



## Mise au point d'une méthode par HPTLC Dosage d'une huile de garniture dans un lot GMP de principe actif pharmaceutique

Journées du Club CCM  
20<sup>ème</sup> Anniversaire  
27-28 Juin 2018

Sylvie VIGNE

# Evolution des compétences analytiques d'un chimiste de synthèse

1990-  
2000

2000-2010

2010 →

Analyse de référence au labo

→ CCM

Appui du service analytique

→ HPLC / UPLC  
GC

+  
Labo  
→ CCM

Prise en charge des IPC\* au labo

→ HPLC  
→ LC/MS  
→ Système CAMAG

\*IPC = In Process Control



# Présentation de l'équipement CCM du laboratoire

**ATS4**



Dépôt de l'échantillon automatique sous azote

**ADC2**



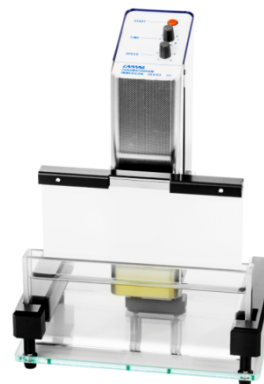
Développement automatisé (isocratique) de la plaque

**VISUALIZER**



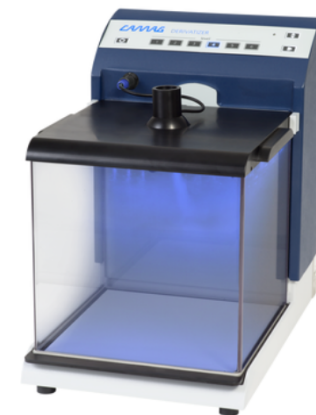
Capture des images  
Traçabilité

**CUVE**



Cuve à immersion automatisée

**DERIVATIZER**



Cuve à pulvérisation



# Premiers pas vers la CCM quantitative

## ➤ Projet développé en 2015

### ➤ Objectif

- ❖ Suivi réactionnel et quantification sur plusieurs étapes de synthèse à partir d'un macrolide (poids moléculaire >1000g/mol) (collaboration avec Sandrine Caristan et son équipe)

## ➤ Projet développé en 2016

### ➤ Objectif

- ❖ Développement d'une méthode pour suivi IPC d'une étape de fabrication (pas de chromophore sur la formation d'une urée).

## ➤ Projet développé en 2017

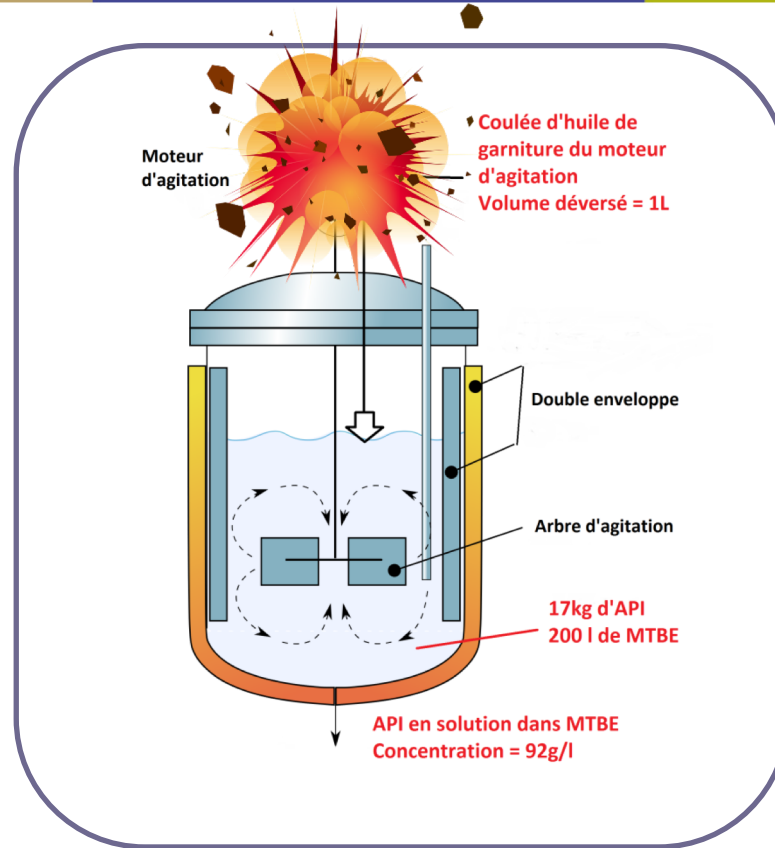
### ➤ Objectif

- ❖ Développement d'une méthode pour quantifier la pollution due à une coulée d'huile de garniture (problème mécanique) dans la synthèse GMP d'un API



# Projet 2017

## Faits



Teneur en huile potentielle dans l'API = 6%

# Projet 2017

## Analyse de l'API pollué

1

- Pureté > 99%
- Teneur = 99%

HPLC

2

RMN

- Spectre compatible

3

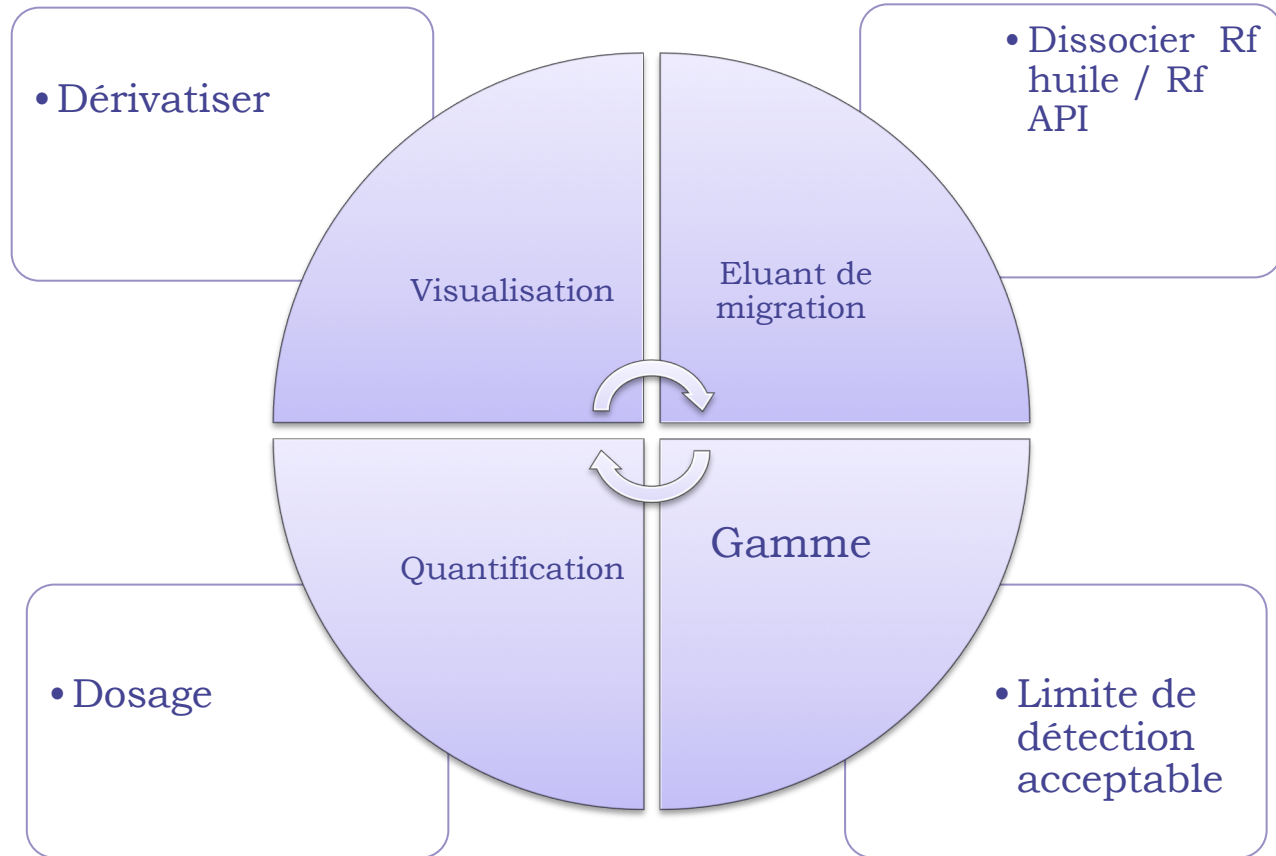
- Pas de détection UV de l'huile en LC ou
- % inférieur à 5% de l'huile en RMN

→ Pas de détection et donc pas de quantification possible de la pollution

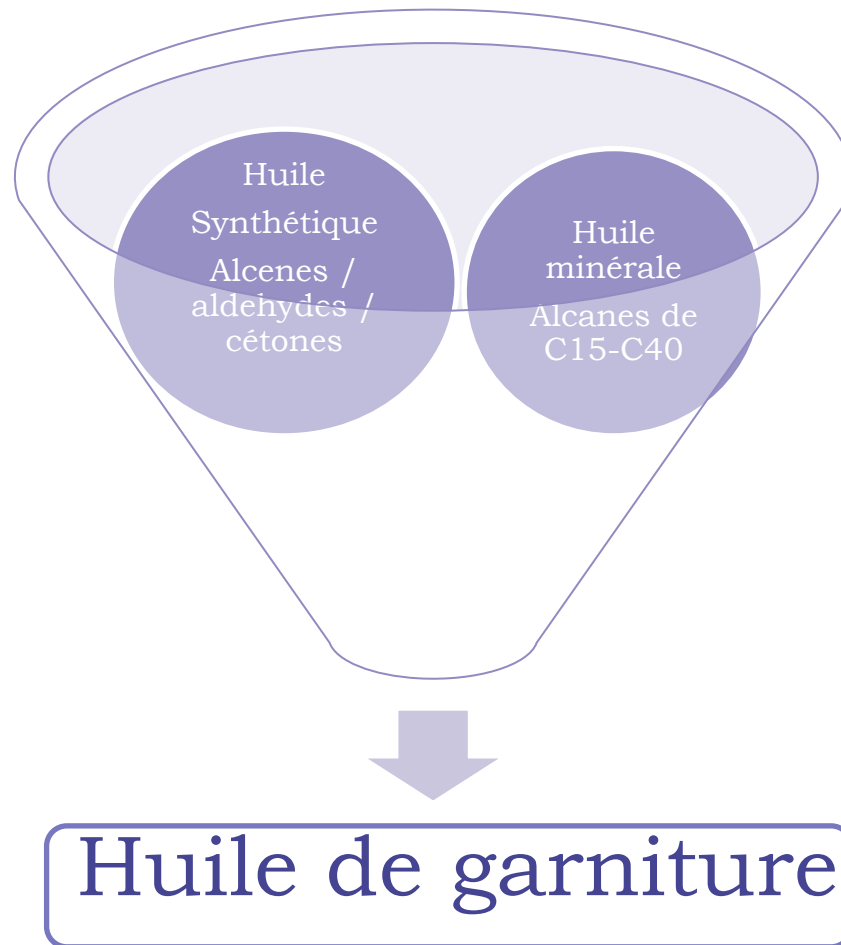
Autre analyse ?



# Et pourquoi pas l'HPTLC !!!

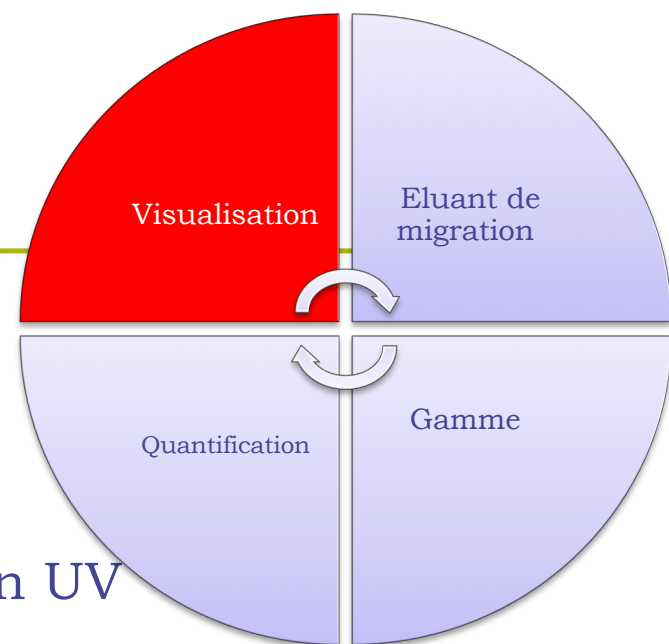


# Composition de l'huile de garniture





# Visualisation



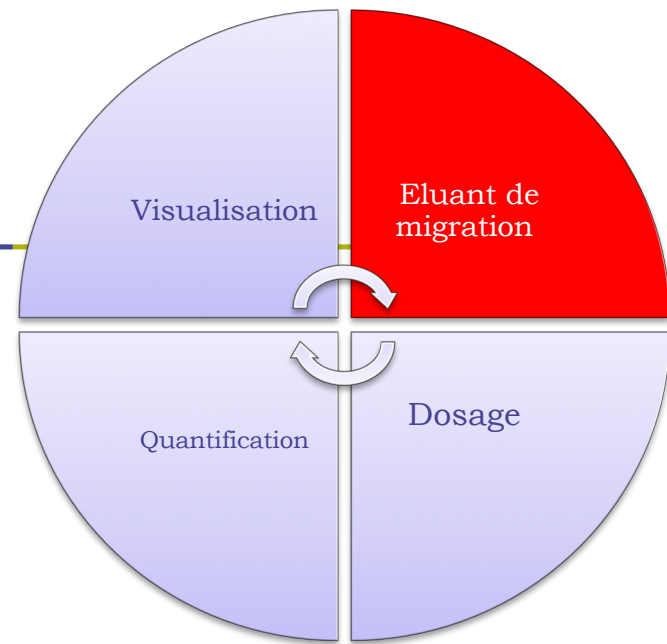
➤ Les composants de l'huile n'absorbent pas en UV

➔ nécessité d'utiliser un mode de dérivation

- ❖ Acide phosphomolybdique
  - Solution utilisée en immersion puis chauffage
  - Oxydation des différentes substances
  - Visualisation à la lumière blanche
  
- ❖ Primuline
  - Solution utilisée en immersion
  - Visualisation en fluorescence à 366nm



# Solvant de migration



➤ Essai 1:

Hexane / AcOEt 75/25

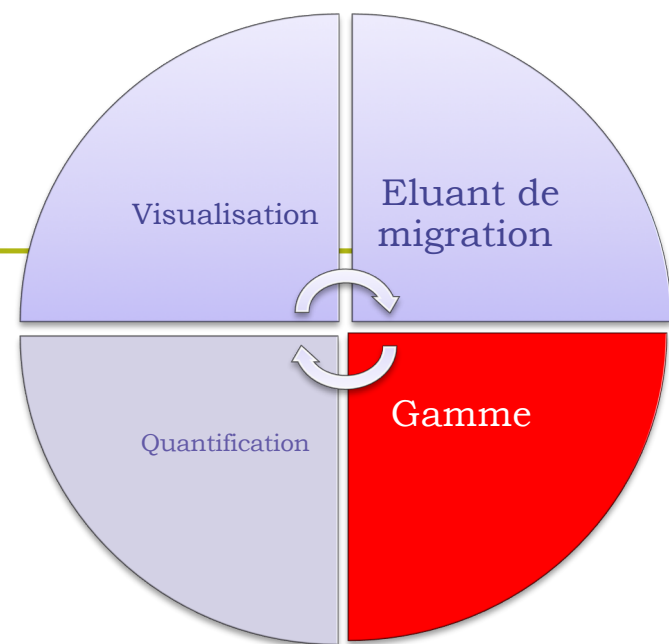
- ➔ Rf huile = front de solvant
- ➔ Rf API = 0.2

➤ Essai 2:

Hexane

- ➔ Rf huile = 0.96
- ➔ Rf API = 0

# Etablissement d'une gamme



- Préparation de la solution d'huile de garniture

**Solution à 0.1mg/ml**

- ➔ Dissoudre 100 $\mu$ l = 93,5mg d'huile de garniture dans 1000 ml de CHCl<sub>3</sub>

- Préparation de la solution de l'API brut

**Solution à 10mg/ml**

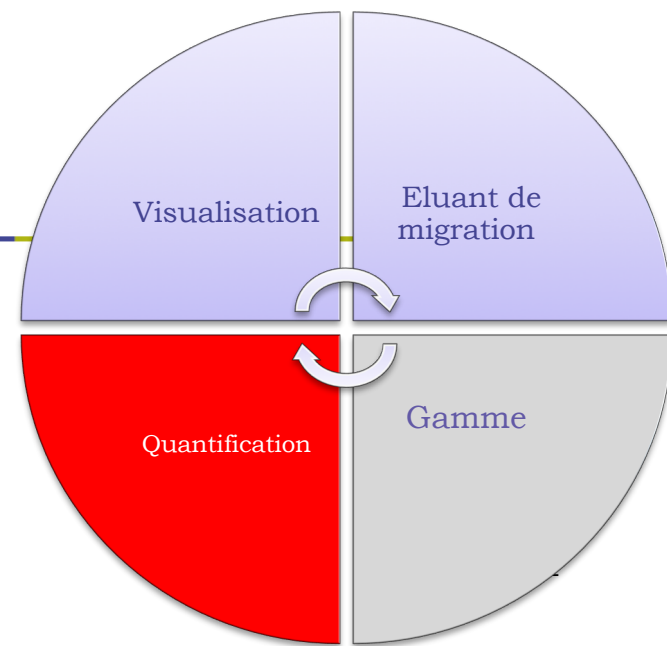
- ➔ Dissoudre 208mg de poudre dans 20ml de CHCl<sub>3</sub>

**Solution à 50mg/ml**

- ➔ Dissoudre 508mg de poudre dans 10ml de CHCl<sub>3</sub>



# Quantification et dosage



## ➤ Quantification

➤ Etablissement de la courbe de calibration

➔ Plusieurs types :

- ❖ Régressions linéaires
- ❖ Mode polynomial
- ❖ Courbes de Michaelis-Menten



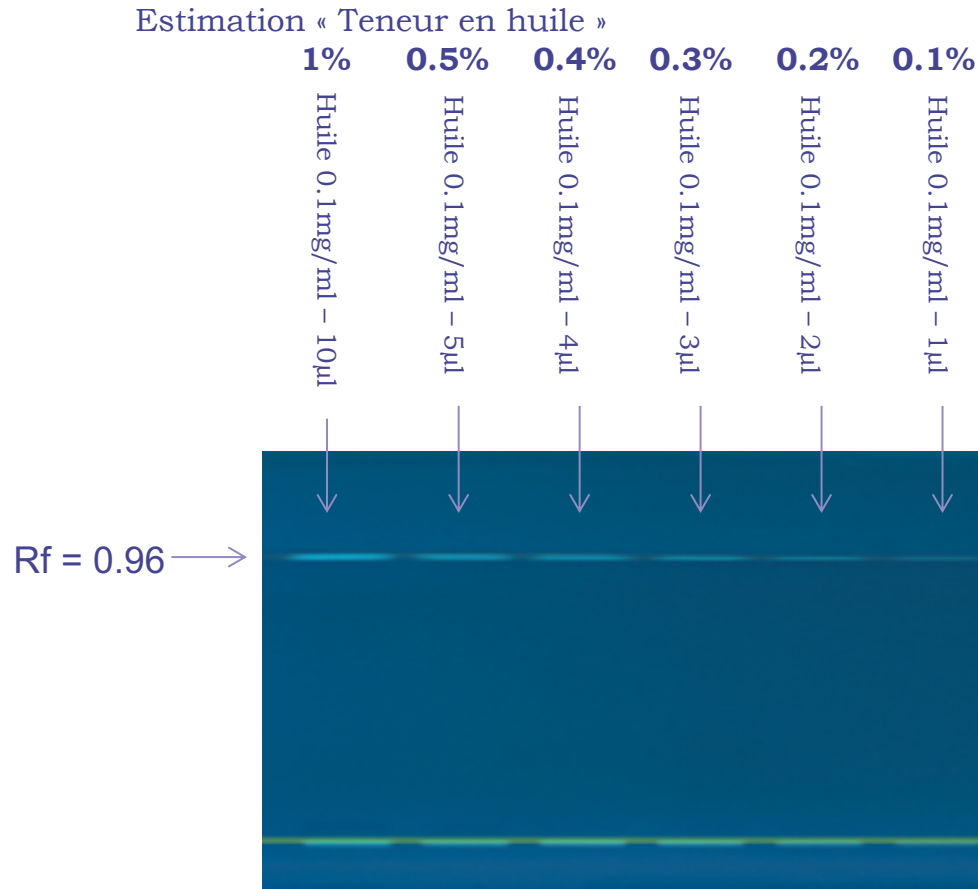
# Mise en oeuvre de l'analyse

Phase stationnaire	HPTLC Si 60 F254 20x10 cm (Merck)
Prélavage de la plaque	Propanol-2 migration 80mm Séchage 120°C pdt 20mn
Dépôts	En spray- bandes de 8mm
Solvant de migration	Hexane
Migration	Cuve ADC2 sans saturation de la plaque et sans contrôle de l'humidité relative
Distance de migration	48mm environ
Séchage	Sous courant d'air froid 5mn
Dérivatisation	Immersion dans la solution de Primuline



# Résultats

## Gamme



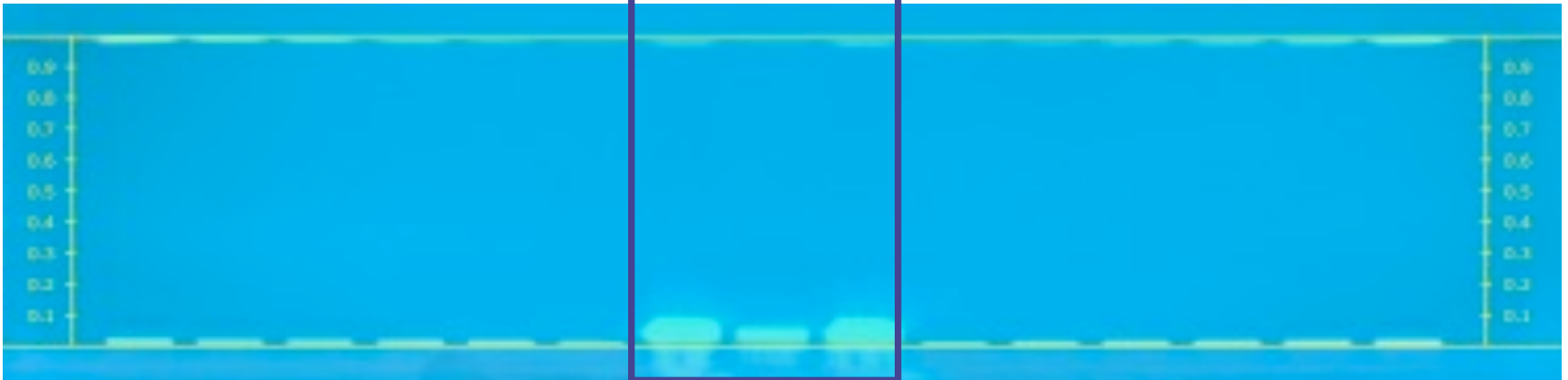
# Résultats

## Dosage

Estimation « Teneur en huile »

**1% 0,6% 1%**

1%	0.5%	0.4%	0.3%	0.2%	0.1%	<b>1%</b>	<b>0,6%</b>	<b>1%</b>	0,1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	1%
Huile 0.1mg/ml – 10µl	Huile 0.1mg/ml – 5µl	Huile 0.1mg/ml – 4µl	Huile 0.1mg/ml – 3µl	Huile 0.1mg/ml – 2µl	Huile 0.1mg/ml – 1µl	<b>API - 50mg/ml – 10µl</b>	<b>API - 10mg/ml – 10µl</b>	<b>API - 50mg/ml – 10µl</b>	Huile 0.1mg/ml – 1µl	Huile 0.1mg/ml – 2µl	Huile 0.1mg/ml – 3µl	Huile 0.1mg/ml – 4µl	Huile 0.1mg/ml – 5µl	Huile 0.1mg/ml – 10µl
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓



# Résultats

Mode de régression = Mime-2 (Michaelis-Menten-2)

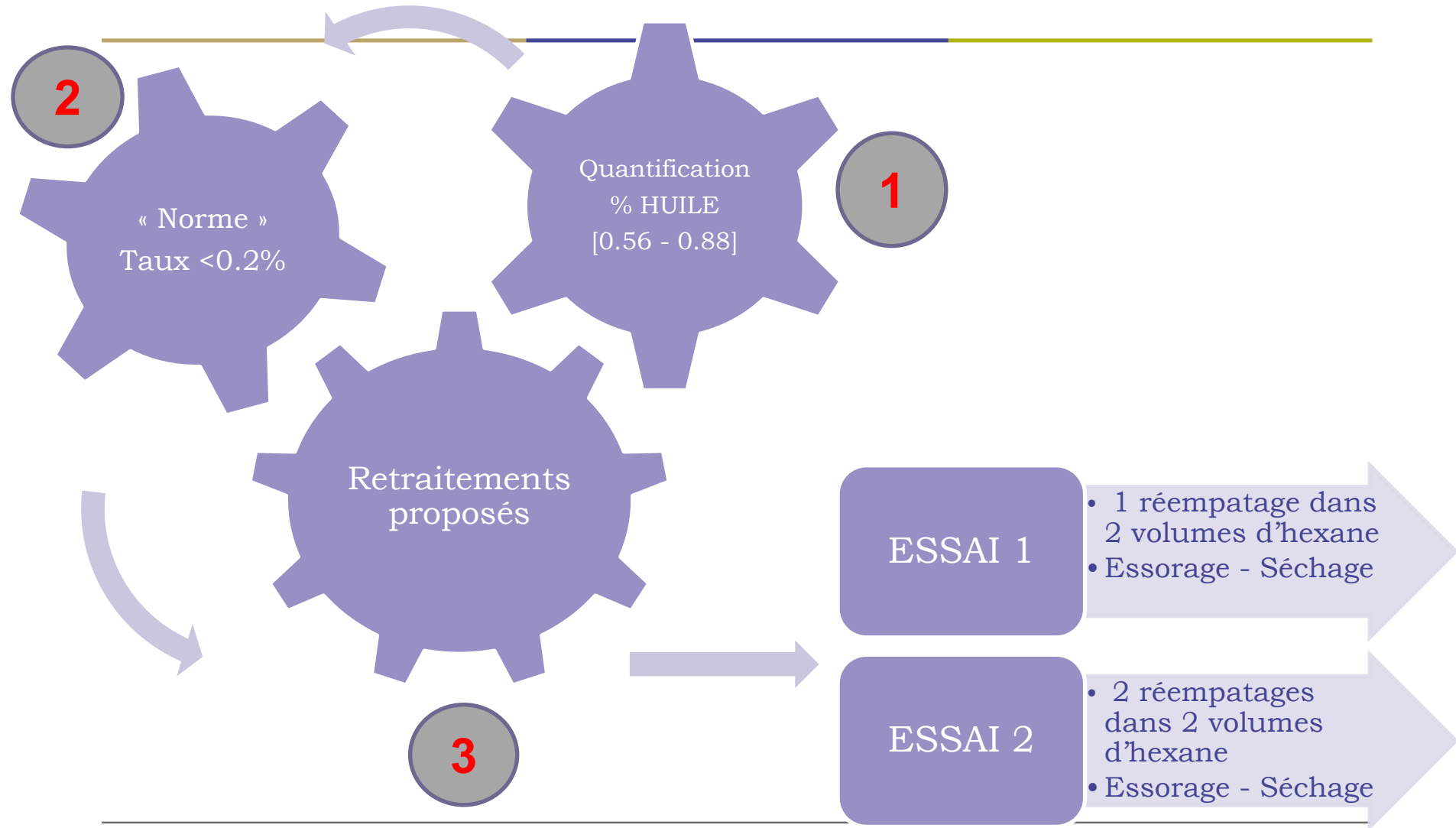
API 10mg/ml	10 $\mu$ l	1.827mg	0.88%
API 50mg/ml	10 $\mu$ l	2.872mg	0.56%

0.56 < % Huile dans API < 0.88





# Bilan

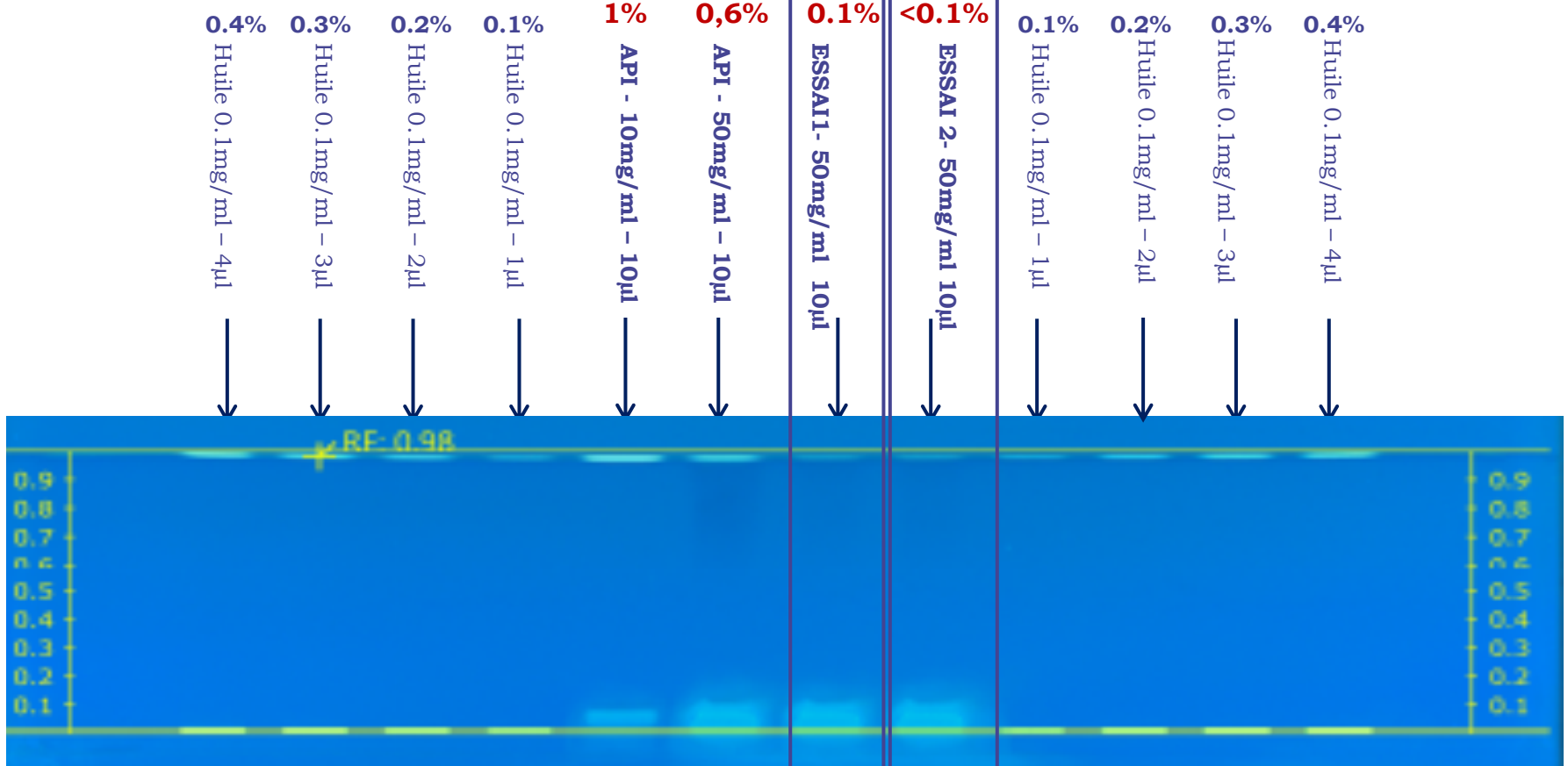


27- 28 JUIN 2018 - MONTPELLIER



# Résultats après retraitement

Estimation « Teneur en huile »



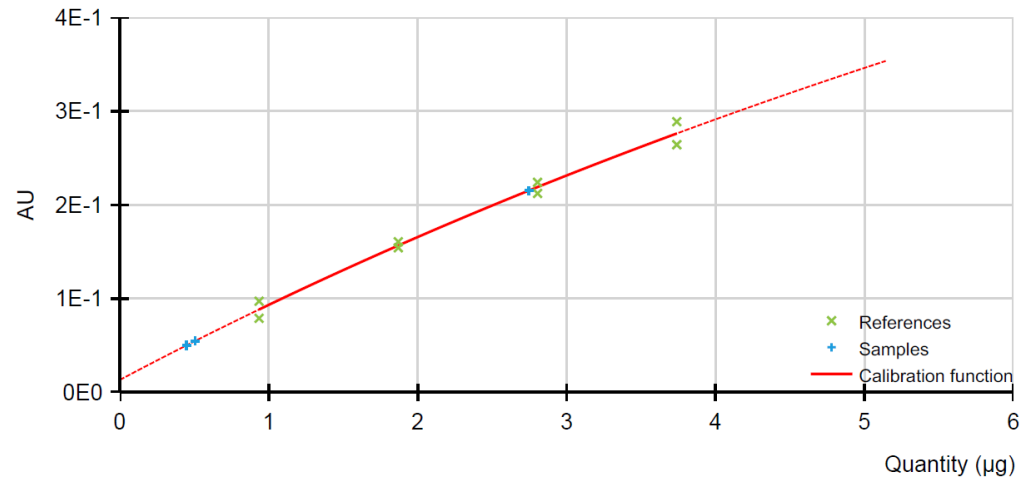
# Résultats après retraitement

Mode de régression = Mime-2 (Michaelis-Menten-2)

DOSAGE HUILE GARNITURE DANS SAR441542\_CNN 338

Regression mode	Mime-2
Range deviation	50.00 %
Number of references	8
Calibration function	$y = \frac{1.581x}{1.872 \times 10^{-5} + x} + 1.309 \times 10^{-2}$
Coefficient of variation	CV=4.5341 %
Correlation coefficient	R=0.992911

Height calibration for substance Huile @ 366 nm:



ESSAI 1 - 50mg/ml      10µl      0.507mg      0.1%

ESSAI 2 - 50mg/ml      10µl      0.448mg      0.09%

0.09 < % Huile dans API Retraité < 0.1



# Conclusions

---

- Importance de l'orthogonalité des méthodes d'analyse (LC, RMN, HPTLC, ...)
- Performance de l'HPTLC pour des produits ne répondant pas en UV
- Rapidité de la mise en œuvre de la méthode et transfert à l'équipe « AnSci »
- Aboutissement à la libération du lot GMP de principe actif



# Merci !!



ÊTRE OU NE PAS ÊTRE CHIMISTE...



IDEZEL.



SANOFI 