



Mise au point de méthodes par HPTLC

- application à l'identification de principes actifs
- application à la recherche d'impuretés mutagènes

18-19 Octobre 2017

Caroline DRON, Sandrine CARISTAN

Introduction

20 ans de promotion de la technique au sein du service analyse

Impact majeur du club de CCM par le partage des expériences

- intra-entreprises, universités,
- Journées du club depuis 1998
- Symposiums internationaux

Travail sur l'évolution des consciences et la fin des idées reçues comme :

- la CCM est archaïque ! NON
- la CCM n'est pas quantitative ! NON
- la CCM ne peut pas remplacer l'HPLC ! NON mais

Travail réalisé pendant un stage de 3 mois (licence biochimie)
Découverte complète de la technique (connaissance scolaire)
Utilisation de la majorité des nombreux appareillages présents sur
Montpellier



Présentation du laboratoire

Notre matériel



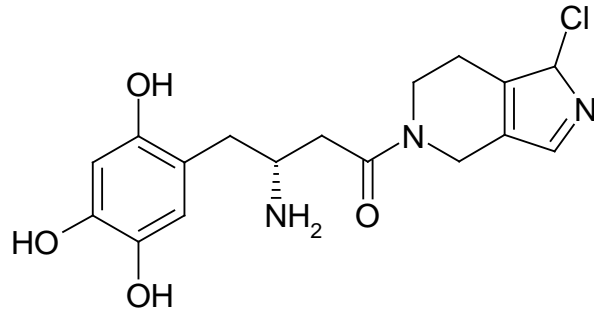
Mise au point de méthode pour l'identification de principes actifs

Mise au point de méthode pour l'identification de principes actifs

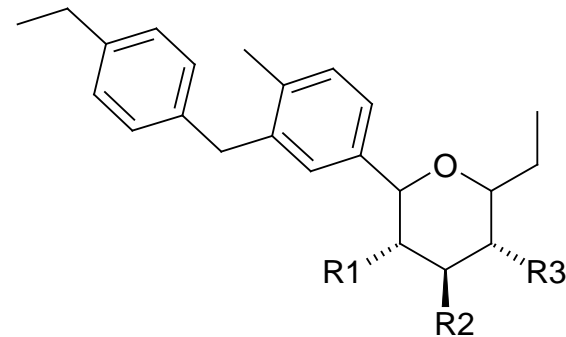
Développement d'un combo de 2 principes actifs (comprimés – 2 dosages)

Nécessité d'avoir deux méthodes d'identification dans la monographie

- Identification par HPLC
- Identification par chromatographie sur couche mince haute performance HPTLC (méthode orthogonale)



Molécule I

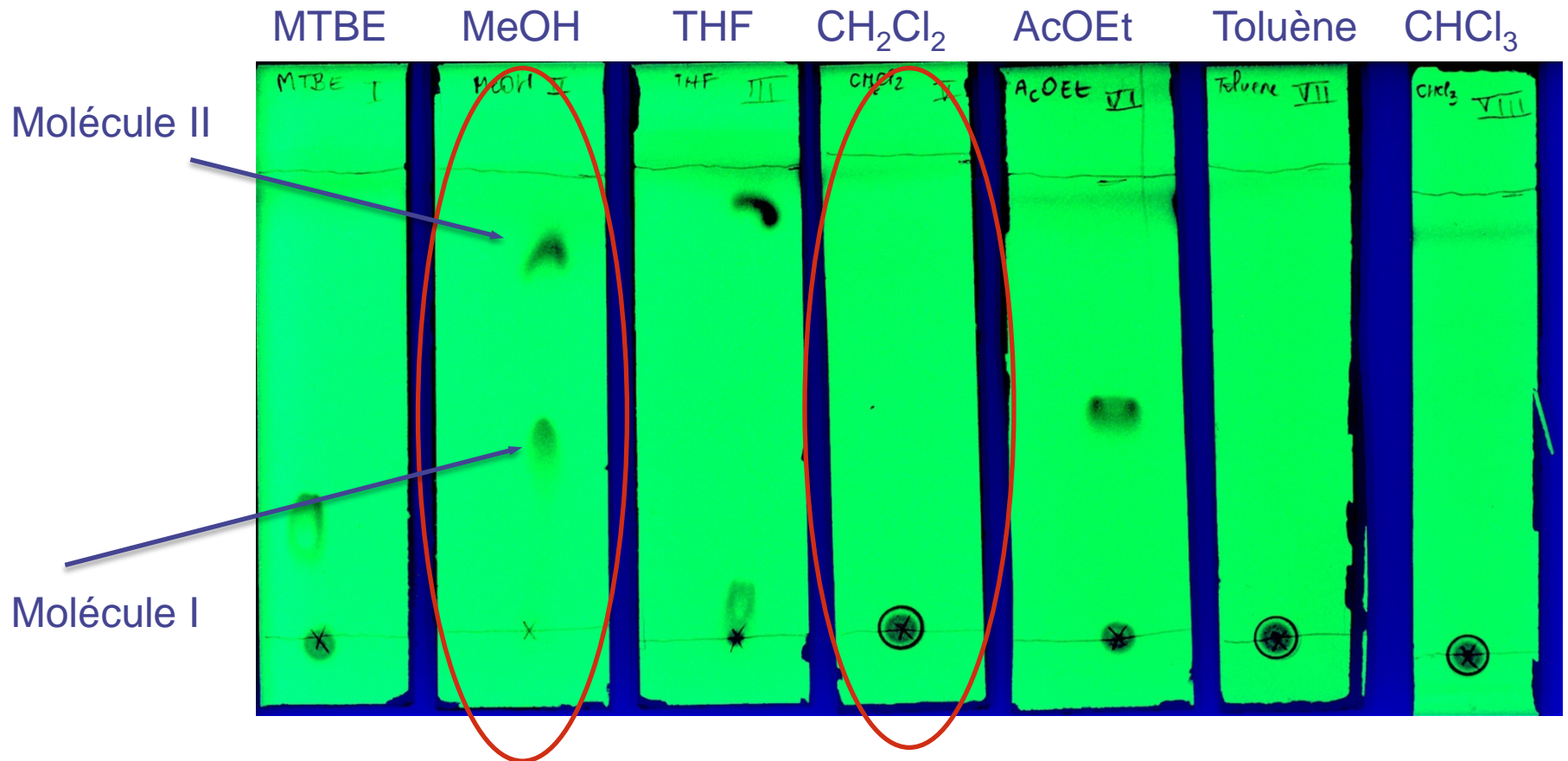


Molécule II

2 molécules de polarités différentes

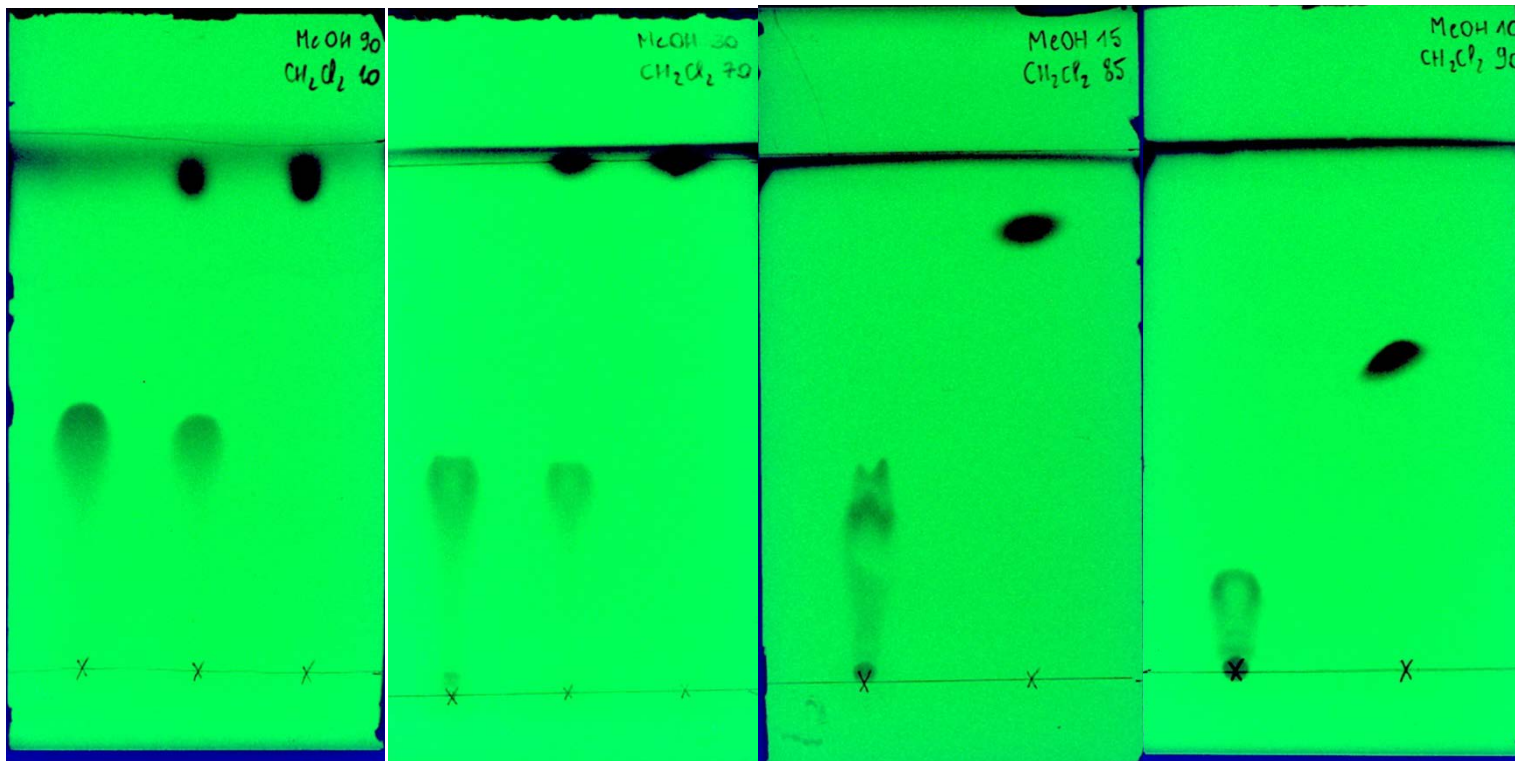
Mise au point de méthode pour l'identification de principes actifs

Mise au point selon méthode triangle de Snyder



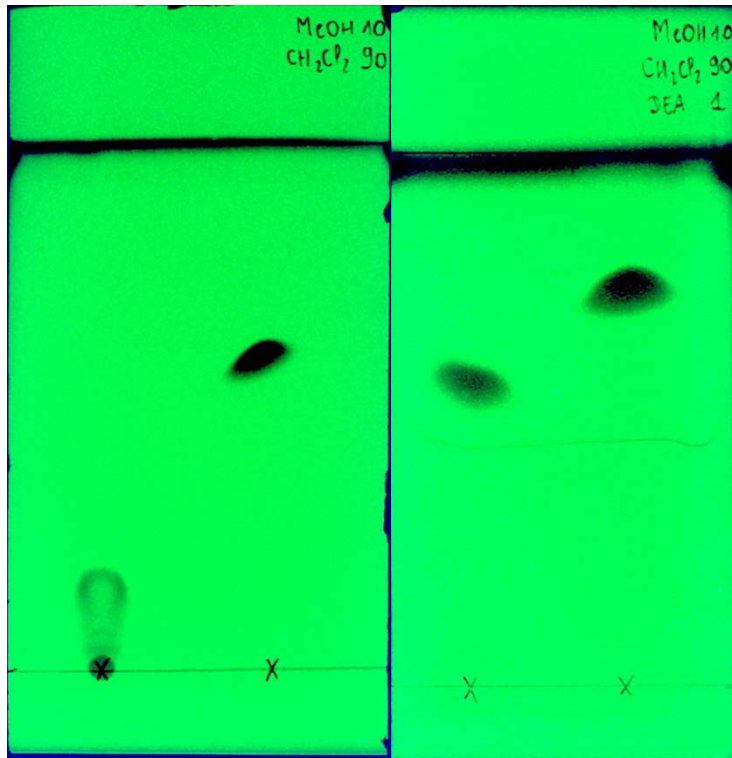
Mise au point de méthode pour l'identification de principes actifs

Optimisation par mélanges successifs



Mise au point de méthode pour l'identification de principes actifs

Ajout modifiant Diéthylamine pour amélioration trainée molécule I (amine)



La molécule I est mieux focalisée

Séparation des deux principes actifs

Passage sur HPTLC pour optimisation des Rf (Rf optimal 0,3 ~ 0,4)

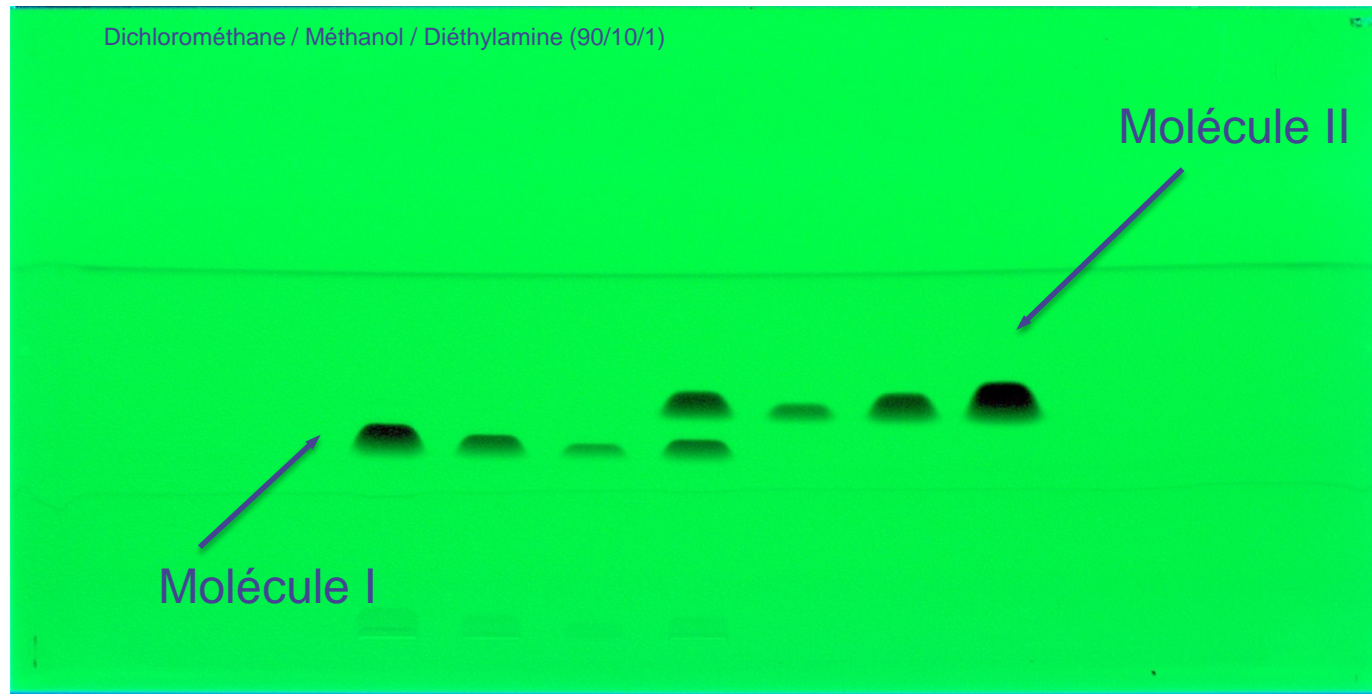
Concentration de travail
saturation de la cuve
pré conditionnement de la plaque

Mise au point de méthode pour l'identification de principes actifs

Pas de conditions particulières en terme de saturation ou préconditionnement

La séparation est correcte, Rf un peu élevé

Essais sur la concentration de travail pour chaque molécule
(2 solutions à analyser pour chaque constituant du comprimé)

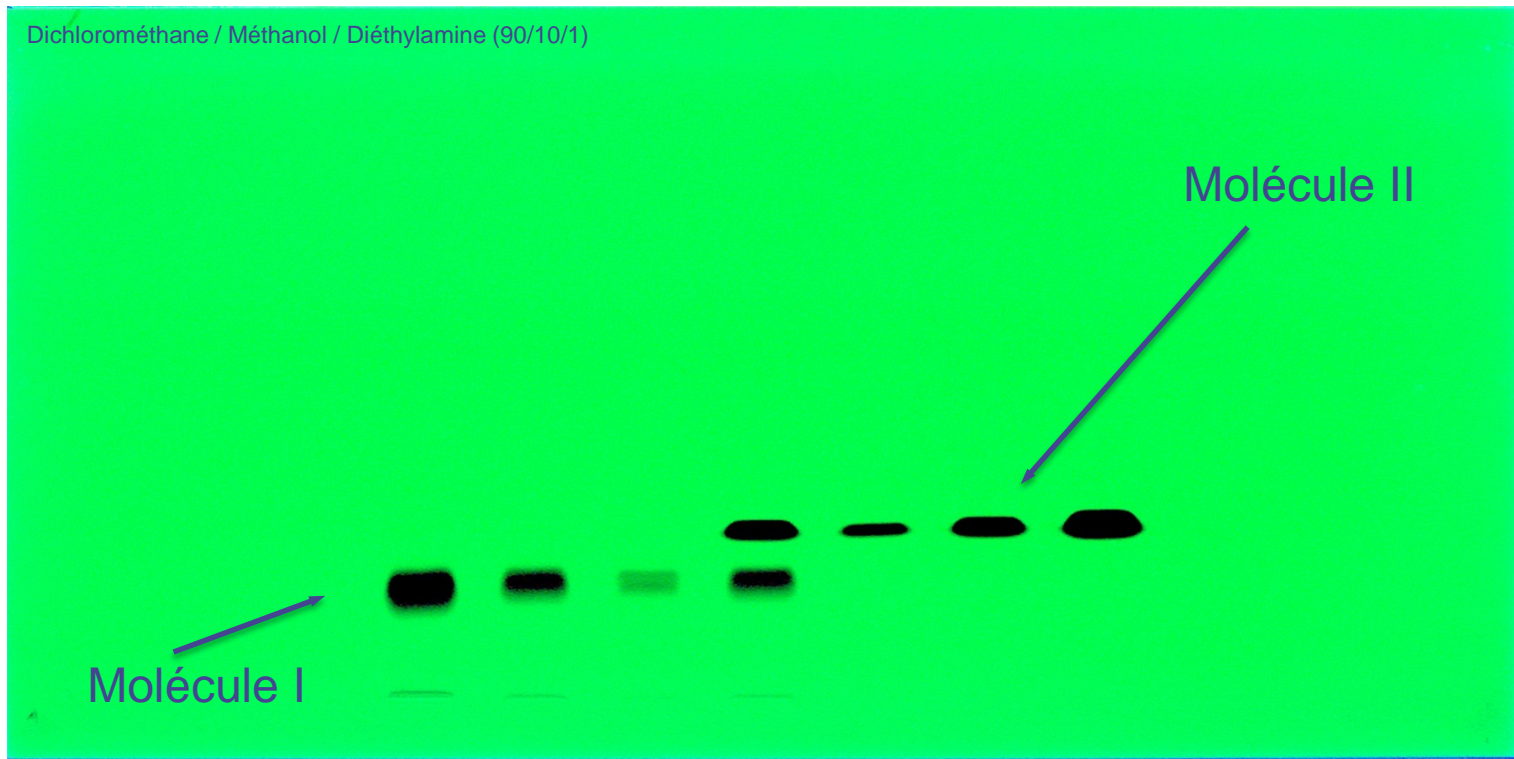


Mise au point de méthode pour l'identification de principes actifs

Essai avec saturation de la cuve

La saturation de la cuve permet la baisse relative des Rf

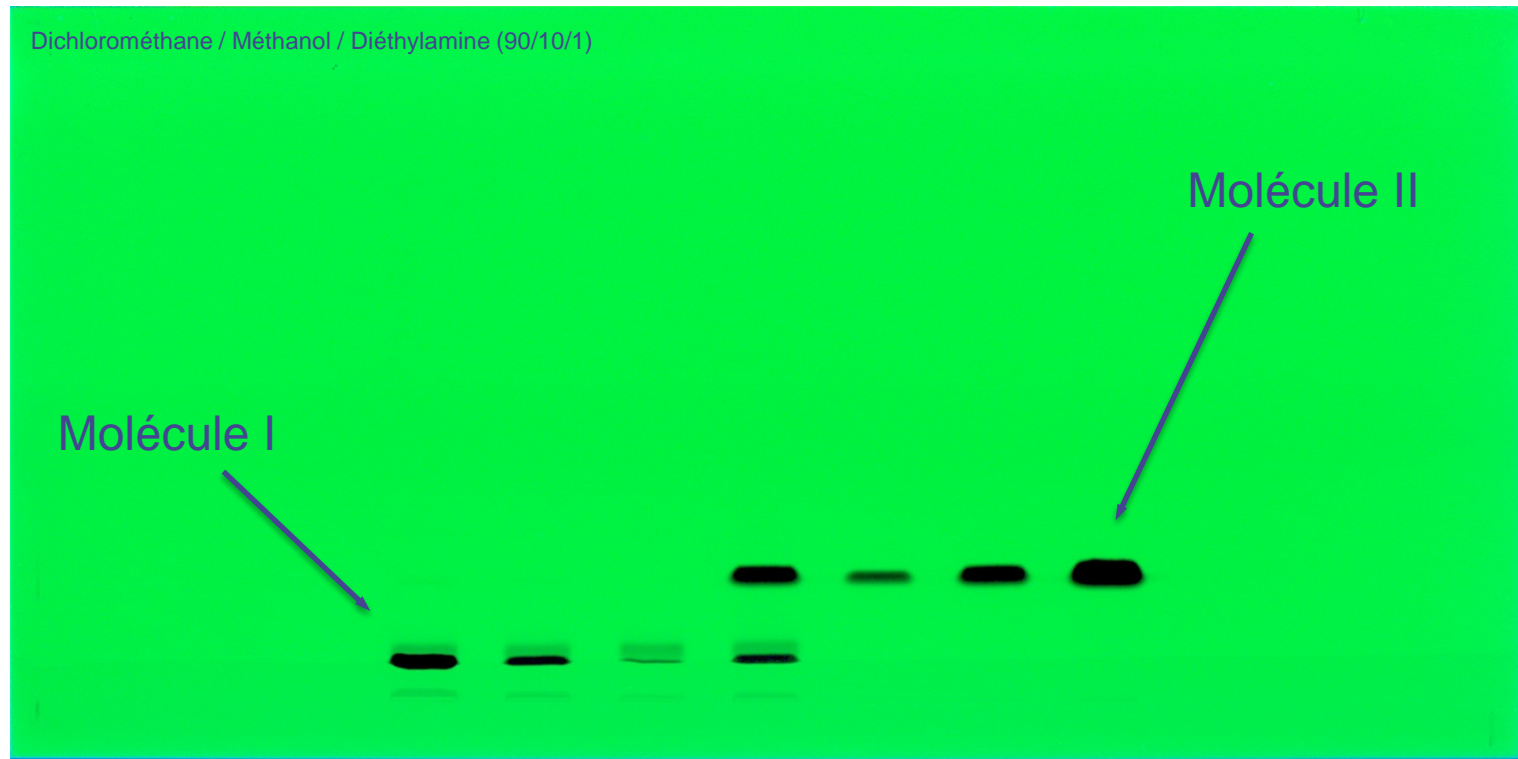
Rf est aux alentours de 0,4



Mise au point de méthode pour l'identification de principes actifs

Essai avec saturation de la cuve et préconditionnement de la plaque
La présence de DEA dans le solvant ralentit la migration de la molécule I

On conserve donc uniquement la saturation de la cuve

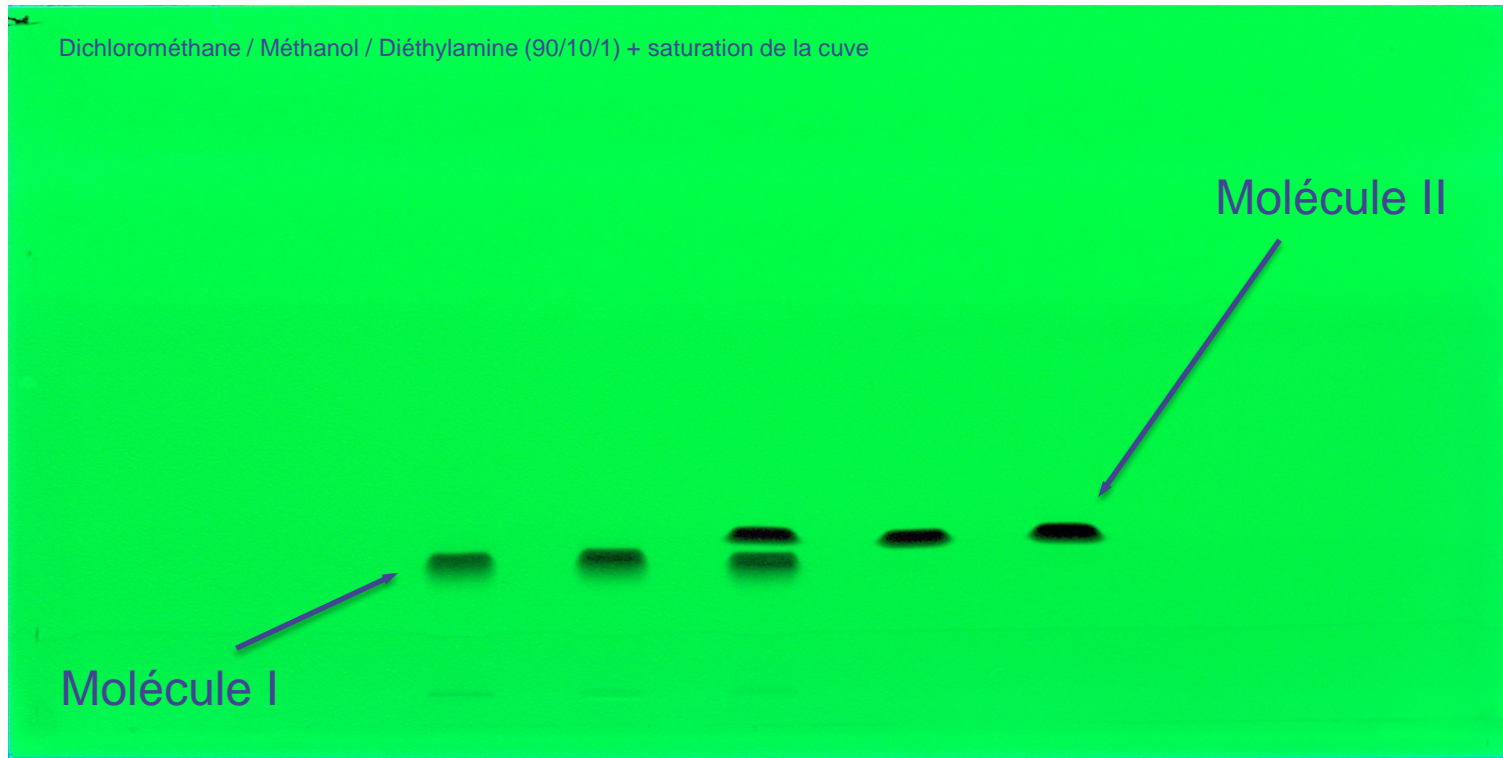


Mise au point de méthode pour l'identification de principes actifs

Essai de robustesse en variant l'humidité relative

Essai sans maîtrise de l'humidité : **75 % HR**

La séparation reste correcte, mais moins performante

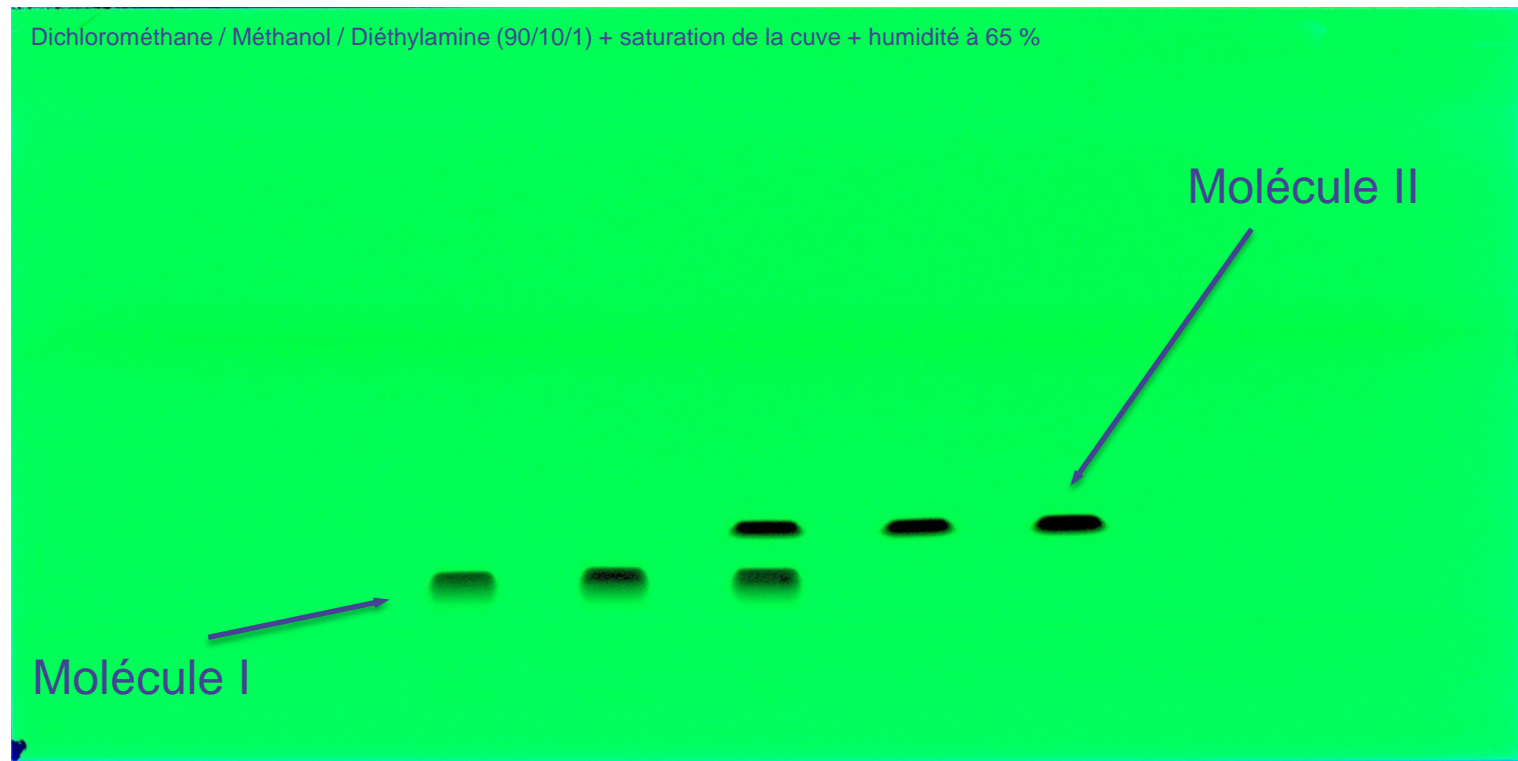


Mise au point de méthode pour l'identification de principes actifs

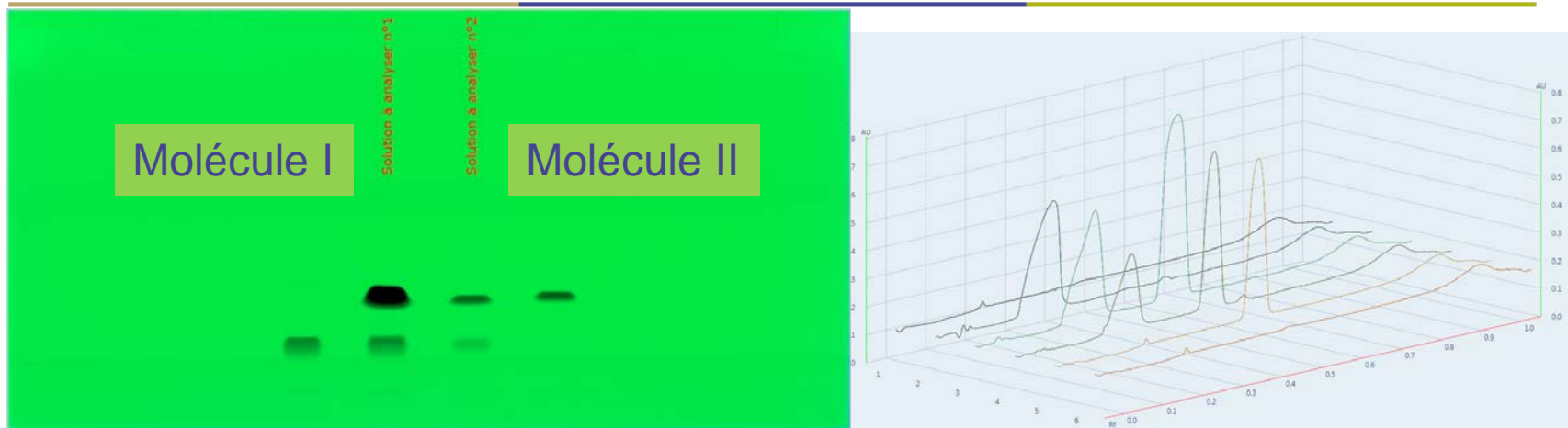
Essai de robustesse en variant l'humidité relative

Essai avec maîtrise de l'humidité : 65% HR (NaNO_2 saturé)

La séparation est bien meilleure, La méthode est figée



Conditions finales de la méthode d'identification



Prélavage de la plaque à l'isopropanol

Eluant Dichlorométhane / Méthanol / Diéthylamine (90/10/1)

Saturation de la cuve avant migration pendant 20 minutes

Contrôle de l'humidité relative à 65 % (NaNO₂ saturé)

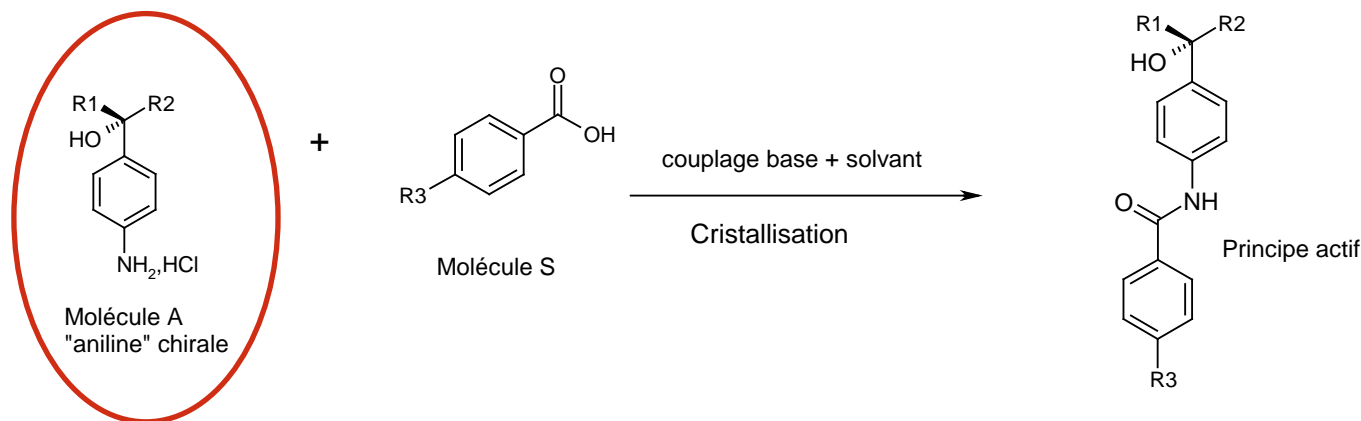
Révélation sous UV 254 nm (Photo + scanner 3)

Méthode d'identification efficace sur les 2 dosages prévus des comprimés

Mise au point de méthode pour l'analyse de traces d'impureté mutagène

Mise au point de méthode pour l'analyse de traces d'impureté mutagène

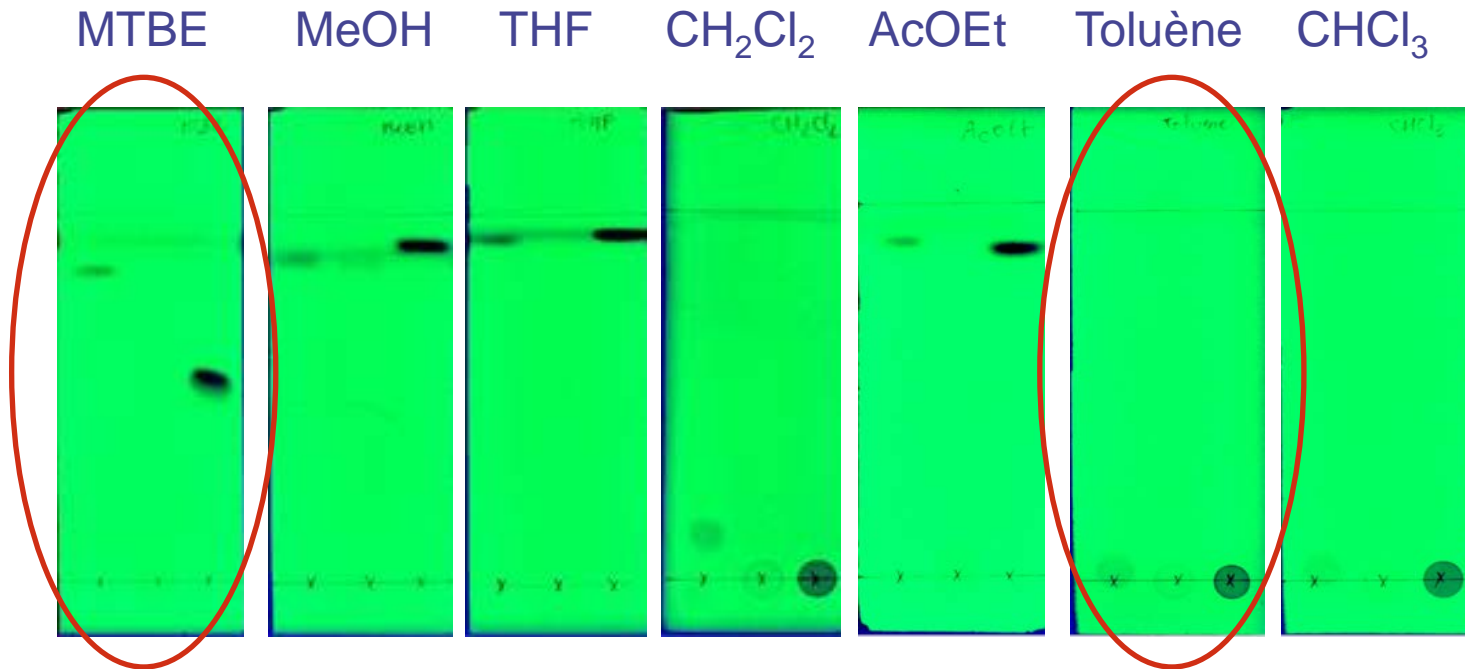
Couplage final pour l'obtention d'un principe actif



Problème d'absorption UV de « l'aniline » - limite de détection médiocre en HPLC
Potentiellement mutagène, nécessité de détecter ce produit au moins à 0,05 % dans le principe actif.

Mise au point de méthode pour l'analyse de traces d'impureté mutagène

Mise au point selon méthode triangle de snyder



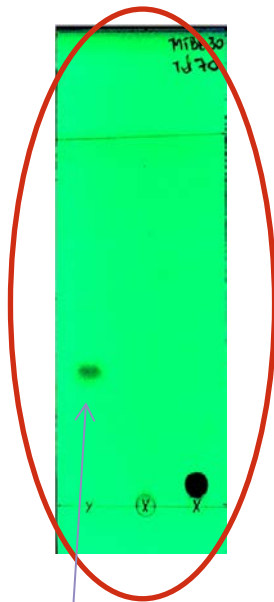
Mise au point de méthode pour l'analyse de traces d'impureté mutagène

Passage aux mélanges de solvants / optimisation du Rf

MTBE/Tol
20/80

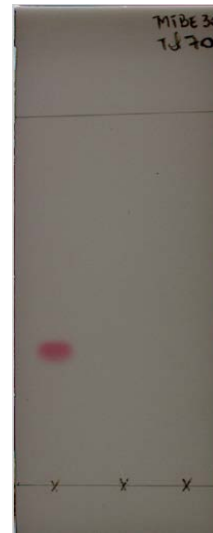


MTBE/Tol
30/70



Rf ~ 0.4

Recherche de révélation alternative



Ninhydrine



Dragendorff



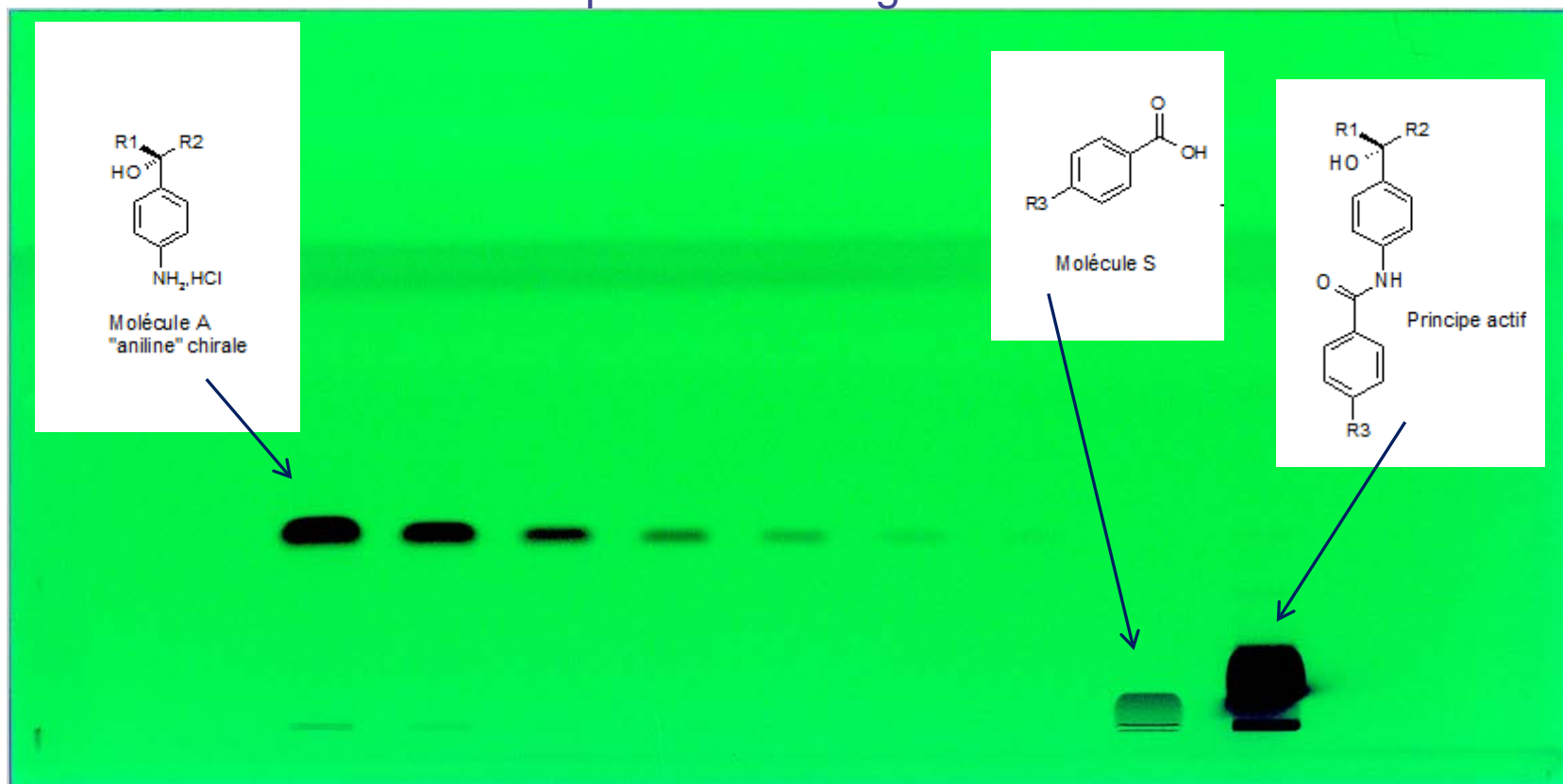
Acide phosphomolybdique

Mise au point de méthode pour l'analyse de traces d'impureté mutagène

Détermination de la gamme en « aniline » de 0.05 à 5 %

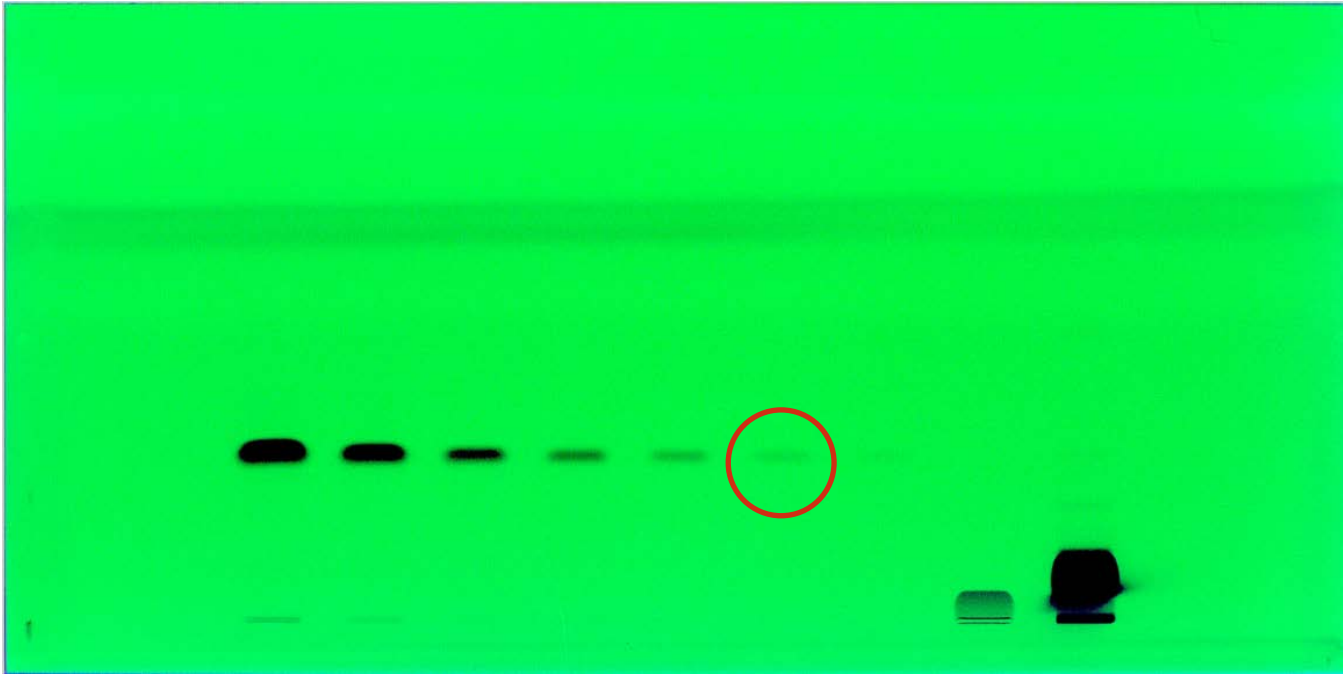
Positionnement des intermédiaires réactionnels

Pas d'interaction des composés avec la gamme de la molécule A



Mise au point de méthode pour l'analyse de traces d'impureté mutagène

UV 254 nm : Visibilité du dépôt à 0.1 % (0.05 % légèrement visible)



Mise au point de méthode pour l'analyse de traces d'impureté mutagène

Ninhydrine : Visibilité du dépôt à 0.2 %



Mise au point de méthode pour l'analyse de traces d'impureté mutagène

UV 366 nm : Visibilité du dépôt à 0.1 % (0.05 % légèrement visible)



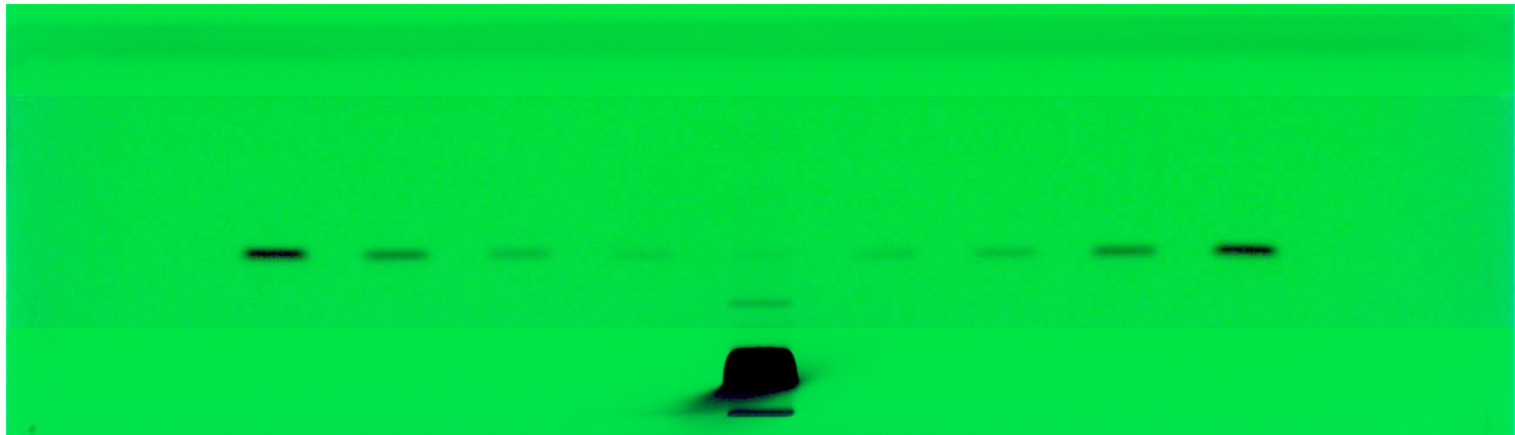
Finalisation de la méthode

Réduction de la gamme de 0.5 à 0.05 %

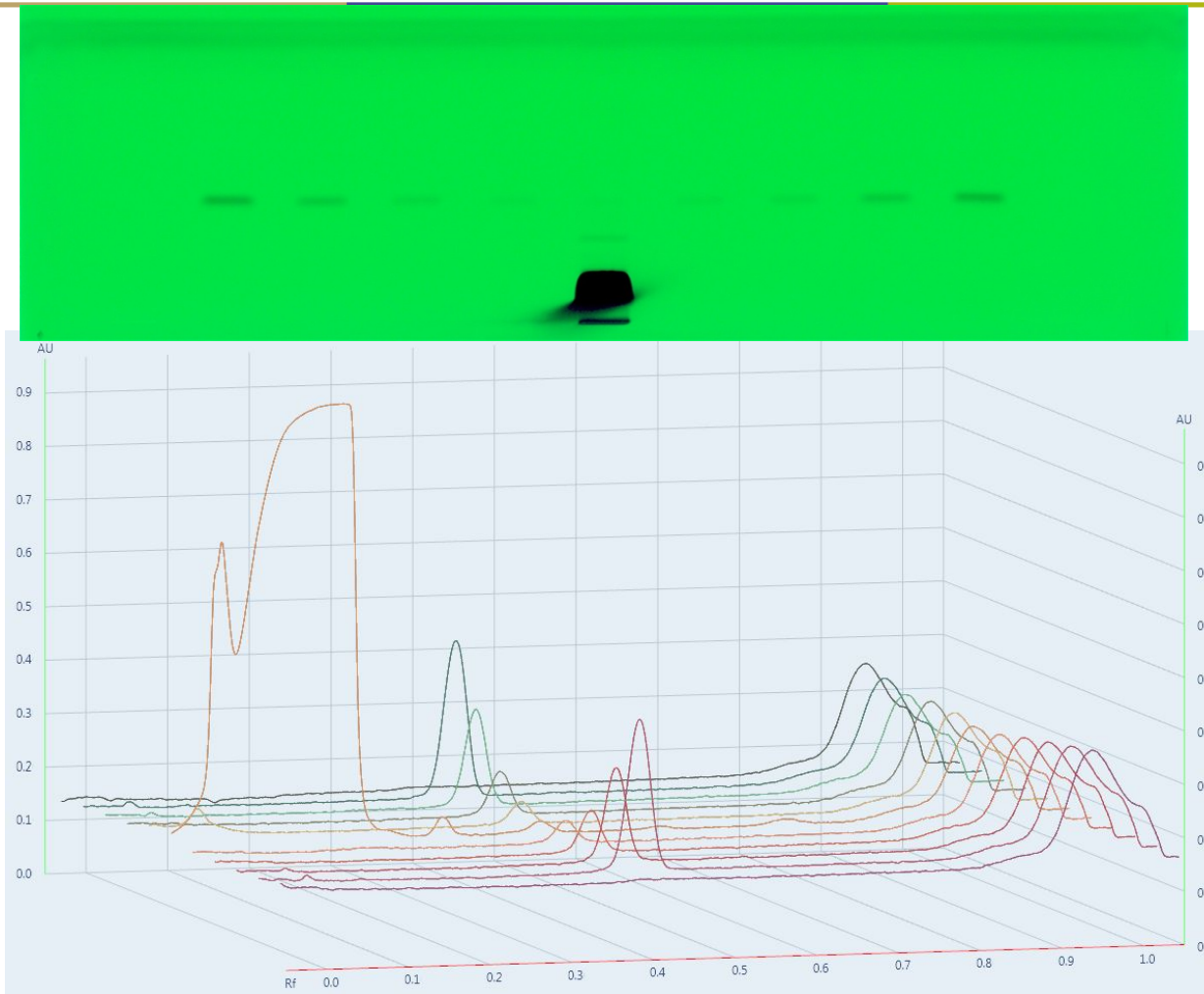
Gamme dupliquée de part et d'autre de la substance à analyser

Optimisation de la quantification par détection au scanner ($\lambda = 240 \text{ nm}$)

Augmentation du contraste – visibilité du dépôt à 0.05 %

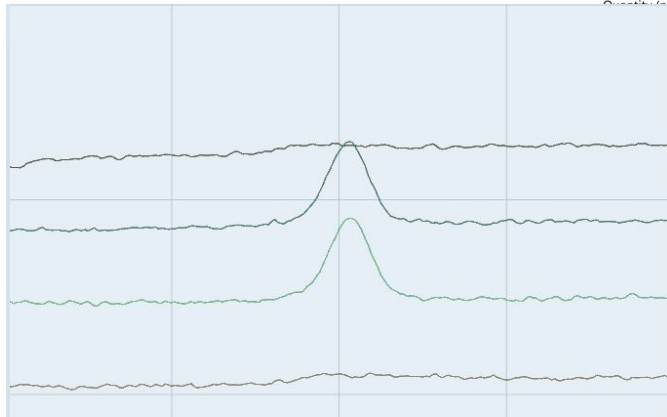
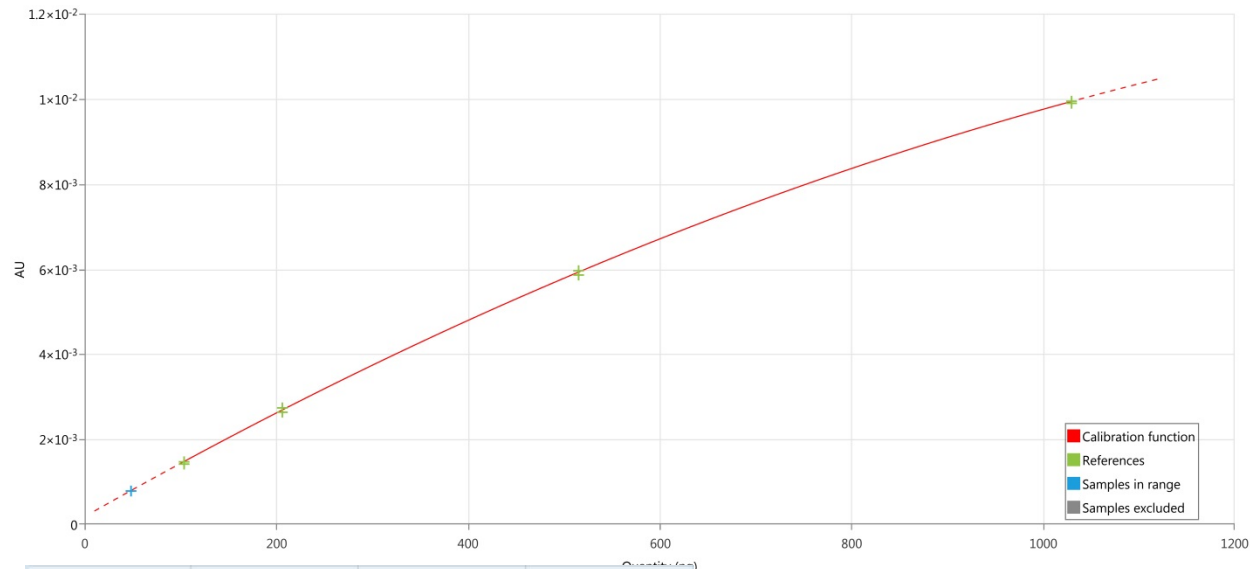


Finalisation de la méthode Scanner à 240 nm



Finalisation de la méthode

Courbe de calibration de 0.5 à 0.05 %



Estimation de la limite de quantification
Calcul du Signal/Bruit

S/N >> 10 pour une LOQ à 0.05 %

Méthode finale

Phase stationnaire :	HPTLC Si 60 F ₂₅₄ 20 x 10 cm (Merck, ref. 1.05642)
Prélavage de la plaque	Propanol-2 migration 80 mm minimum séchage 120°C pdt 10 min
Dépôts	en spray - bandes de 8 mm (vitesse 50 nl/s)
Solvant de migration	MTBE / Toluène (30/70)
Migration	Cuve ADC2 sans saturation de la plaque et sans contrôle de l'humidité relative
Distance de migration	60 mm environ
Séchage	Sous courant d'air froid 5 minutes
Détection avant dérivation	UV 240nm + 254nm (Scanner 3 + Vizualizer)
Dérivation (Derivatizer nozzle bleue V3)	pulvérisez la plaque dans la solution de ninhydrine, séchage 105 °C pendant 3 minutes
Détection après dérivation	Lampe blanche et UV 366 nm



Dernières optimisations

Vérification du recouvrement par surcharge dans le principe actif



> 97 % de recouvrement

Diminution de la LOQ en déposant 10 µl et 20 µl de la solution à analyser

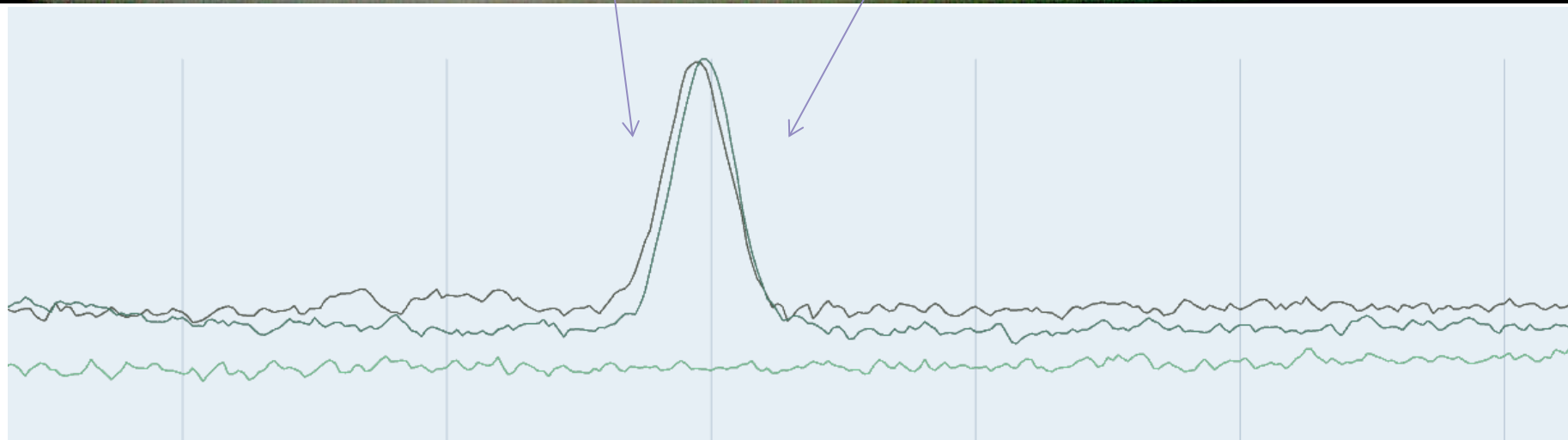
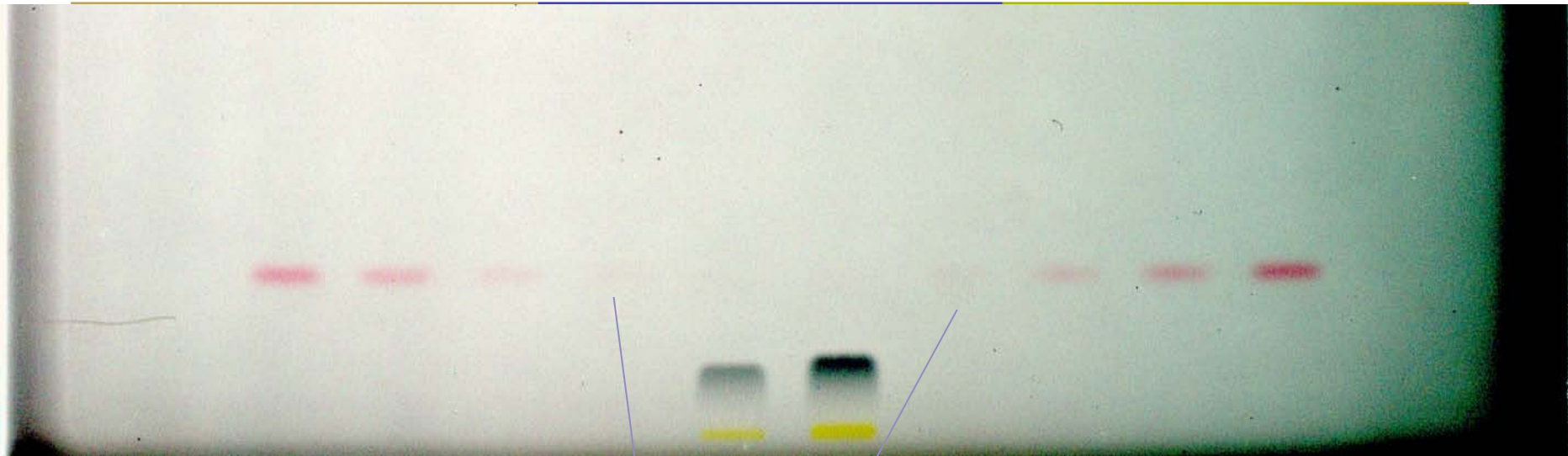
Vérification de la LOQ par calcul du S/N sur les dépôts à 0.05 %

LOQ théorique 0.05 % pour un dépôt à 10 µl
 0.025 % pour un dépôt à 20 µl

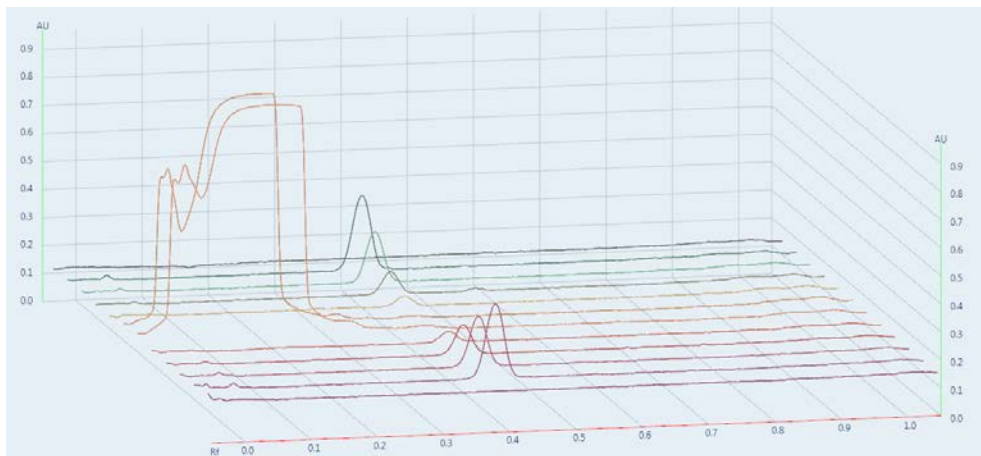
LOD théorique 0.02 % pour un dépôt à 10 µl
 0.01 % pour un dépôt à 20 µl



Analyse du premier lot certifié



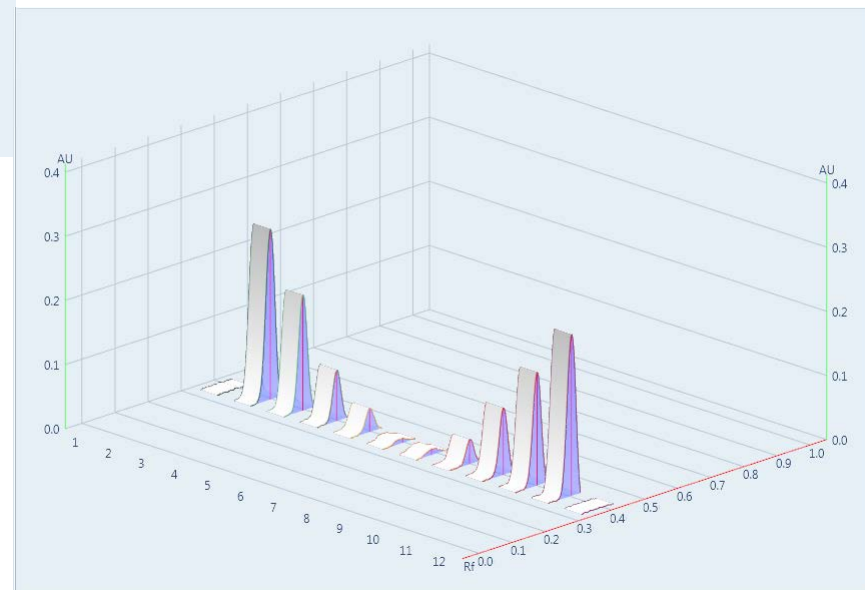
Analyse du premier lot certifié



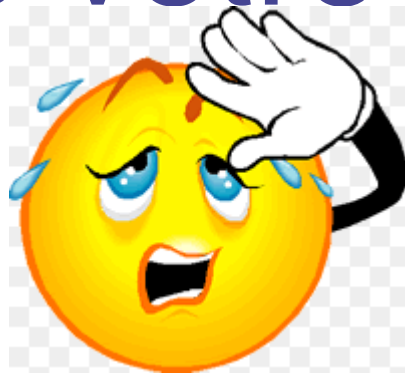
Teneur résiduelle en « aniline »

 < 0.02 %

(Estimation selon la courbe de calibration ~ 0.014 %)



Merci de votre attention



Questions?

