



Science For A Better Life

Dosage de la glycine dans Gel-crème par HPTLC : *Optimisation, validation, transfert.*

Club CCM – 19 oct 2017 / Caroline PETITTI



Agenda

- Le contexte
- La méthode de dosage et son développement
- Validation de la méthode
- Transfert vers le site de production
- Les avantages de la méthode



CH-Innovation & Development Skincare

Laboratoire de développement analytique.

Equipe de 6 personnes.

Nos principales missions :

- ⇒ Collaboration avec l'équipe formulation pour le choix des matières, des actifs à doser, réalisation de tests spécifiques...
- ⇒ Développer des méthodes pour les nouveaux actifs, les produits en développement, les nouvelles formules, optimiser les méthodes existantes
- ⇒ Valider les méthodes d'analyse selon les procédures Bayer et les réglementations internationales (ou règlement spécifiques locaux)
- ⇒ Transférer les méthodes d'analyse vers les laboratoires de contrôle des sites de production
- ⇒ Travail de maintenance sur les produits commercialisés, support aux sites

Le contexte

Pourquoi un nouveau développement analytique pour la glycine dans un gel-crème ?

Méthode existante : r-HPLC

Préparation des échantillons délicate - la séparation chromatographique difficile

- ⇒ la méthode a été difficile à développer en phase inverse (polarité élevée de la molécule). Elle a été validée et n'a pas pu être transférée sur le site de production :
- ⇒ les chromatogrammes obtenus étaient difficilement exploitables, car les profils chromatographiques n'étaient pas exactement identiques (systèmes différents)
- ⇒ La méthode n'était pas assez robuste, et les résultats étaient globalement faibles et variables.

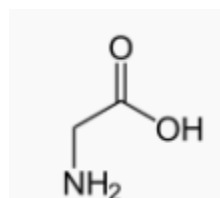
⇒ **Proposer une nouvelle technique, plus simple à transférer.**



La méthode de dosage

Dosage de la glycine dans un gel-crème à effet froid.

Glycine :



Acide aminé primaire très peu retenu en HPLC (phase inverse)

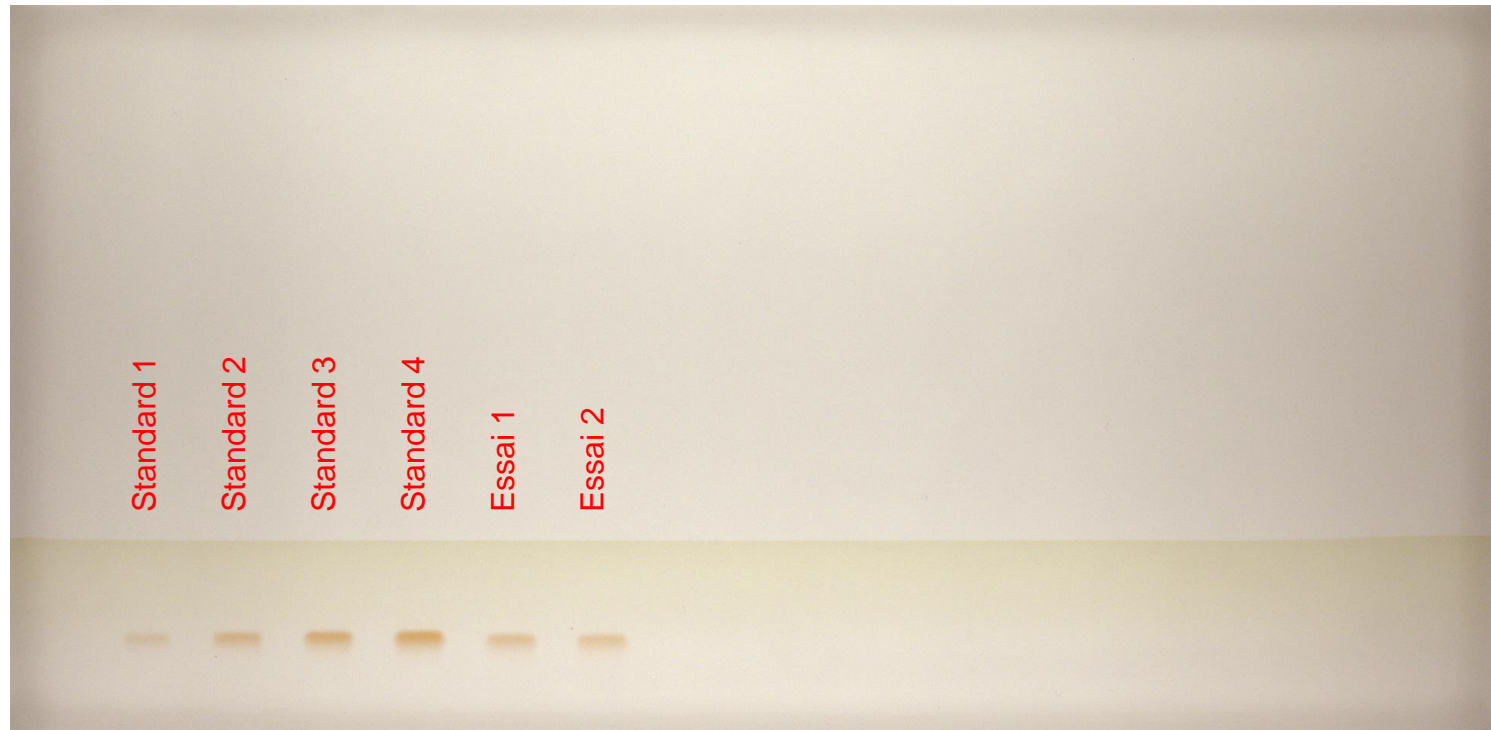
Principe : HPTLC quantitative avec dérivation à la ninhydrine

La glycine est soluble dans l'eau ou l'éthanol

Conditions chromatographiques : plaque gel de silice 60 F254 (classique)

Méthode de départ : méthode interne de dosage d'un amino-alcool

Exemple de plaque avant optimisation:



Développement de la méthode de dosage

Optimisation

- ❖ Définir un **solvant et un mode de préparation** de l'échantillon :
 - ↳ Nécessité d'un solvant organique non miscible avec l'eau ⇒ dichlorométhane ⇒ proportions optimale 10:25 afin de ne pas former d'émulsion
- ❖ **Optimisation du débit du dépôt d'échantillon**
 - ↳ Échantillon dissout dans l'eau ⇒ diminution du débit de dépôt à $50 \text{ nL}\cdot\text{s}^{-1}$ (minimum)
- ❖ **Optimisation de la taille du dépôt**
 - ↳ diminution de la quantité déposée par unité de surface : 6 mm allongés à 8mm
- ❖ **Optimisation de la phase mobile** ⇒ augmentation de la polarité
- ❖ **Optimisation de la distance de migration**
 - ↳ 1 seul spot ⇒ 2 cm de migration
- ❖ Optimisation de la taille de la fenêtre de lecture le mode de calcul



La méthode de dosage

Préparation des échantillons

Echantillon pesé précisément dans un tube à centrifuger,

↪ + 10 mL de dichlorométhane, agiter énergiquement 30 sec.

↪ + 25,0 mL d'eau purifiée, agiter énergiquement 2 minutes,

↪ centrifuger 10 min à 11000 G à 5°C

Préparation des étalons

58 mg de glycine dans 250,0 mL d'eau purifiée

↪ Gamme d'étalonnage en 5 points, réalisée par le déposeur automatique.



La méthode de dosage

Conditions chromatographiques

Plaque HPTLC Gel de Silice 60F254

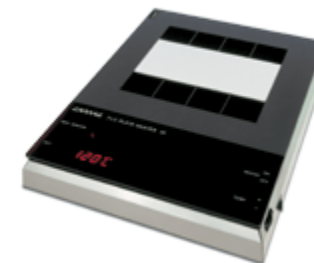
Dépôt : 2 μ L – Etalons (1,0-1,3-1,5-1,7-2,0 μ L)

Phase mobile : (70 v C₂H₅OH / 25 v H₂O / 5 v CH₃COOH) + 0.5% ninhydrine

Développement : 2 cm soit 4 minutes

Révélation : Chauffage de la plaque à 105°C

↘ Rf 0.5 (violet marron)



La méthode de dosage

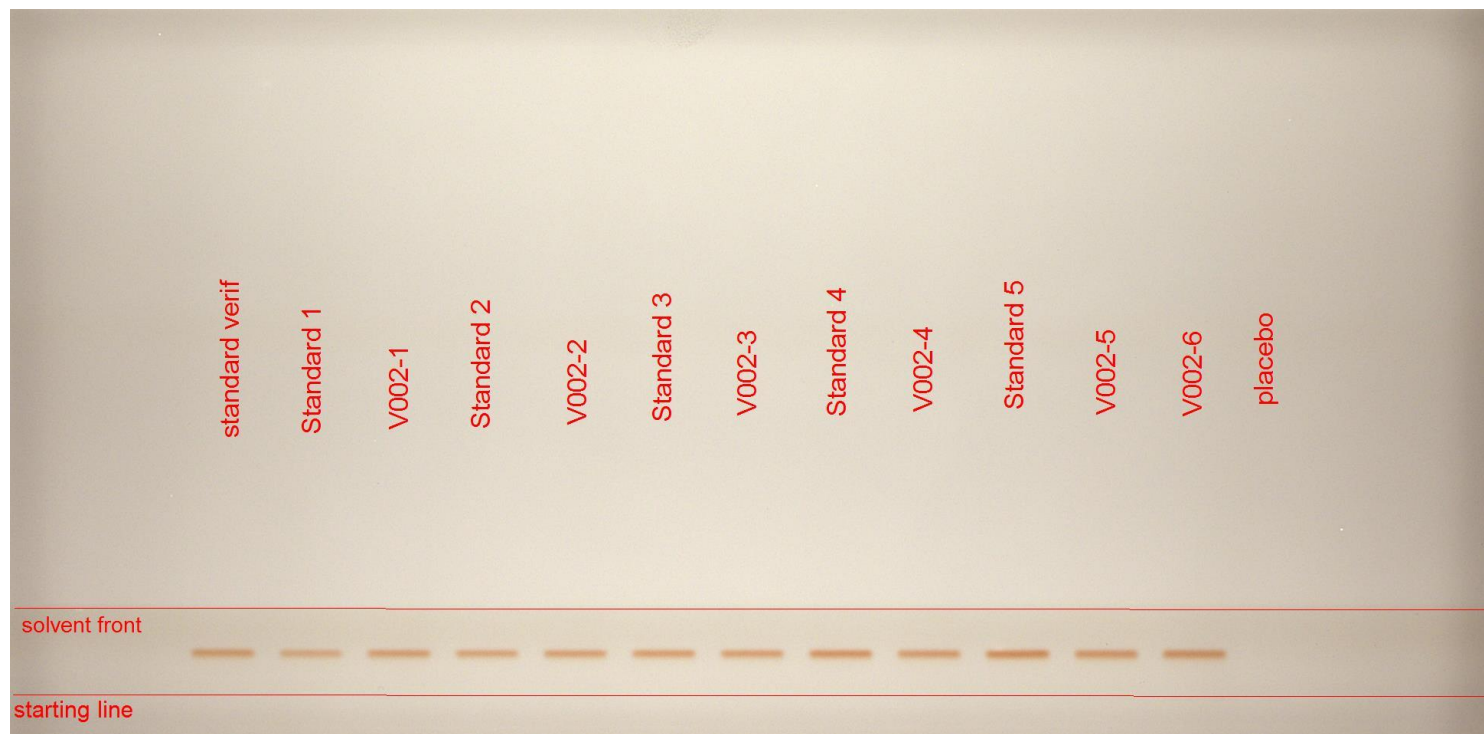
Quantification : Scanner III Camag

Longueur d'onde : 386 nm
Calcul en aire
Régression : Michaelis Menten 1



Exemple de plaque :

5 étalons + 6 échantillons + placebo

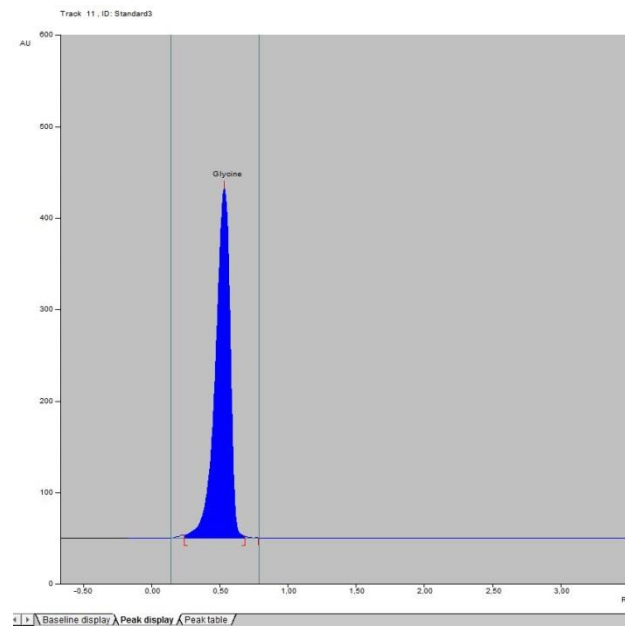
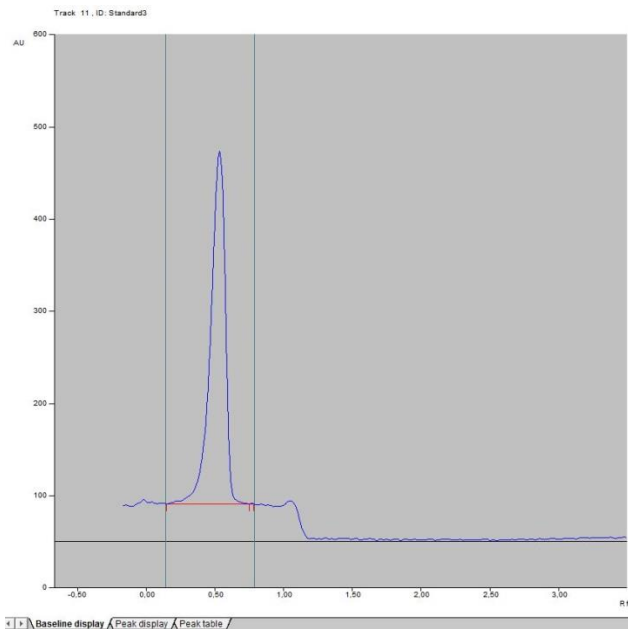


Exemple de pic

Solution standard déposée ~ 348 pg (1,5 µL de solution)



Standard chromatogram and peak display :

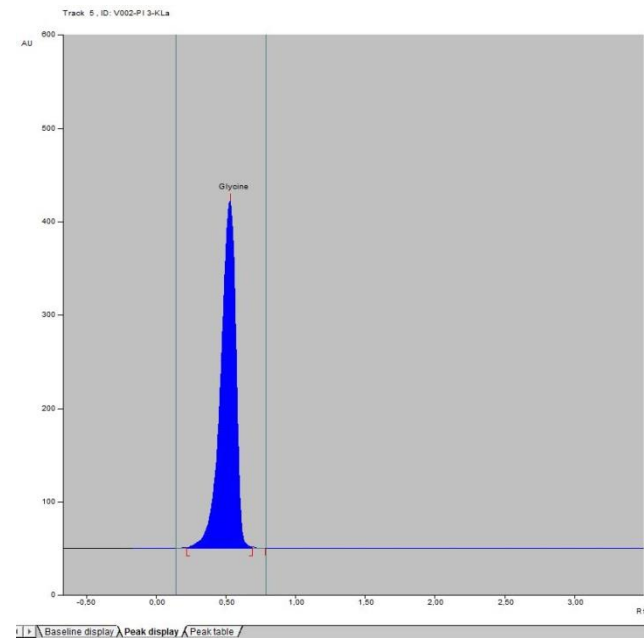
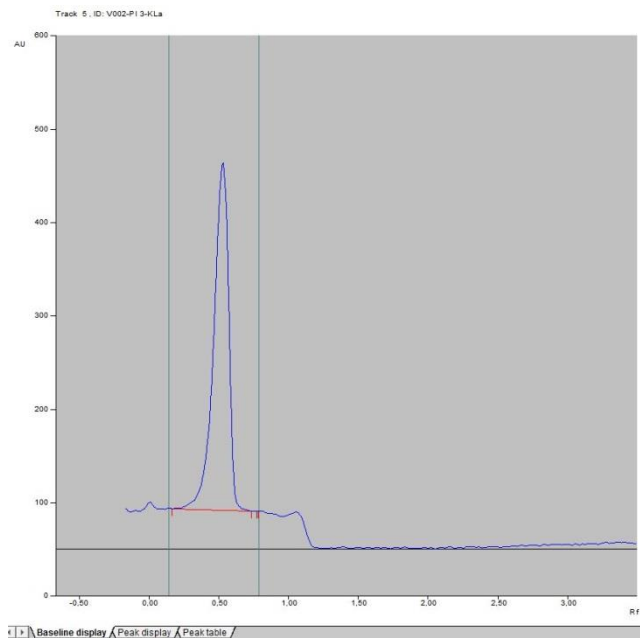


Exemple de pic

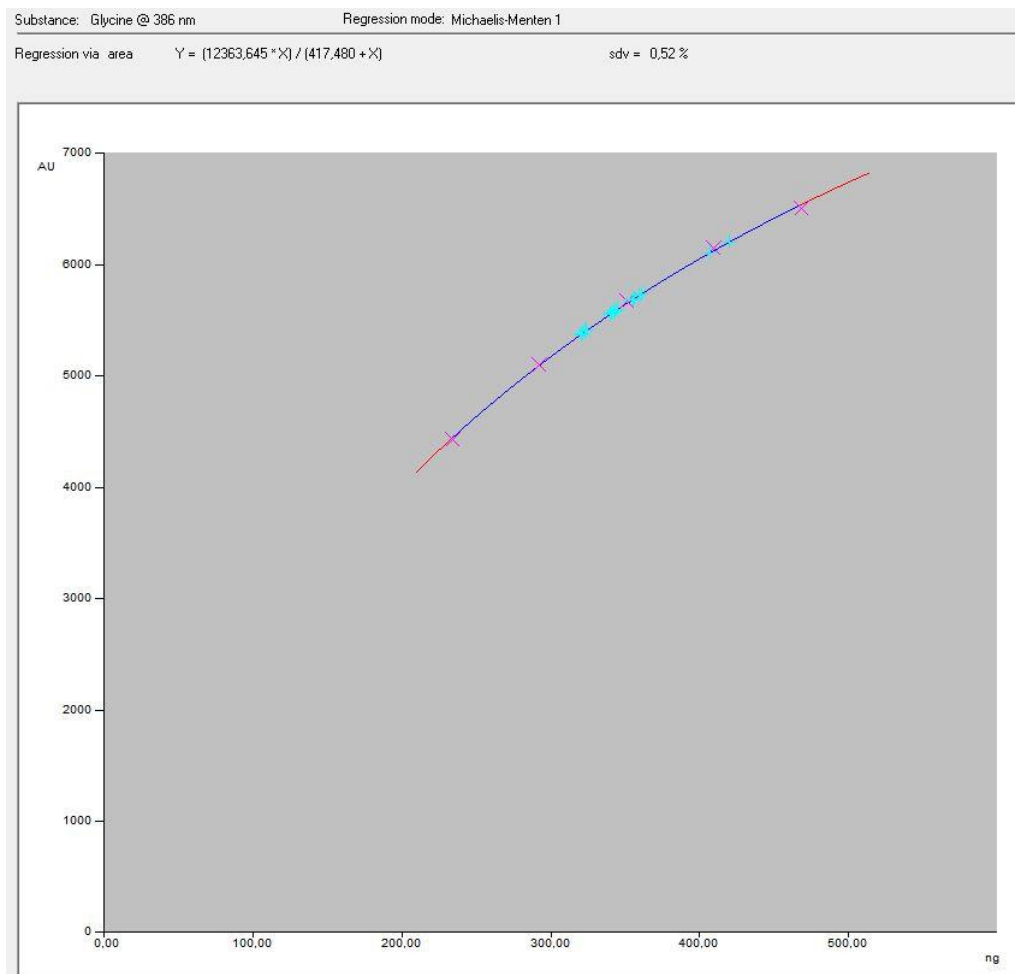
Solution essai déposée ~ 50 μg de crème (soit 350 pg de glycine)
(2 μL de solution)



Figure 4 : Sample chromatogram and peak display :



Courbe d'étalonnage





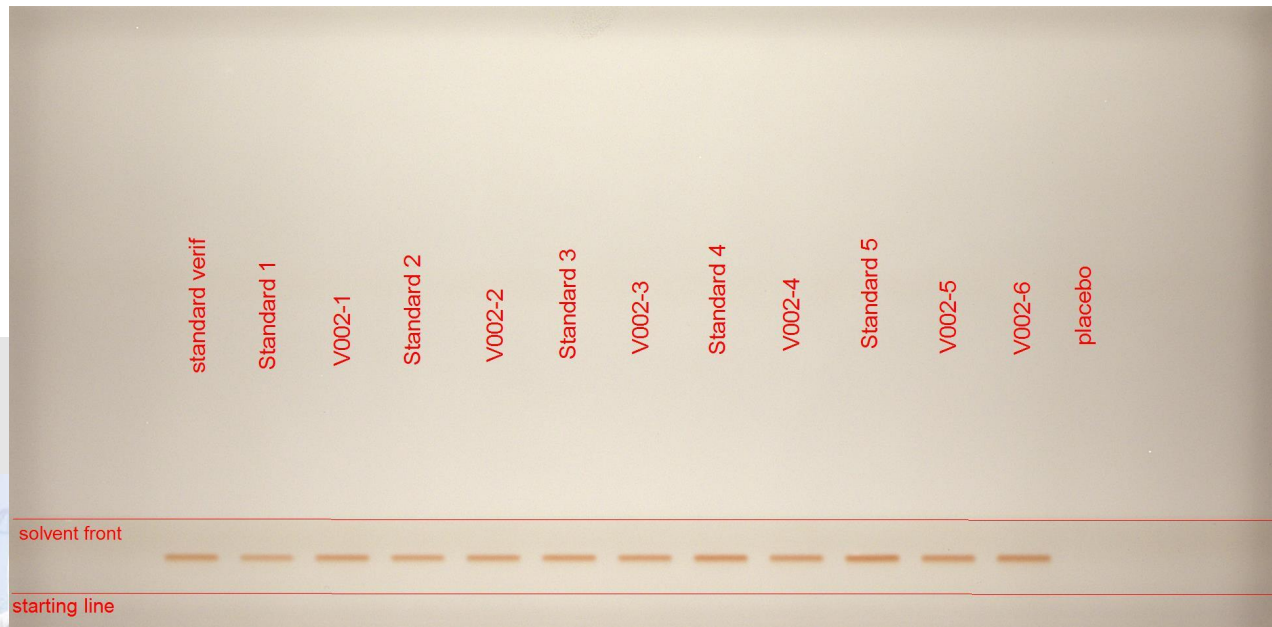
Agenda

- Le contexte
- La méthode de dosage et son développement
- **Validation de la méthode**
- Transfert vers le site de production
- Les avantages de la méthode

Validation de la méthode de dosage

Spécificité

- ↪ Préparer puis déposer un placebo selon la méthode.
- ↪ Vérifier qu'aucun spot n'apparaît



Validation de la méthode de dosage

répétabilité

Préparer 6 fois un échantillon représentatif :

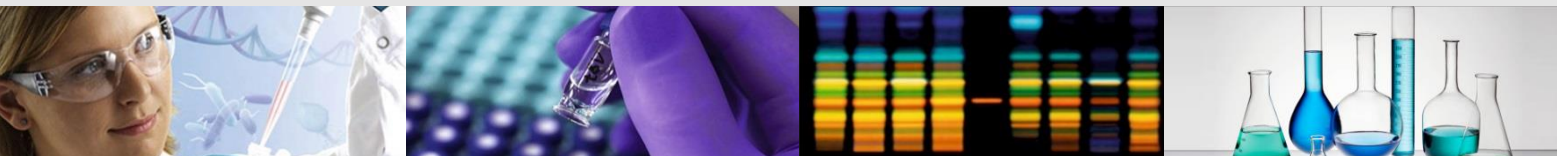
Glycine	
values [%]	
Value 1	0.674
Value 2	0.654
Value 3	0.668
Value 4	0.674
Value 5	0.684
Value 6	0.669

Repeatability Summary

Mean:		0.67 %
Repeatability standard deviation:	0.01%	
Repeatability relative standard deviation:	1.5 %	
Confidence interval of the mean (p=0.05):	0.66 to 0.68 %	

Repeatability assessment

The repeatability relative standard deviation (1.5 %) **corresponds** to the acceptance criterion ($\leq 6\%$).

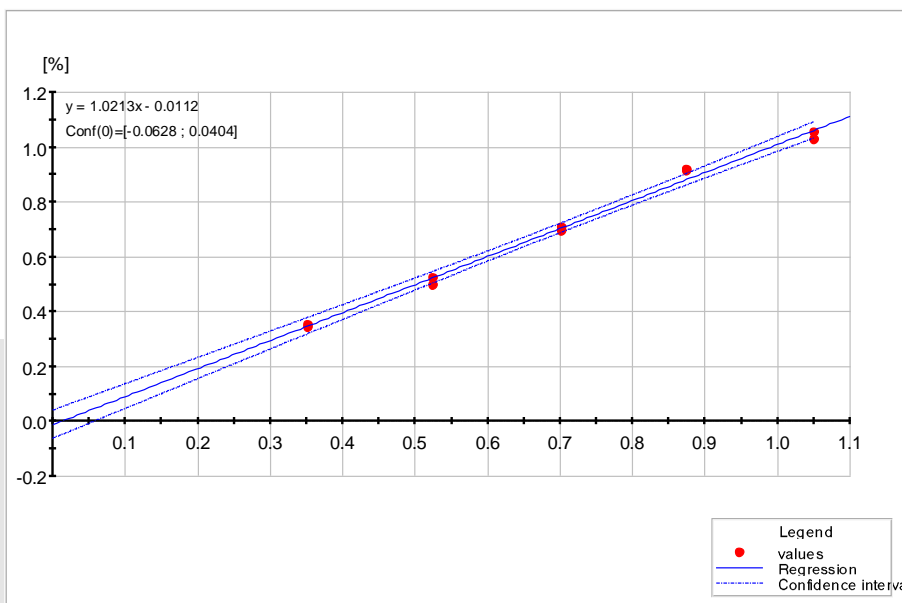


Validation de la méthode de dosage

Linéarité / Exactitude

↪ Gamme de linéarité : 50 à 150 % de la teneur en glycine dans la produit.

↪ Chaque point est préparé en double



Range: 50% to 150% of product content

Linearity Summary

Coefficient of correlation:	0.9965	
Regression line (y = b x + a):	y = 1.021 x - 0.011	
Residual sum of squares:	rss = 0	
Residual standard error:	0.0	
Confidence interval of the Y-intercept (a):	- 0.06 to + 0.04 (p = 0.05)	
Confidence interval of the slope (b):	+ 0.95 to + 1.09	(p = 0.05)
Relative intercept:	-1.6 %	

Linearity assessment

The coefficient of correlation **corresponds** to the acceptance limit (≥ 0.990).
The axial intercept **corresponds** to the acceptance limit ($|a_{rel}| \leq 6\%$).



Glycine

Recovery

Number of values : 10

	concentration	values	%
Value 1	0.351	0.355	101.1*
Value 2	0.351	0.345	98.3*
Value 3	0.524	0.500	95.4*
Value 4	0.524	0.522	99.6*
Value 5	0.702	0.708	100.9*
Value 6	0.702	0.696	99.1*
Value 7	0.874	0.914	104.6*
Value 8	0.874	0.919	105.1*
Value 9	1.051	1.028	97.8*
Value 10	1.051	1.054	100.3*

(values marked with * are rounded)

Standard deviation

Mean concentration	Mean values	Standard deviation
	0.3510	0.4
	0.5240	0.5
	0.7020	0.7
	0.8740	0.9
	1.0510	1.0
		7E-3
		2E-2
		8E-3
		4E-3
		2E-2

Accuracy Summary

Mean recovery (%):	100.2
Standard deviation of recovery (%):	3.0
Confidence interval of the mean recovery (%):	98.1 to 102.3 (p = 0.05)

Accuracy assessment

The mean recovery **corresponds** to the acceptance limits (94 to 106%)



Validation de la méthode de dosage

Précision intermédiaire

- ↪ 2 Techniciens font l'analyse d'un même lot, 2 jours différents, en réalisant chacun 6 essais et une gamme d'étalonnage.
- ↪ Les réactifs utilisés sont différents, ainsi que le lot de plaque.



Validation de la méthode de dosage

Glycine

Number of series: 2 [%]

	Serie 1	Serie 2
Value 1	0.690	0.714
Value 2	0.682	0.717
Value 3	0.658	0.686
Value 4	0.677	0.707
Value 5	0.681	0.685
Value 6	0.673	0.681
Mean value	0.68	0.70
Lower CI limit	0.67	0.68
Upper CI limit	0.69	0.72
Std.dev. s_j	0.01	0.02
CV [%]	1.6	2.3

(values marked with * are rounded)

Intermediate Precision Summary

Mean: 0.69 %
 Intermediate precision standard deviation: 0.02 %
 Intermediate precision relative standard deviation: 2.5 %
 Confidence interval of the mean ($p=0.05$): 0.68 to 0.70 %

Repeatability assessment of each serie

Serie 1: The relative standard deviation (1.6%) **corresponds** to the acceptance criterion ($\leq 6\%$).
 Serie 2: The relative standard deviation (2.3%) **corresponds** to the acceptance criterion ($\leq 6\%$).

Intermediate Precision Assessment

The Intermediate precision relative standard deviation (2.5 %) **corresponds** to the acceptance criterion ($\leq 6\%$).





Agenda

- Le groupe Bayer, notre laboratoire
- La méthode de dosage
- Validation de la méthode
- **Tranfert vers le site de production**
- Les avantages de la méthode

Transfert de la méthode de dosage

Transfert vers le laboratoire de Contrôle Qualité du futur site de production,

- ↪ Le laboratoire de développement et le laboratoire receveur analyse le même lot représentatif.
- ↪ Chaque laboratoire prépare 6 essais et 1 gamme d'étalonnage

Glycine

Number of series: 2

	QC - Grenzach Produktion GmbH	GIDC Gaillard
Value 1	0.68	0.69
Value 2	0.67	0.66
Value 3	0.70	0.69
Value 4	0.69	0.66
Value 5	0.69	0.69
Value 6	0.68	0.69
Mean value	1	1
Std.dev. s_j	1.048809E-2	1.549193E-2
CV [%]	1.5	2.3

(values marked with * are rounded)



Transfert de la méthode de dosage

Comparison Summary

	QC - <u>Grenzach Produktion GmbH</u>	CH I&D <u>personal care Dev. Center - France</u>
Mean (% (m/m)):	1	1
Standard deviation (% (m/m)):	0.0105	0.0155
Relative standard deviation (%):	1.5	2.3
Variances:	0.00011	0.00024
Standard deviation of all values (% (m/m)):	0.0	
Combined variances:	0.000166	
Comparison of variances:	2	
<u>Fmax</u> :	5	
Difference of means:	0.7	

Comparison assessment

The **difference of the mean values corresponds** (0.7 %) with the limits defined in the Protocol ($\leq 10\%$)
 According to the test for homogeneity of variances, the **variances of the two-series** show that there is **no significant difference**





Agenda

- Le groupe Bayer, notre laboratoire
- La méthode de dosage
- Validation de la méthode
- Transfert vers le site de production
- Les avantages de la méthode

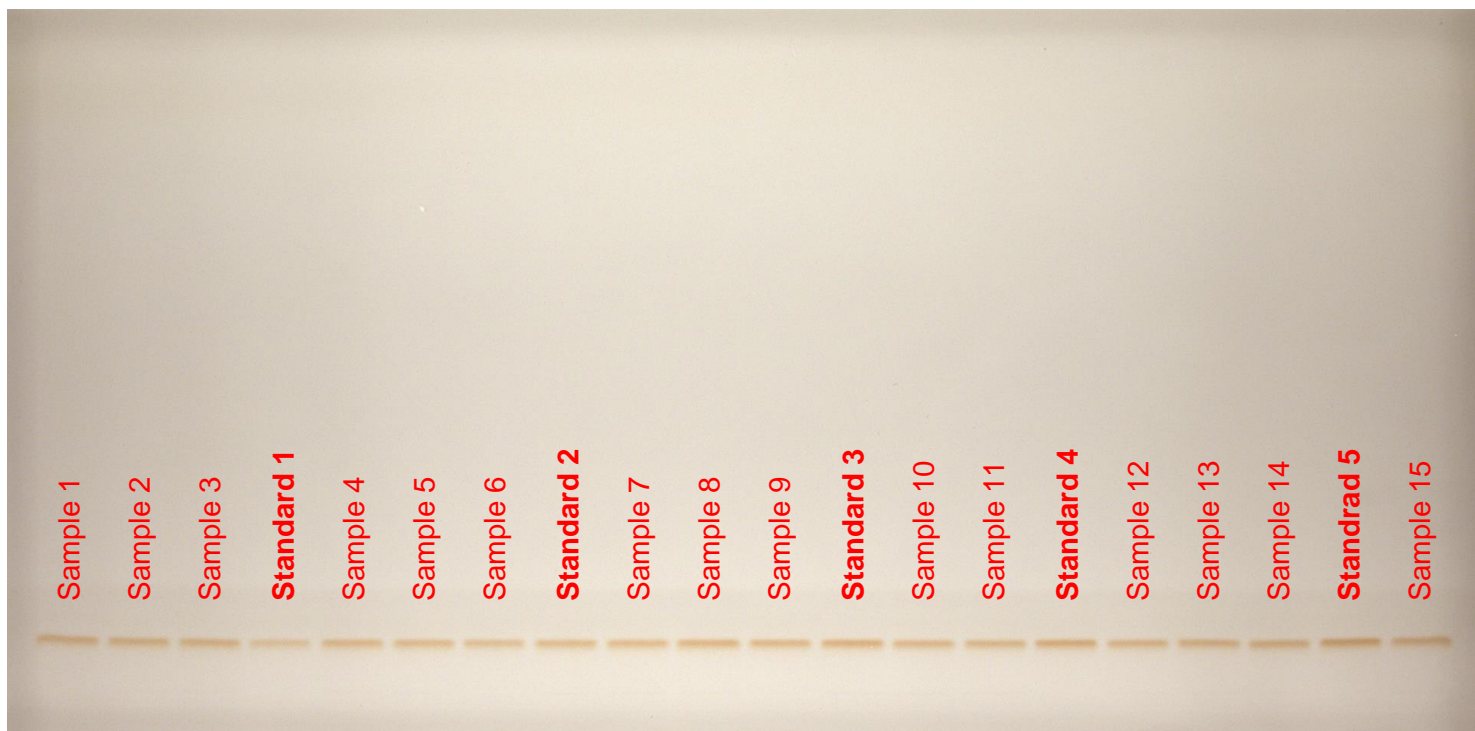
Les avantages de la méthode



Mise en oeuvre facile & faible coût

- ↪ Préparation des échantillons simple et rapide
- ↪ Le solvant de migration contient le révélateur :
 - homogénéité permettant la quantification
 - Pas d'étape de pulvérisation
- ↪ Faible consommation de solvant – faible coût des plaques (comparé aux colonnes HPLC)
– Pas de pollution du système
- ↪ Rapidité du calcul et de l'édition du rapport (automatique)

Les avantages de la méthode : rapidité : 15 échantillons sur une même plaque :





Science For A Better Life

MERCI A TOUS POUR VOTRE ATTENTION