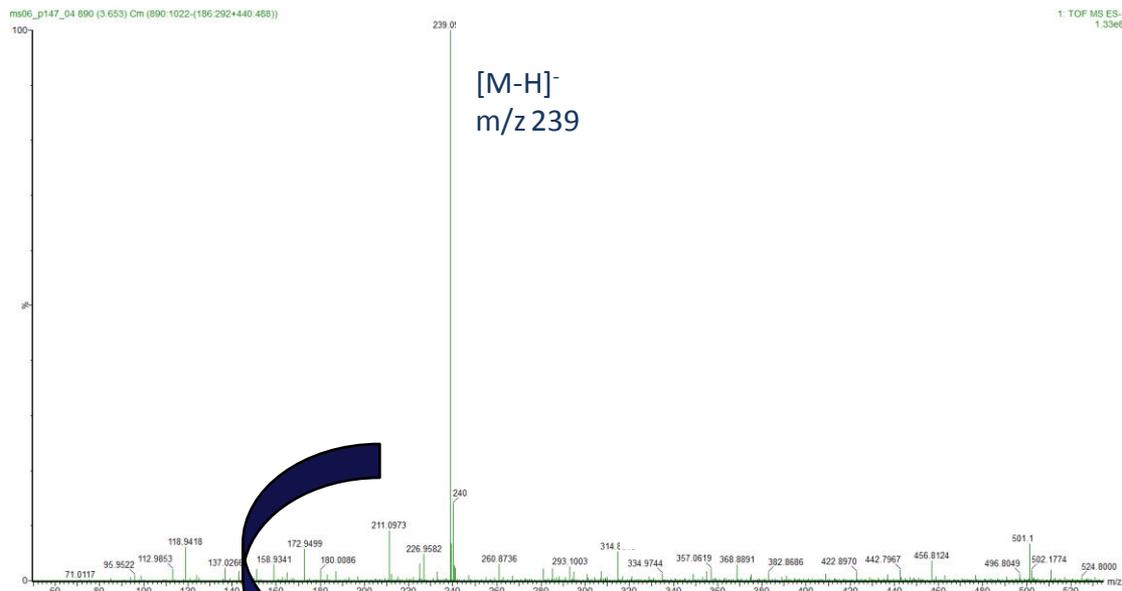


Plaque HPTLC comportant le dépôt du composé 1 et de l'impureté recherchée

Plaque HPTLC Si60 F254s MERCK 10×10 cm
 2 g/L, volume : 1 µL et 3 µL
 85/15 Hept/AcOEt
 Révélation : UV 254 nm

0,2 mL/min à 100 % MeOH

Xévo G2S Q-TOF
 Electrospray négatif
 Full MS



Écart de 46
 => Ajout d'EtOH

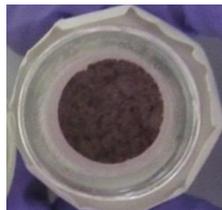
Ancienne voie de synthèse

Nouvelle voie de synthèse



Produit beige

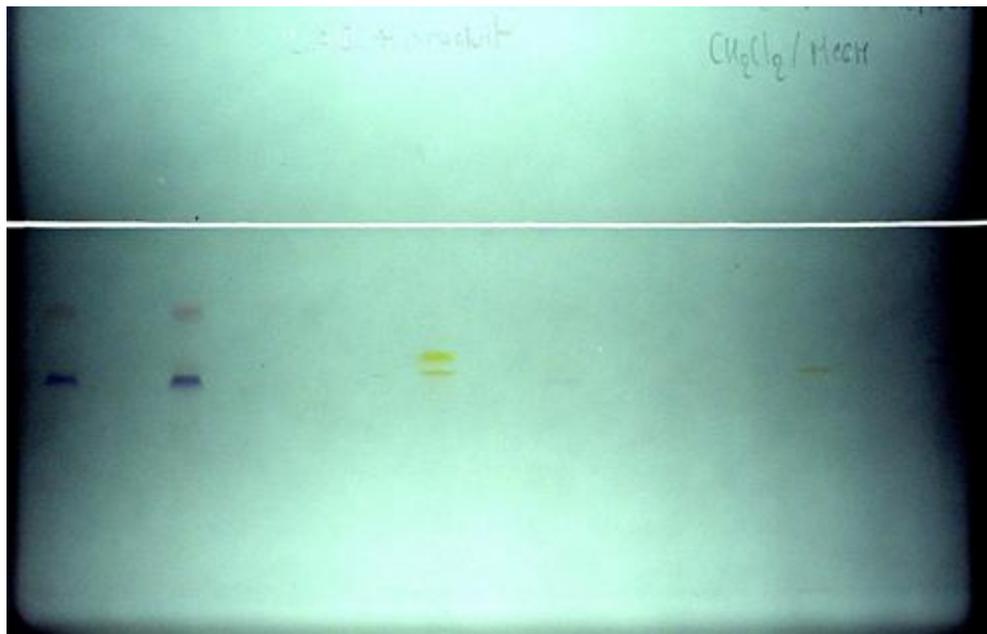
Optimisation
du mode



Produit violet

Nouvelles impuretés responsables de cette coloration ?

- ✓ Identification par LC-MS
- ✓ Identification par HPTLC-MS

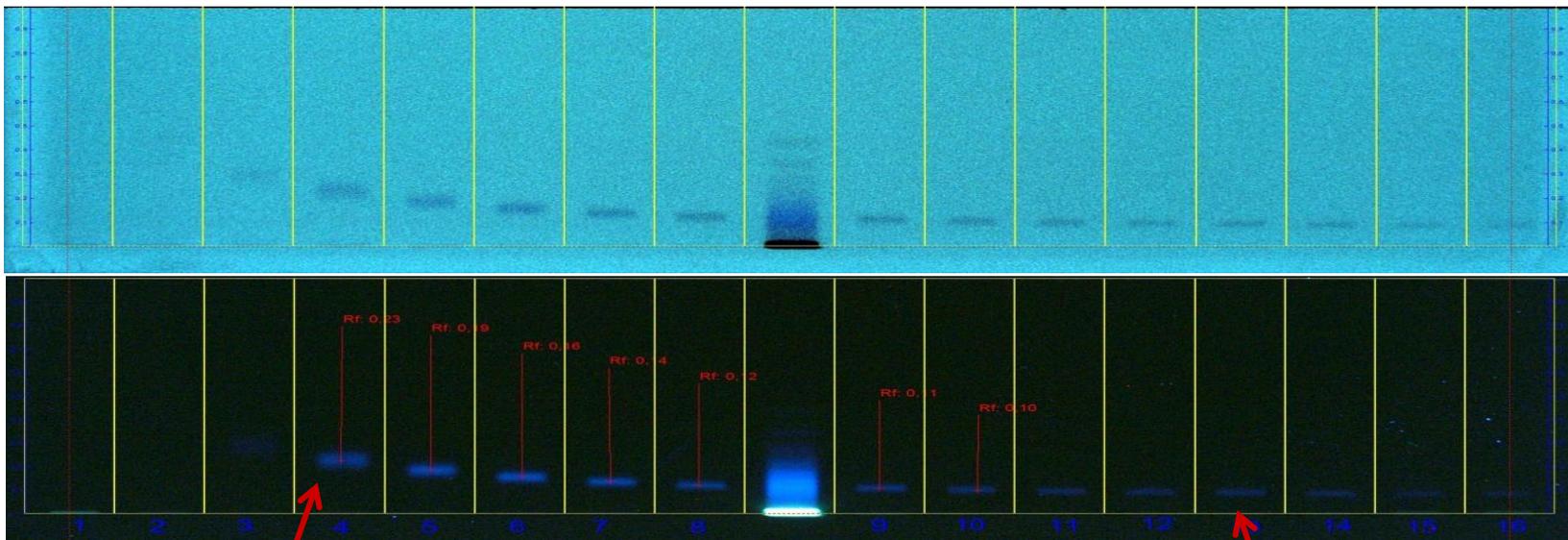


Plaque HPTLC MS comportant les dépôts d'une fraction de couleur violette et des impuretés connues

Plaque HPTLC grade MS MERCK F254
20×10 cm
2 g/L, volume : 1 µL
95/5 CH₂Cl₂/MeOH + 1 mL HCOOH
Révélation : visible

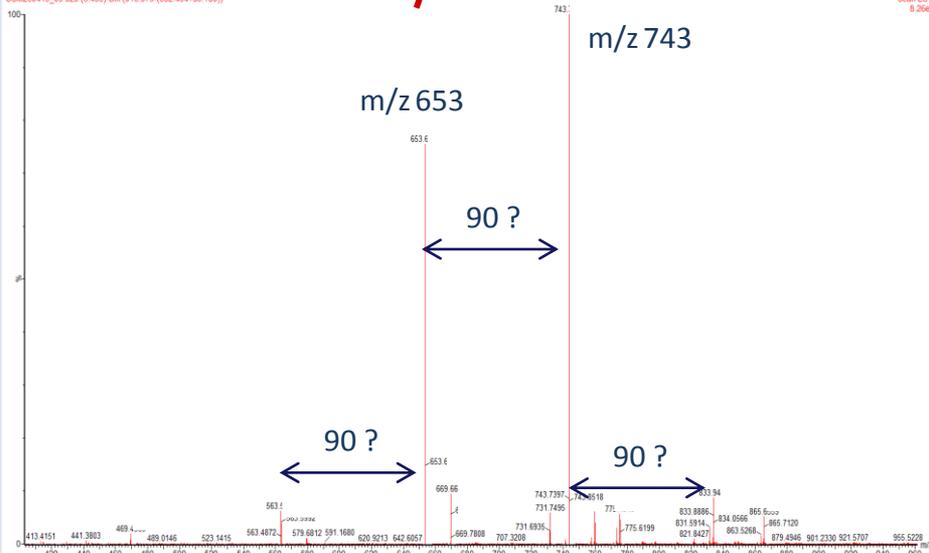
0,2 mL/min à 100 % MeOH

Xévo G2S Q-TOF
Electrospray négatif
Full MS

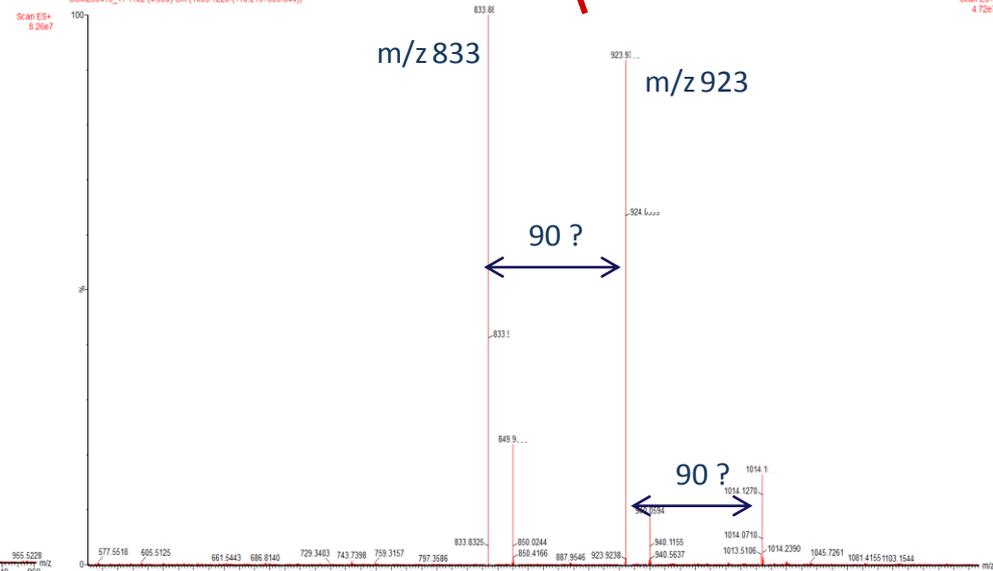


Plaque HPTLC révélée à 254 nm et 366 nm d'impuretés isolées suite à une extraction

CCM230415_03_929 (3.453) Cm (913.973-392.434+65.1699)



CCM230415_11_1102 (4.059) Cm (1093.1229-(110.213+505.644))

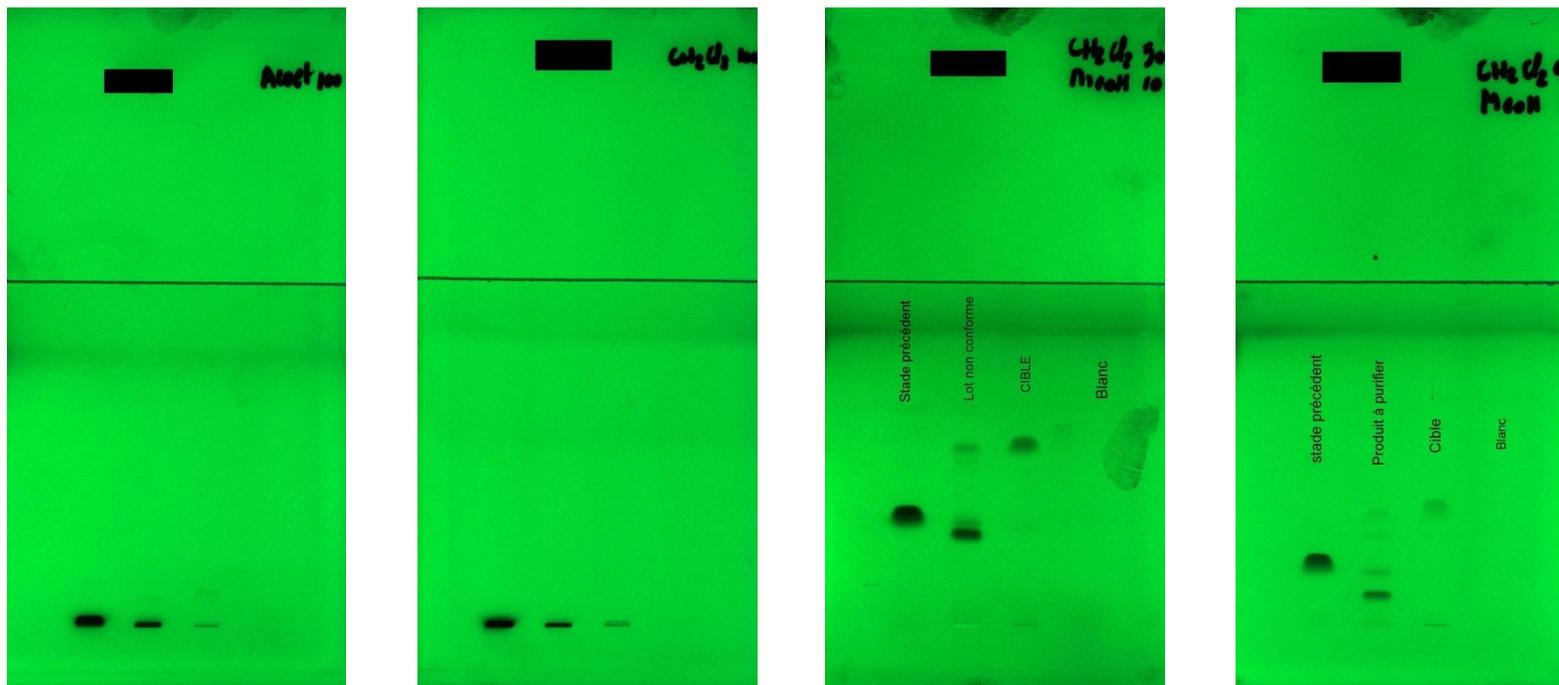


Scan ES+ 4.72e7

- **Contexte**

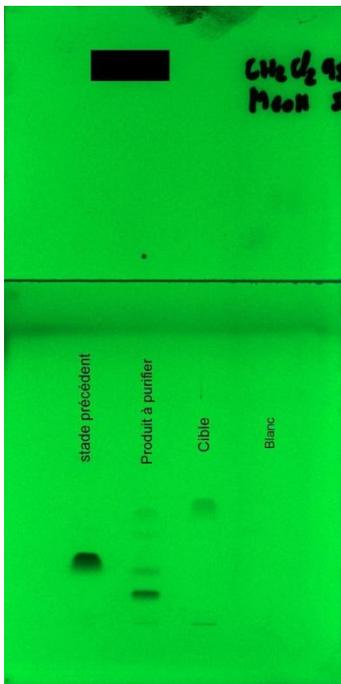
- Non-conformité d'un intermédiaire d'un produit en production
- 3 causes de non-conformité ont été recensées :
 - Une non-conformité due à une bande supplémentaire en IR
 - Présence du catalyseur utilisé dans la synthèse à une teneur supérieure à la spécification
 - Présence du stade précédent à une teneur supérieure à la spécification

- **Optimisation du système TLC**



Plaques TLC Si60 F254 MERCK 10x20 cm, révélation : une nuit à l'iode et éclairage à 254 nm

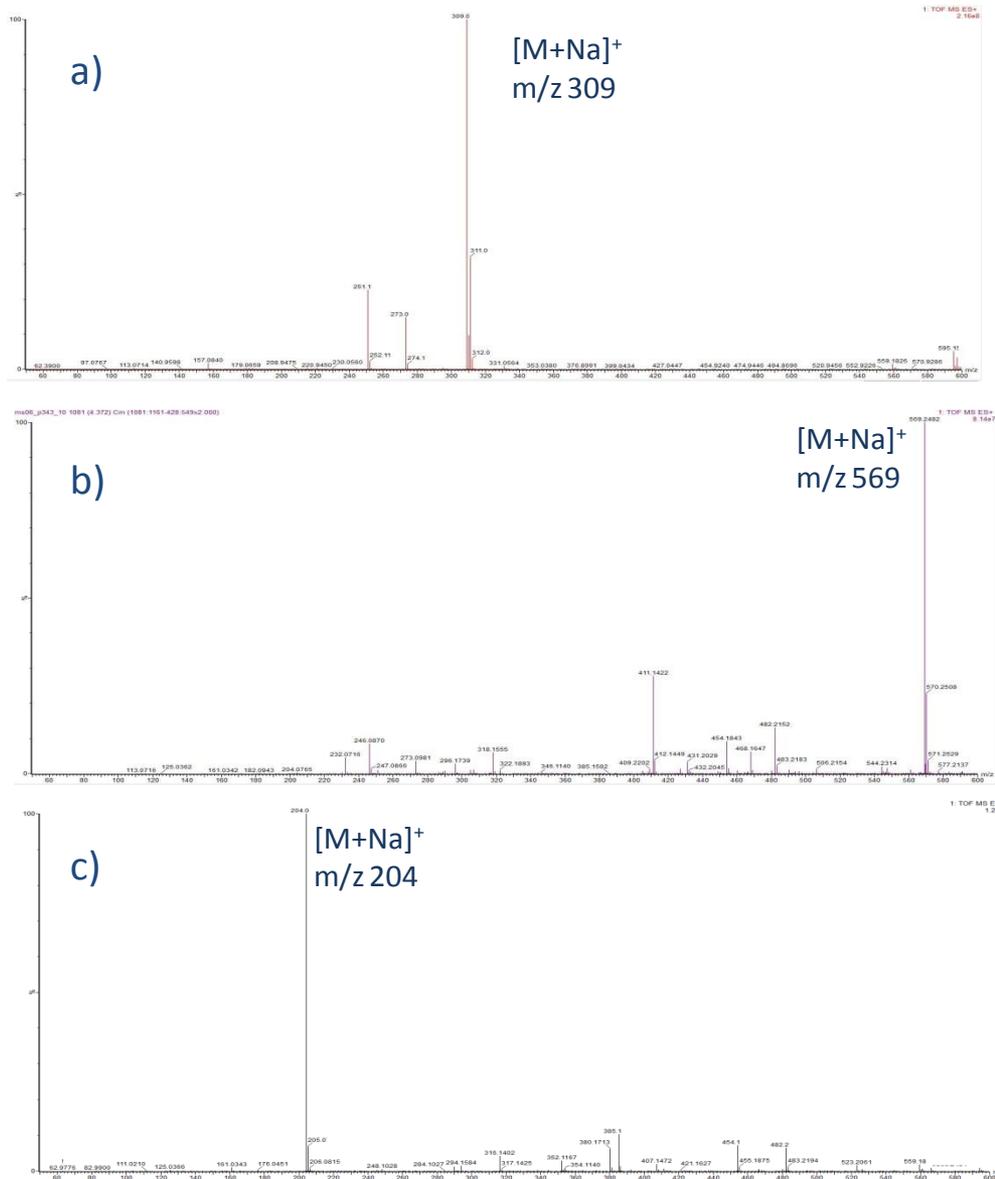
- Analyses par TLC-MS



Plaque TLC Si60 F254 MERCK 10×20 cm
 5 g/L, volume : 5 µL
 95/5 CH₂Cl₂/MeOH
 Révélation : Iode 24h + UV 254 nm

0,2 mL/min à 100 % MeOH

Xévo G2S Q-TOF
 Electrospray positif
 Full MS



Spectres MS de la cible en **a**, d'une impureté en **b** et du stade précédent en **c**.

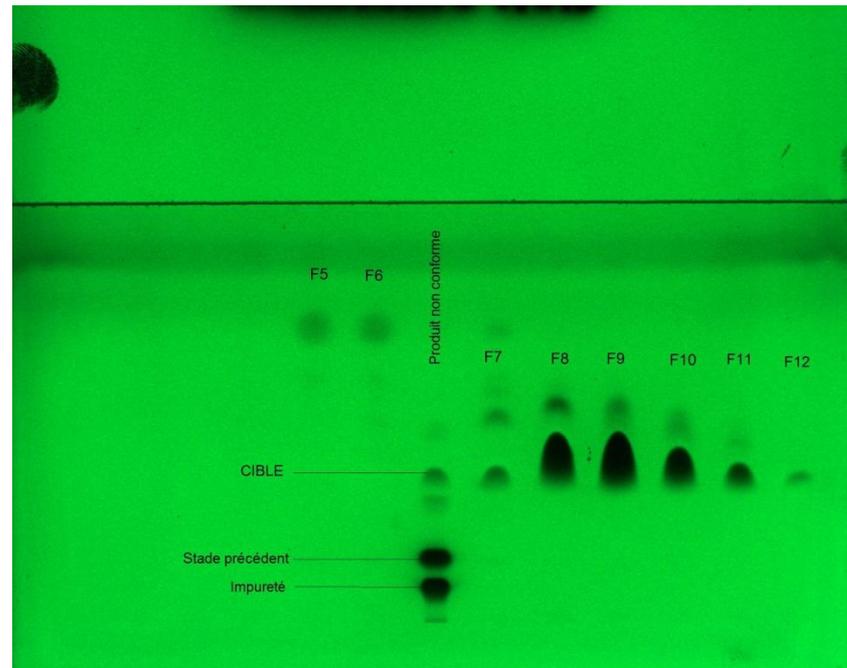
- Transposition TLC à la production sur colonne



Colonne 50 mm de diamètre



Colonne 450 mm de diamètre (Novasep)



Plaques TLC – Suivi purification

Plaque TLC Si60 F254 MERCK 10×20 cm
 5 g/L, volume : 5 μ L
 95/5 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$
 Révélation : iode 24h + UV 254 nm

- Couplage **simple** à mettre en œuvre
- L'interface est facilement **transportable**
- Non limité par les solvants de mise en solution
- Technique complémentaire à l'HPLC-MS
- Permet de ne pas isoler des impuretés déjà identifiées → **gain de temps**

- Couplages HPTLC-NMR, HPTLC-IR

Merci pour votre attention

