

Mise en place plate-forme LC2D Application de la LC2D à l'étude d'impuretés



Présentation - Pharmaphysic

Nous sommes un laboratoire spécialisé dans la **prestation de services d'analyse pour les industries cosmétiques et pharmaceutiques.**

Pour répondre rapidement aux besoins de nos clients nous nous appuyons sur:

- une expérience de plus de **25 ans dans le développement analytique**
- des travaux de **recherche analytique interne**
- un **réseau d'experts**
- une cellule de **veille technologique**
- et un **plateau technique complet**

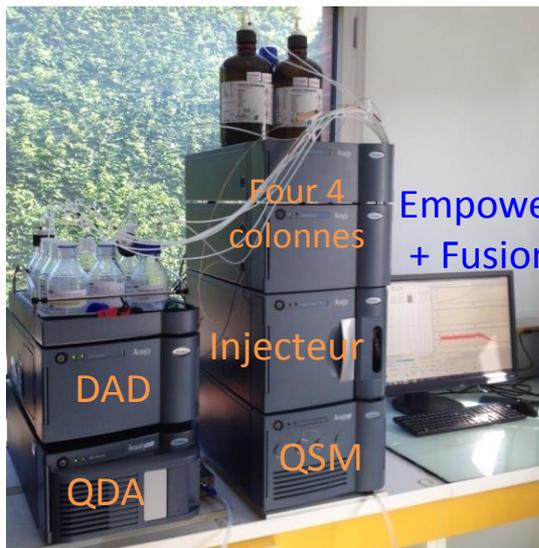
Nous accompagnons également nos clients dans la **formation** de leurs collaborateurs aux techniques d'analyses.





Plateforme de développement

UHPLC/DAD/MS

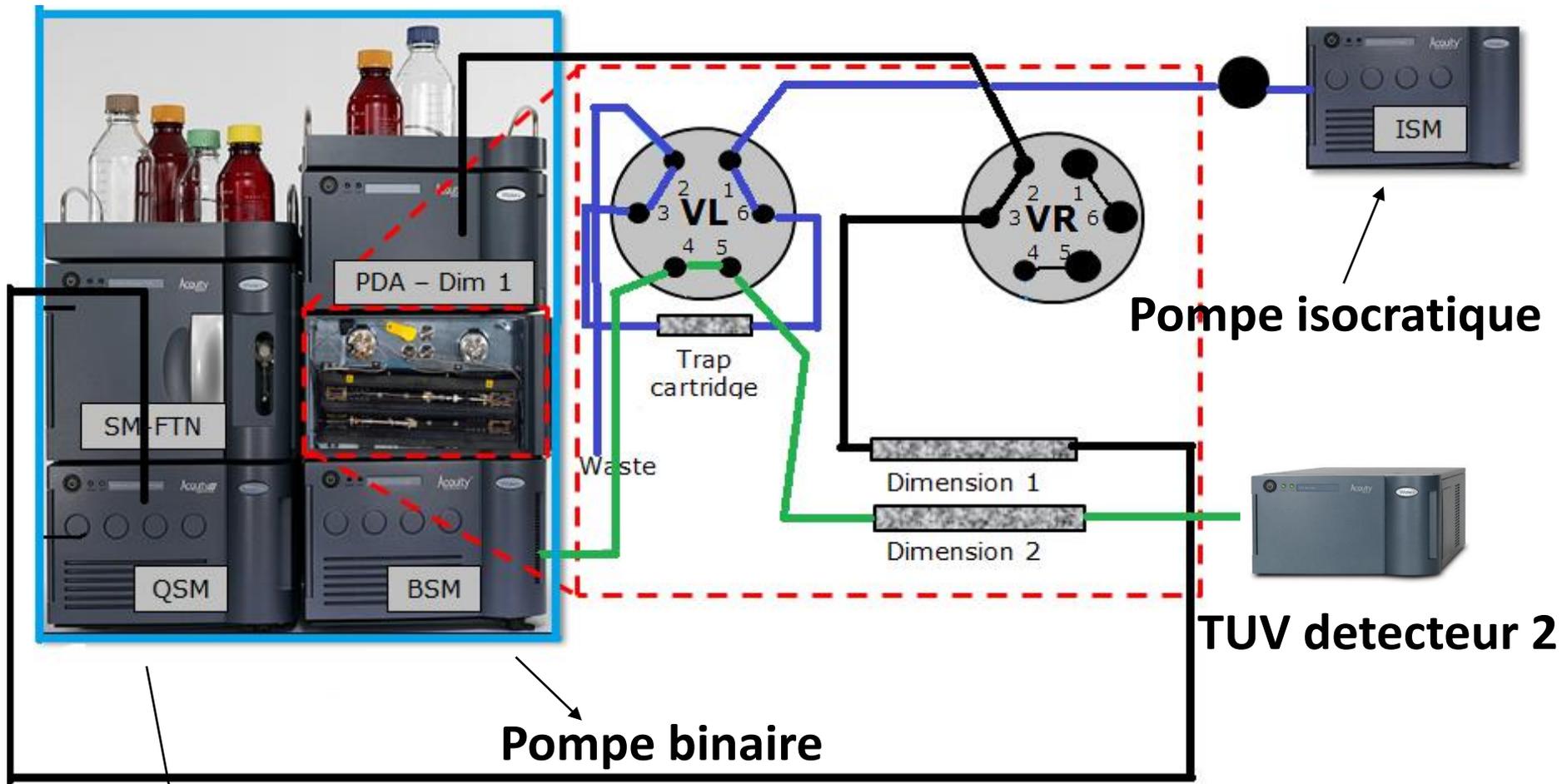


LC2D/DAD/UV





Description générale du système LC 2D



Pompe quaternaire

Pompe binaire

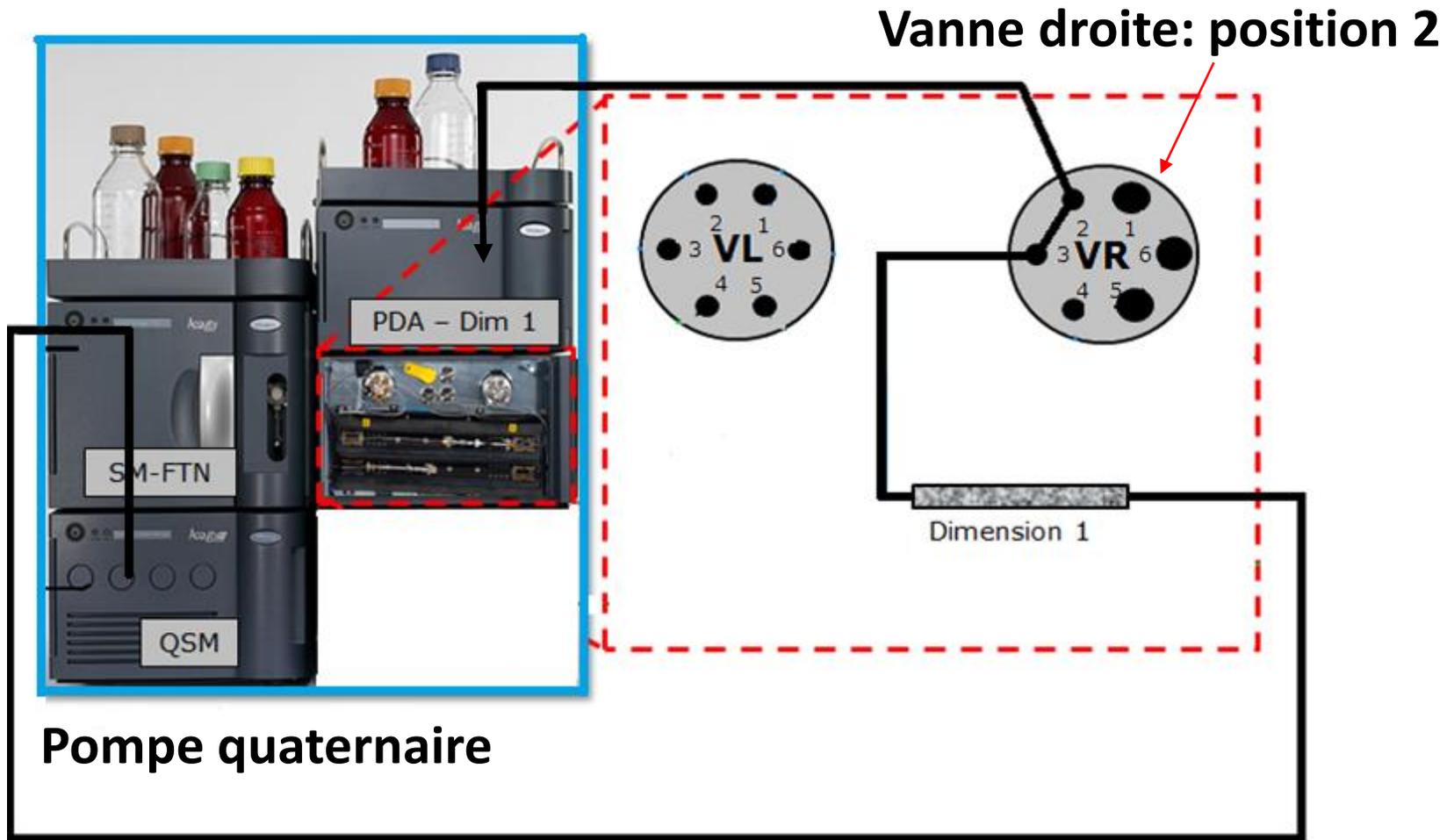
Pompe isocratique

TUV detecteur 2

- Circuit 1
- Circuit 2
- Circuit 3



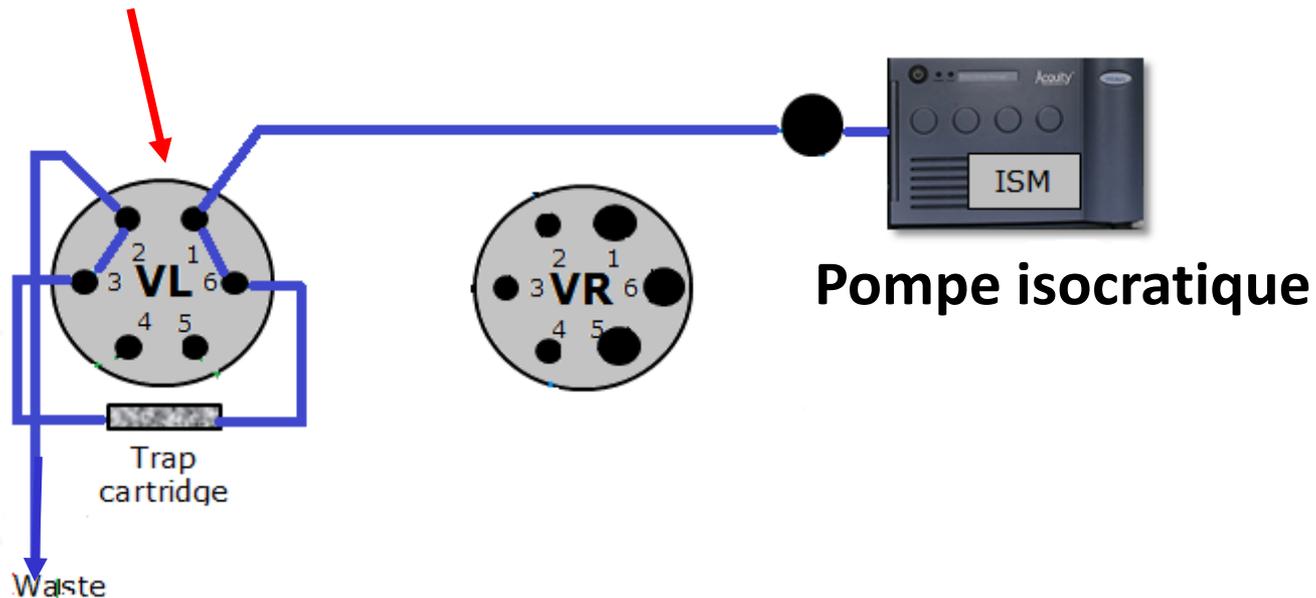
Circuit 1 alimenté par la pompe quaternaire





Circuit 2 alimenté par la pompe isocratique

Vanne de gauche: position 2

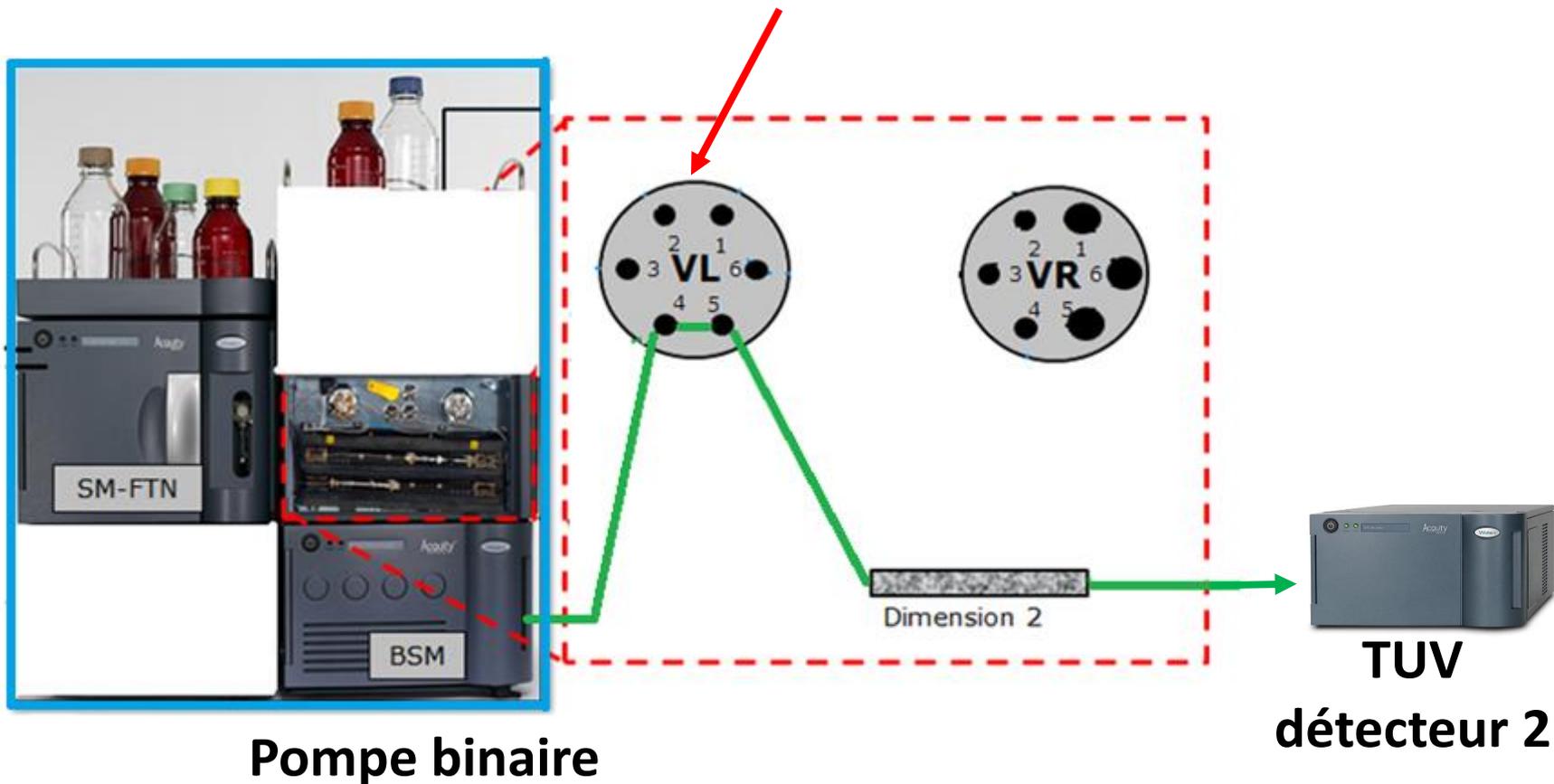


→ Circuit 2



Circuit 3 alimenté par la pompe binaire

Vanne gauche: position 2



Pompe binaire

TUV
détecteur 2

→ Circuit 3

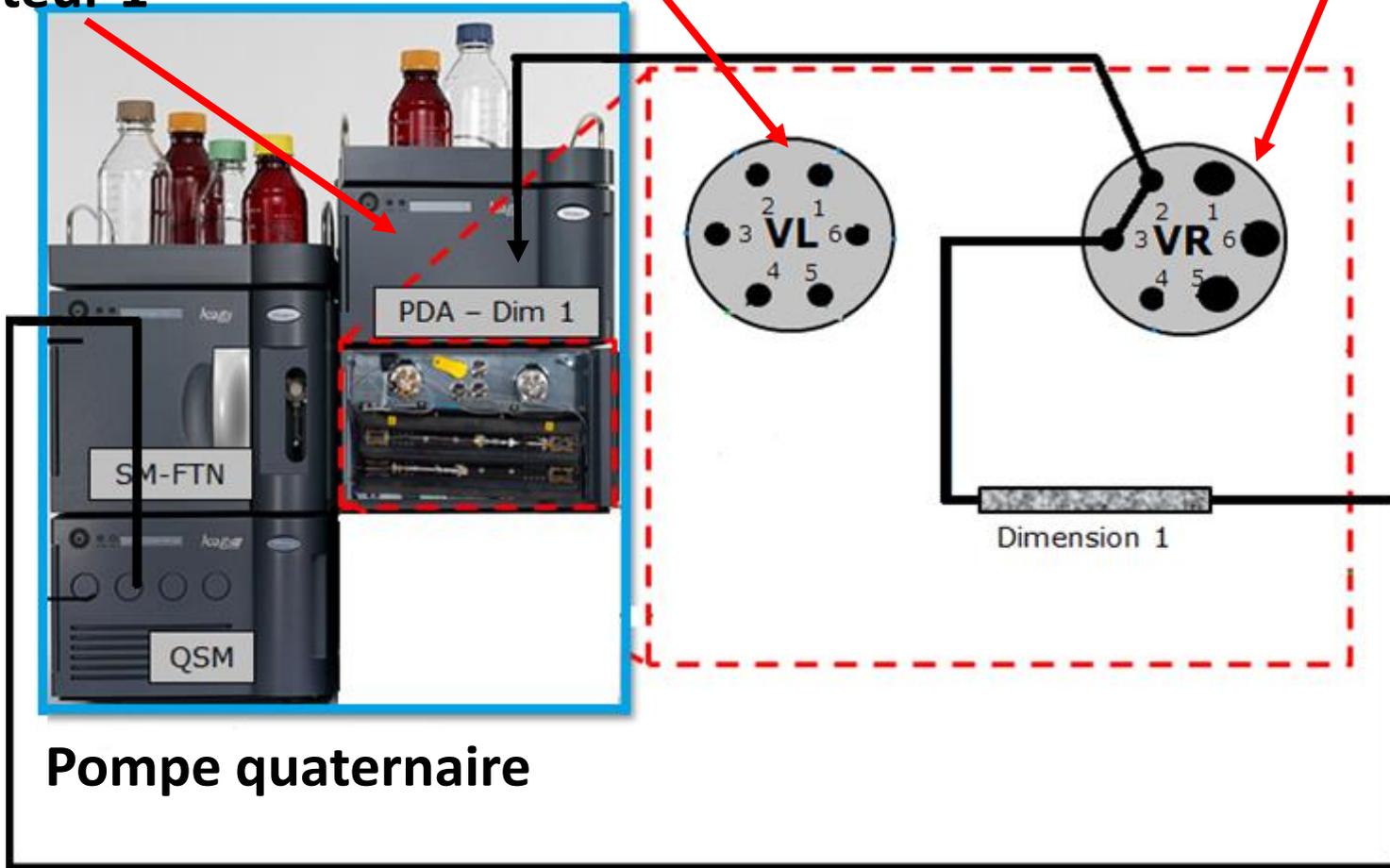


Phase 1: Analyse en dimension 1

Vanne de gauche: position 2

Vanne de droite: position 2

Détecteur 1



Pompe quaternaire

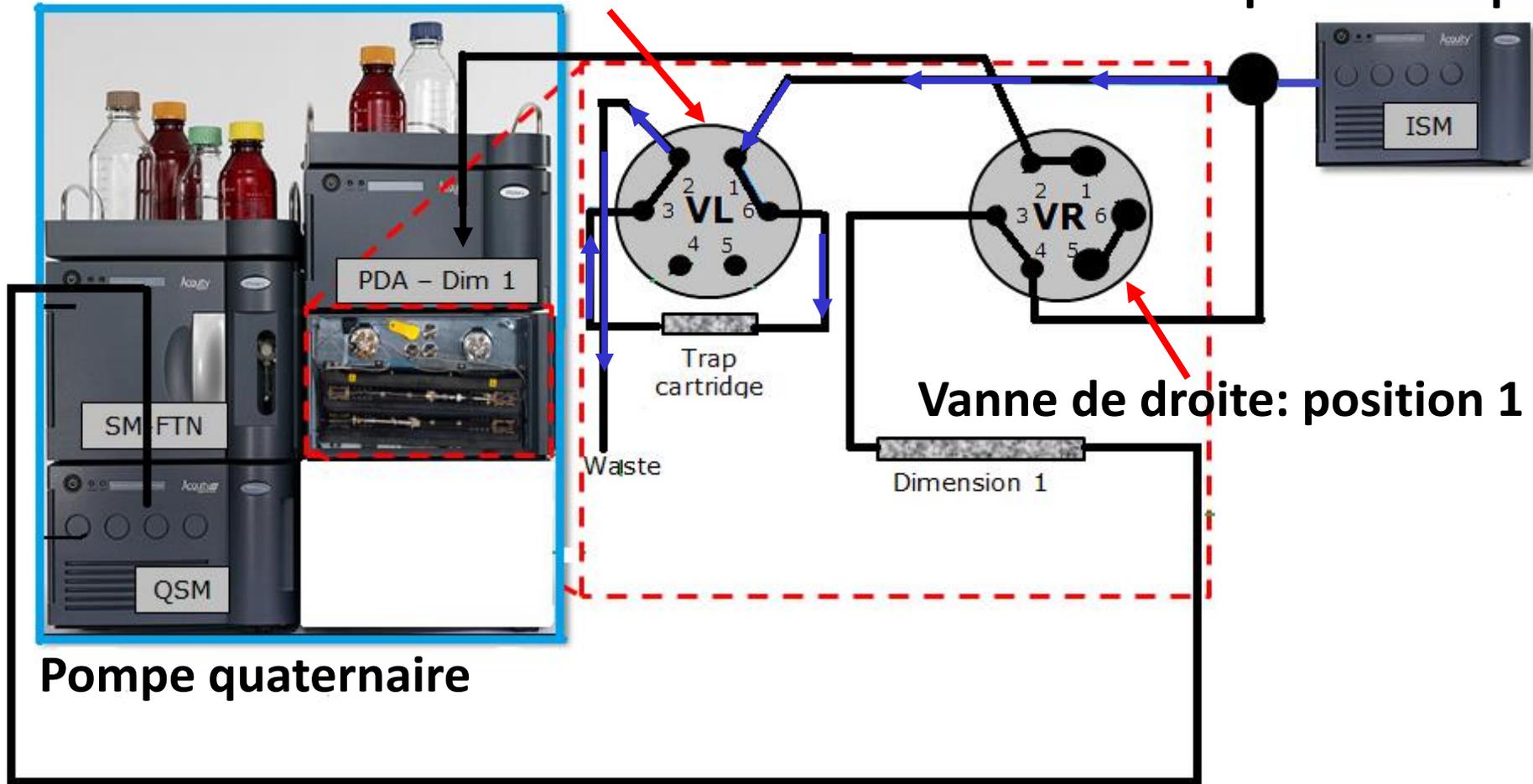
→ Circuit 1 (dimension 1)



Phase 2: piégeage sur la cartouche

Vanne de gauche: position 2

Pompe isocratique



Pompe quaternaire

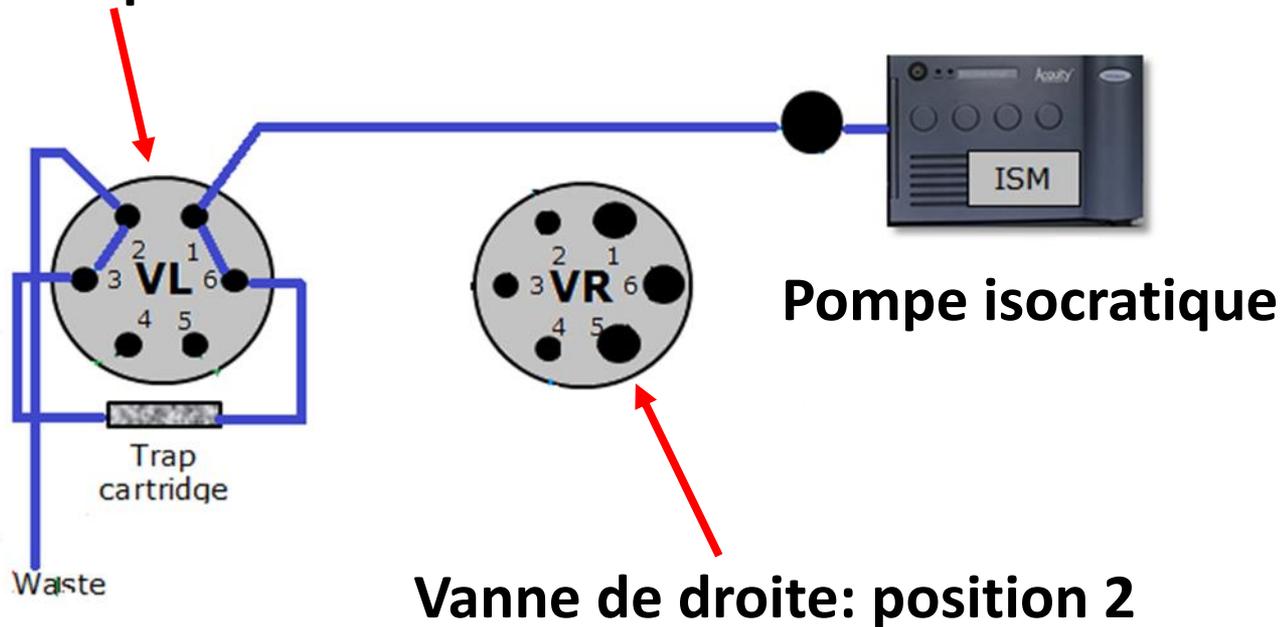
Vanne de droite: position 1

→ Circuit 1 et → Circuit 2



Phase 3: rinçage du piège

Vanne de gauche: position 2



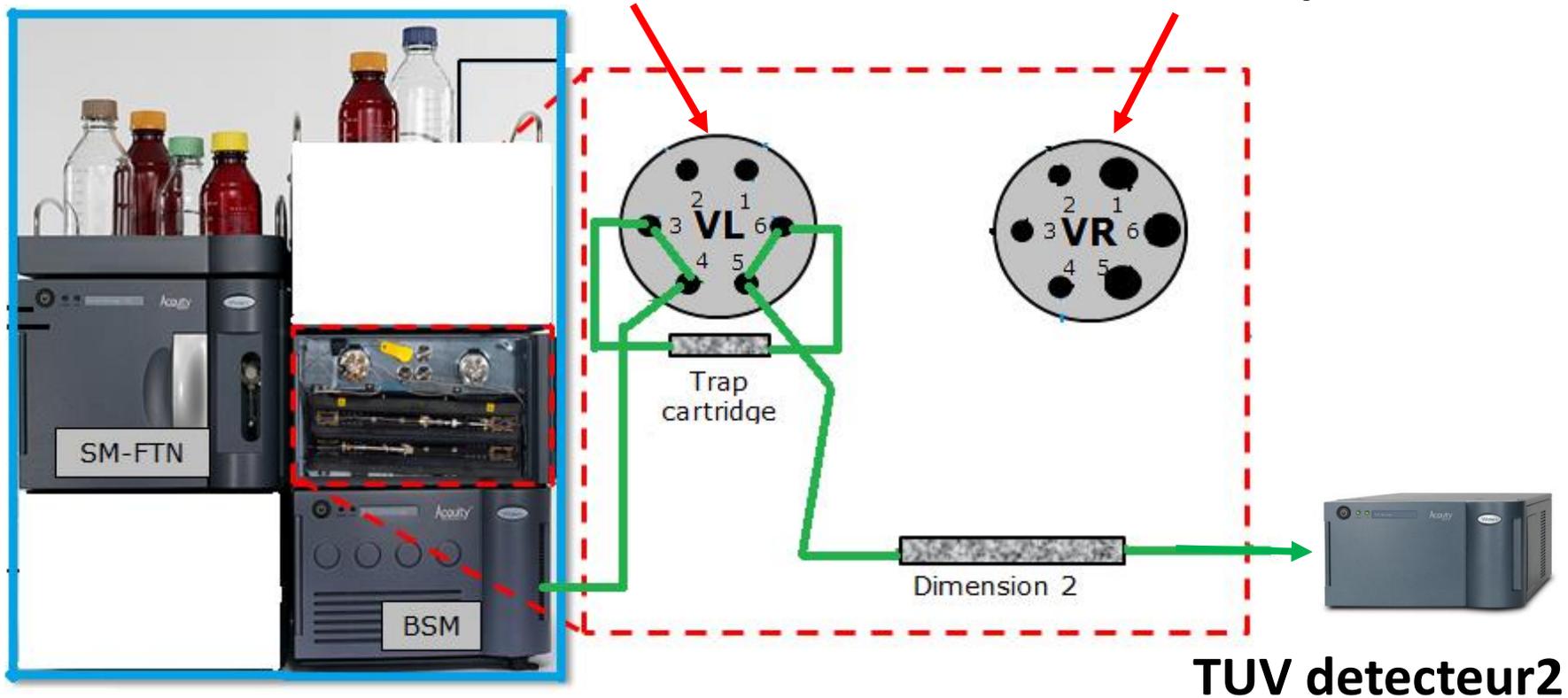
→ Circuit 2



Phase 4 : élution du piège et analyse en dimension 2

Vanne de gauche: position 1

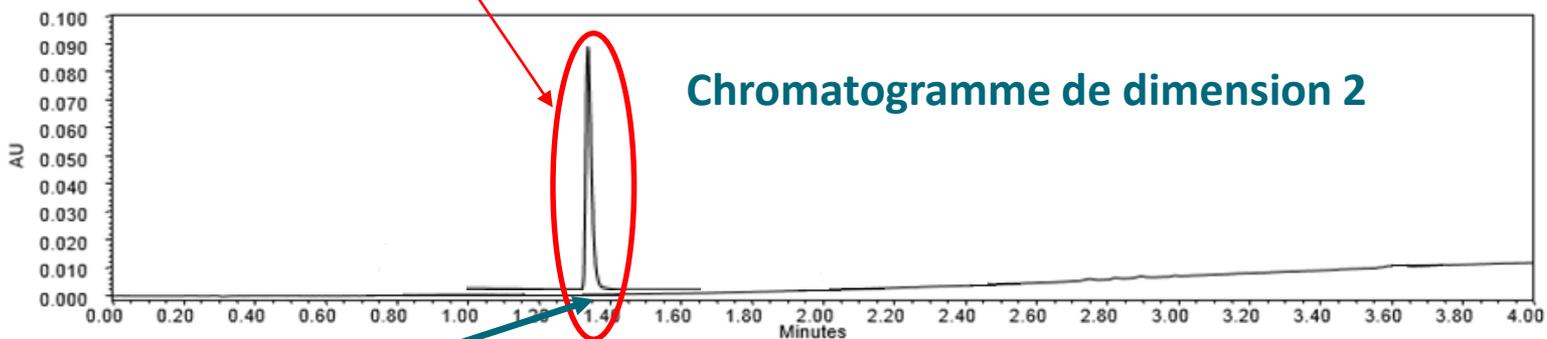
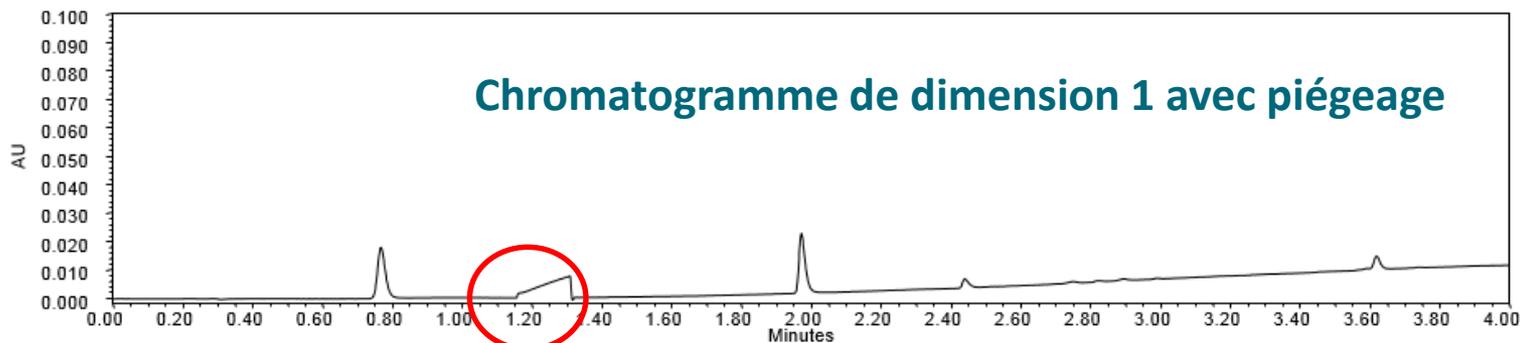
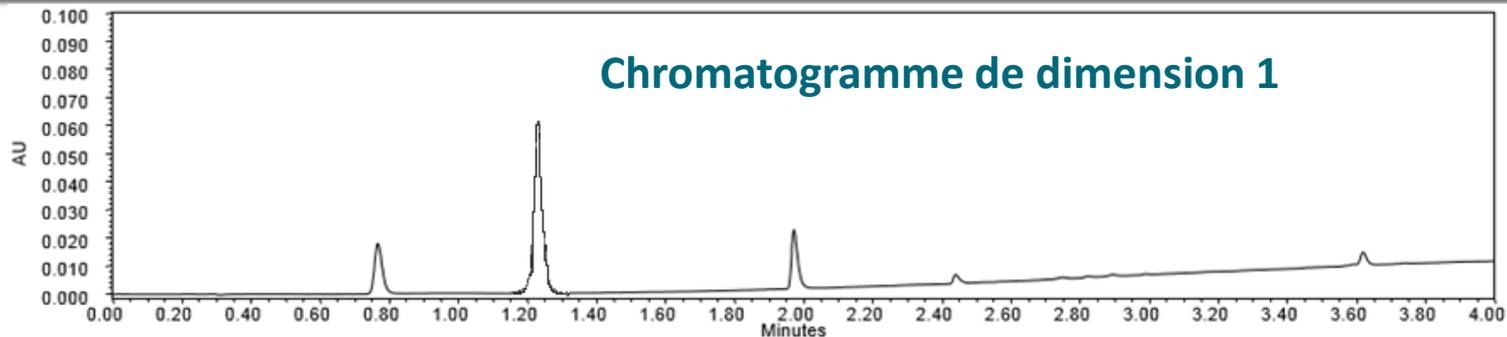
Vanne de droite: position 2



→ Circuit 3 (dimension 2)



Phase 4 : élution du composé piégé en dimension 2



$RT \text{ apparent D2} = RTD1 + \text{durée piégeage} + \text{durée rinçage} + RTD2$



Configuration de l'instrumentation

M1_rifamycine in Pharmaphysic_ETU0509TRA02 as System/Administrator - Instrument Method ...

File Edit View Help

Waters Quaternary Solvent Manager ACQ-QSM
Waters Sample Manager FTN ACQ-FTN
Waters Column Manager ACQ-CM
Waters Binary Solvent Manager ACQ-BSM
Waters Isocratic Solvent Manager ACQ-ISM
Waters PDA Detector ACQ-PDA
Waters TUV Detector ACQ-TUV

Quaternary Solvent Manager

Auto • Blend Plus™

General Misc Data

Solvents

A: Tampon 7.5/ACN 90/

B: Tampon 7.5 /ACN 30/

C:

D:

Pressure Limits

Low: 0 psi

High: 15000 psi

Seal Wash Period: 5.00 min

Gradient:

	Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve
1	Initial	0.800	80.0	20.0	0.0	0.0	Initial
2	26.00	0.800	41.0	59.0	0.0	0.0	6
3	30.00	0.800	20.0	80.0	0.0	0.0	6
4	32.00	0.800	80.0	20.0	0.0	0.0	6

Comment:

Ready





Programmation du déroulement des phases

M1_rifamycine in Pharmaphysic_ETU0509TRA02 as System/Administrator - Instrument Method ...

File Edit View Help

Waters ACQ-QSM Waters ACQ-FTN **Waters ACQ-CM** Waters ACQ-BSM Waters ACQ-ISM Waters ACQ-PDA Waters ACQ-TUV

Column Manager

Mode
 Column Selection Advanced

General | Data | Events

Valve Position:
Left Valve: Position 2
Right Valve: Position 2

Temperature Control:
1: Off °C
2: Off °C

Alarm Band: ± 5.0 °C

Shutdown all temperatures

Comment:
[Text Field]

Ready

Column Manager

Mode
 Column Selection Advanced

General | Data | Events

Run Events 2D Repeat

	Time (min)	Event	Action
1	1.20	Right Valve	Position 1
2	1.35	Right Valve	Position 2
3	2.35	Left Valve	Position 1
4			
5			
6			
7			
8			



Mise en place LC2D

La répétabilité de l'injecteur est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en deuxième dimension après piégeage?

La répétabilité de l'élution est-elle altérée lorsqu'un composé est analysé en deuxième dimension?

Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?

Y-a-t-il une difficulté particulière de piégeage dans le cas d'un gradient d'élution dans le circuit 1 (QSM)?

Y-a-t-il un écart entre l'aire du pic d'un composé analysé en première dimension et l'aire du pic de ce même composé après cutting et deuxième dimension?

Le piégeage peut-il être répété de façon quantitative dans un objectif d'augmentation de sensibilité?

Le cutting perturbe-t-il le reste du chromatogramme de 1ere dimension?

...





En réponse à des demandes de nos clients

Client 1 : Le pic observé en stabilité est-il issu du même composé que celui observé en dégradation forcée?

Contrainte : Les conditions chromatographiques ne sont pas compatibles avec la MS

Client 2 : Comment apporter des informations sur la caractérisation d'un pic ?

Contrainte : La présence du pic dépend des conditions chromatographiques qui ne sont pas compatibles avec la détection MS.

Client 3 : Comment obtenir le profil isomérique d'un API en évitant l'interférence des impuretés ?

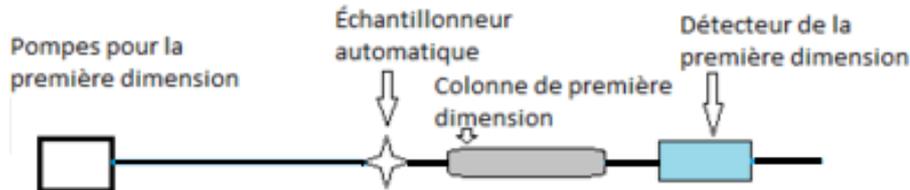
Contrainte : La sélectivité entre les isomères de l'API et les impuretés n'a pas été obtenue après plusieurs études de développement



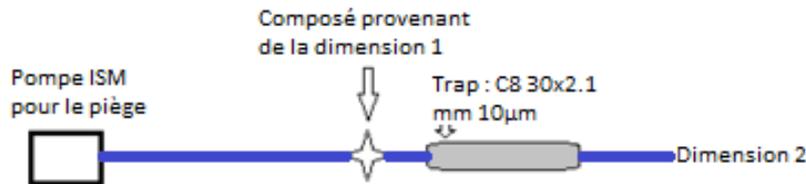
Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2^{ème} dimension après piégeage?

Conditions chromatographiques du test

Première dimension (circuit 1)

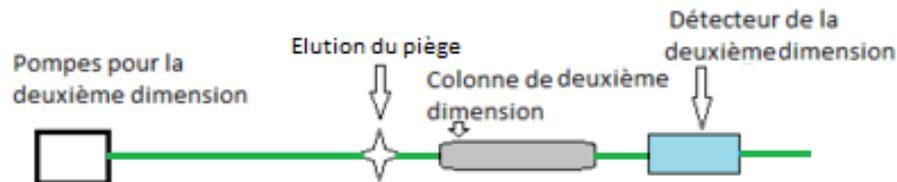


Piégeage (circuit 2)



Dimension 1 et dimension 2 ont des conditions chromatographiques identiques (phase stationnaire, phase mobile, température)

Deuxième dimension (circuit 3)

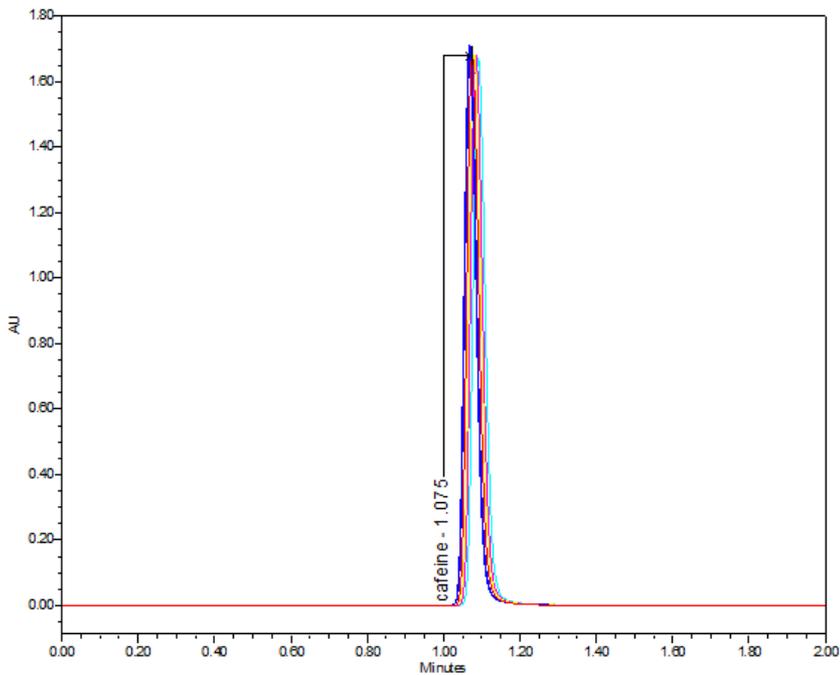




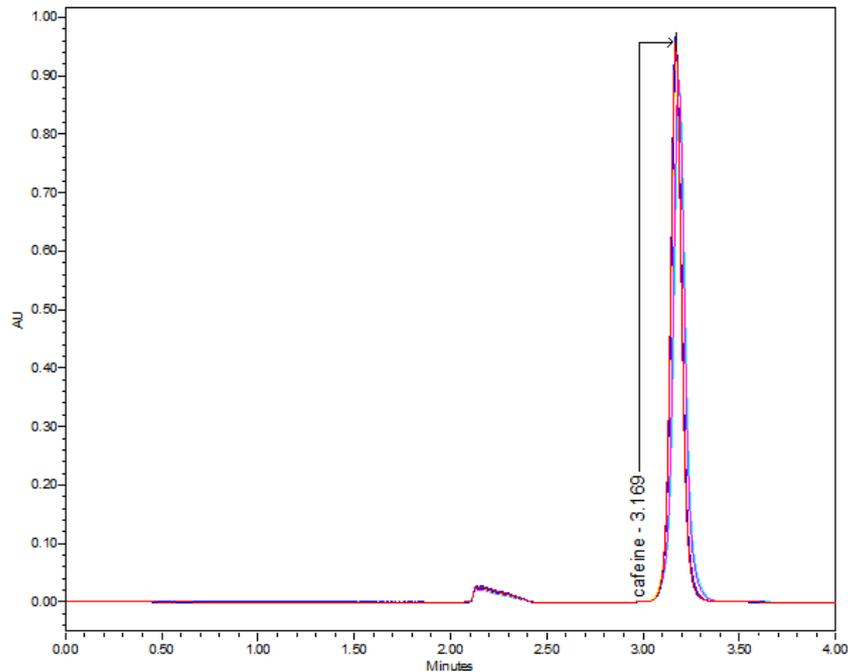
Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2^{ème} dimension après piégeage?

Conditions chromatographiques isocratiques (caféine)

Première dimension (6 injections)



Deuxième dimension après piégeage (6 injections)

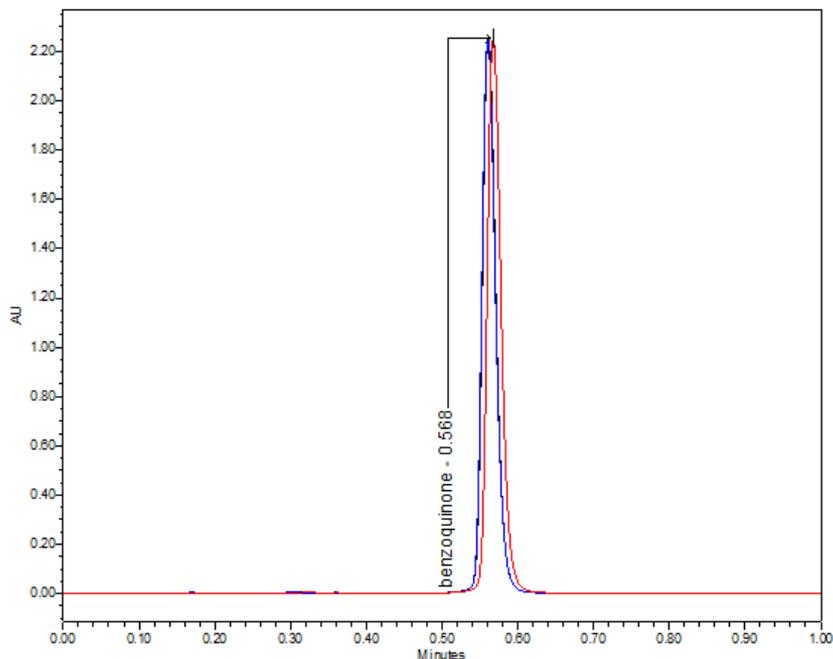




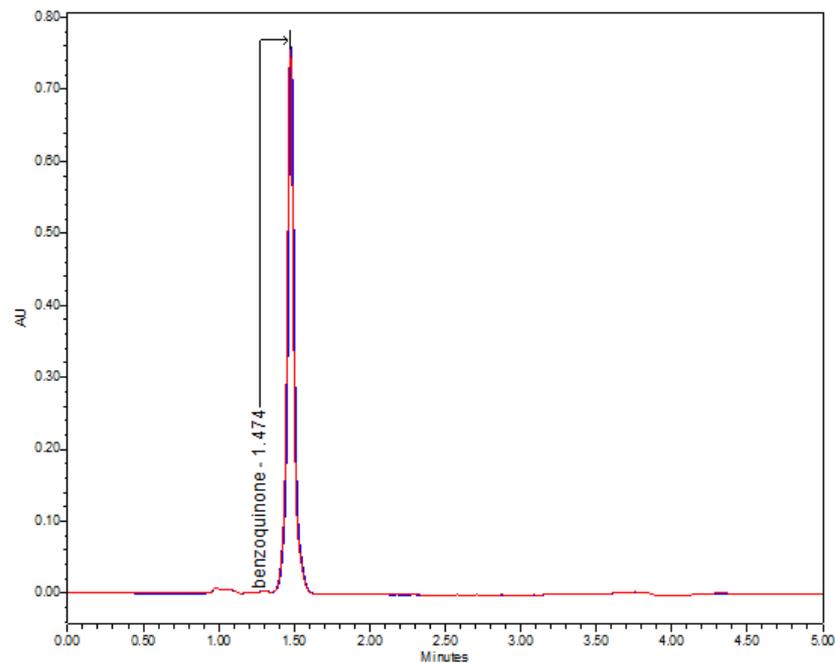
Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2^{ème} dimension après piégeage?

Conditions chromatographiques en élution gradient (benzoquinone)

Première dimension (3 injections)



Deuxième dimension après piégeage (3 injections)





Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2^{ème} dimension après piégeage?

Comparaison de la dispersion sur les temps de rétention (cv en %)

	Dimension 1	Dimension 2
caféine (dimension 1 et 2 isocratique)	0.8	0.3
Benzoquinone (dimension 1 et 2 gradient)	0.7	0.3

Sur les deux exemples étudiés, il apparaît clairement que la répétabilité de l'injection (SM-FTN) de la dimension 1 n'est pas modifiée par le piégeage et l'analyse en 2eme dimension.

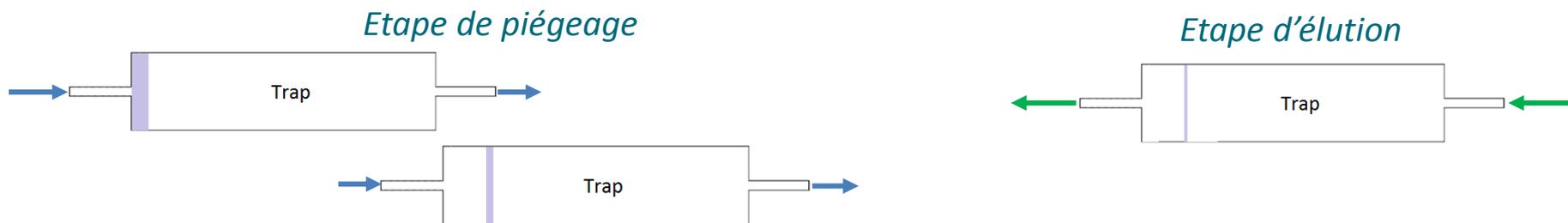


Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2^{ème} dimension après piégeage?

Comparaison de la dispersion sur les aires (cv en %)

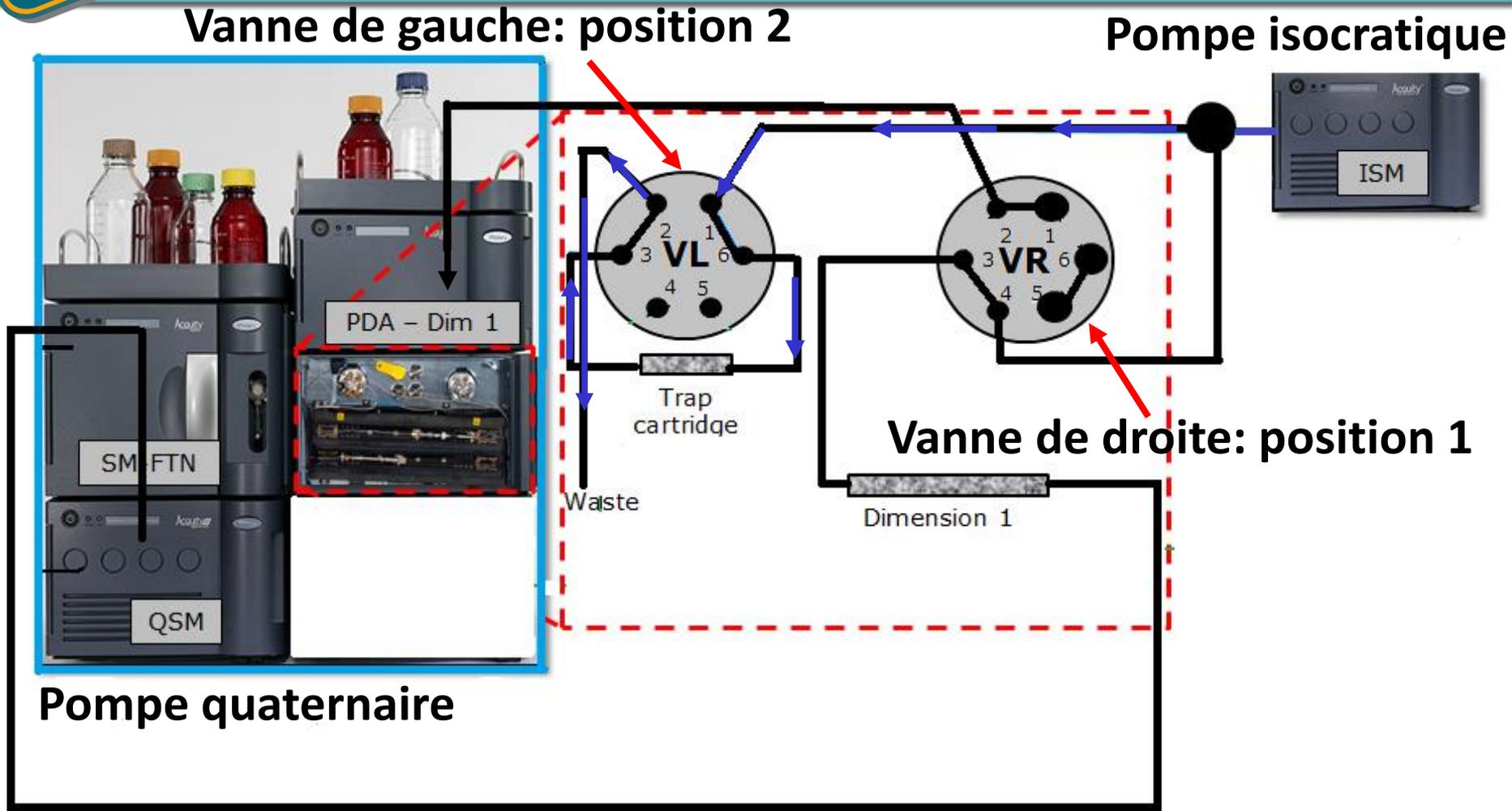
	Dimension 1	Dimension 2
Cafeine (n=6) (dimension 1 et 2 isocratique)	0.19	0.11
Benzoquinone (n=3) (dimension 1 et 2 gradient)	1.0	0.4

Sur les deux exemples étudiés il apparait clairement que la répétabilité d'injection n'est pas modifiée par le piégeage et l'analyse en 2^{ème} dimension.





Question 2 : Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?



→ **Circuit 1** et → **Circuit 2**



Question 2 : Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?

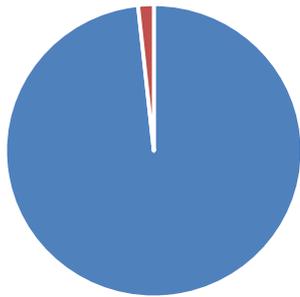
Le débit du circuit 2 (ISM) a une influence très importante sur la composition de la phase qui traverse la cartouche et donc la qualité du piégeage

Exemple en élution isocratique :

Circuit 1 = eau/acetonitrile-90/10-0,4 ml/min

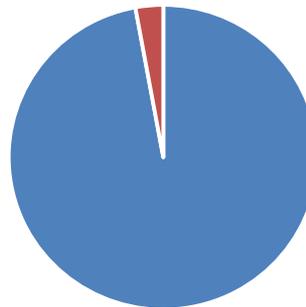
Circuit 2 = eau 100%

Débit = 2ml/min



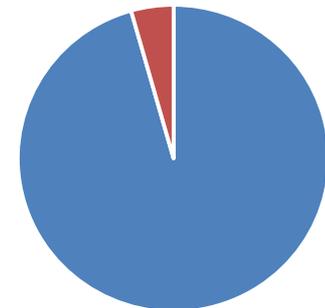
■ %eau ■ %org

Débit = 1ml/min



■ % eau ■ % org

Débit = 0.5 ml/min



■ %eau ■ %org

Facteur de rétention sur un piège apolaire



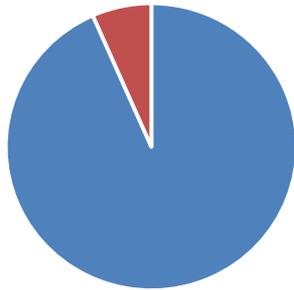
Question 2 : Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?

Exemple en gradient :

Circuit 1 = eau/acetonitrile-90/10 à 5/95 en 2.5 min-0,4 ml/min

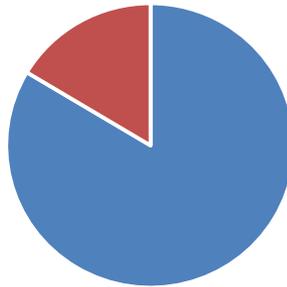
Circuit 2 = eau 100% - 1ml/min

T = 0.6 min



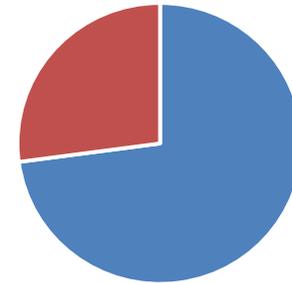
■ %eau ■ %org

T = 1.5 min



■ % eau ■ % org

T = 2.5 min



■ %eau ■ %org

Facteur de rétention sur un piège apolaire

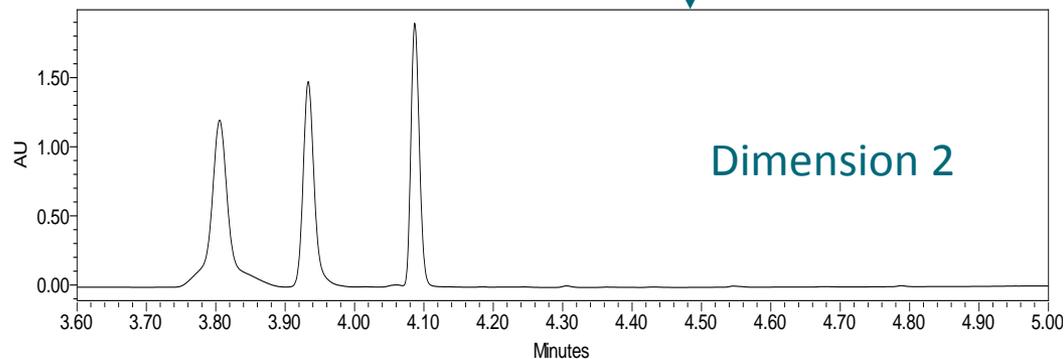
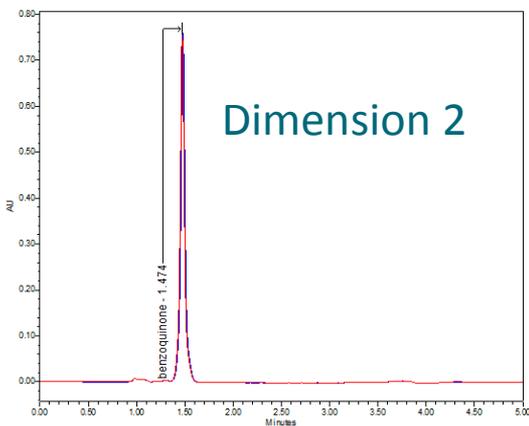
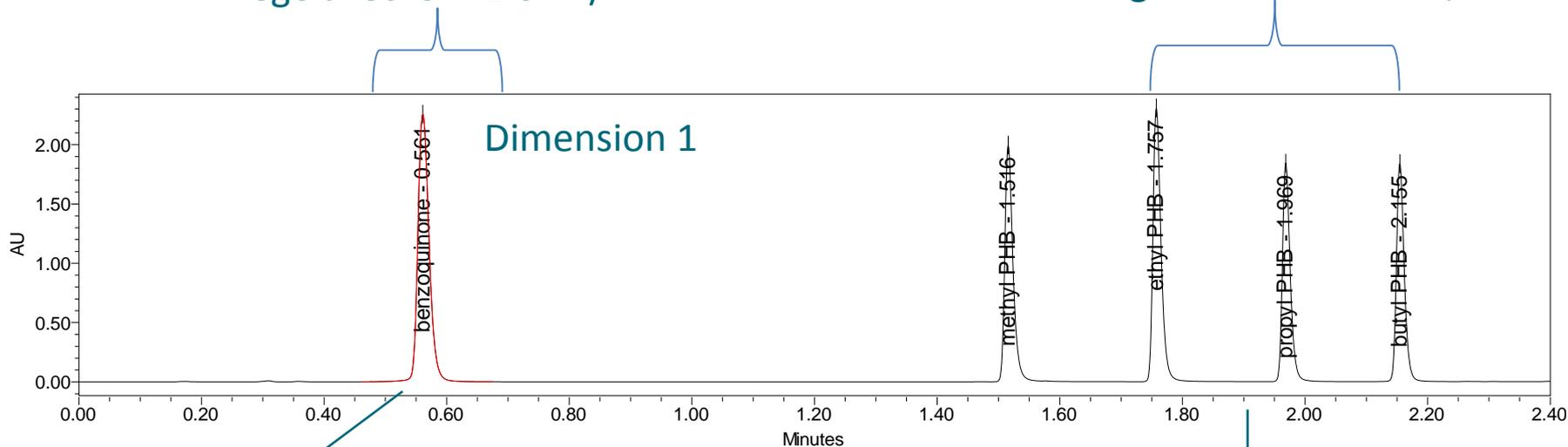


Question 2 : Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?

Exemple avec un piège C8

Piégé avec ISM 1.0 ml/min

Piégé avec ISM 1.8 ml/min

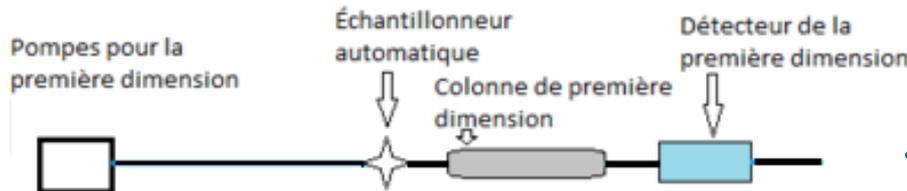


Changer la nature du piège

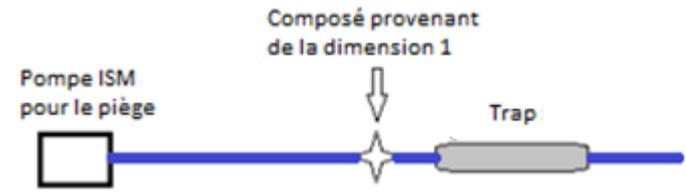
Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

Conditions chromatographiques du test

Première dimension



Piégeage

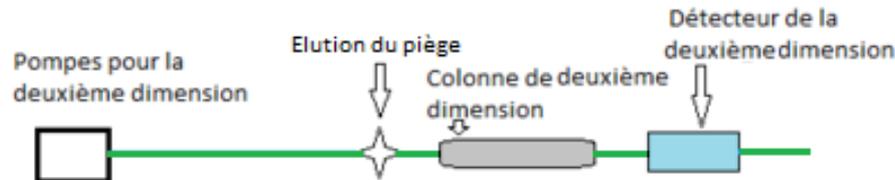


n répétitions

Chromatographie UHPLC de la dimension 1
Colonne C18 – Circuit 1 = eau/ACN

Circuit 2 = eau

Deuxième dimension

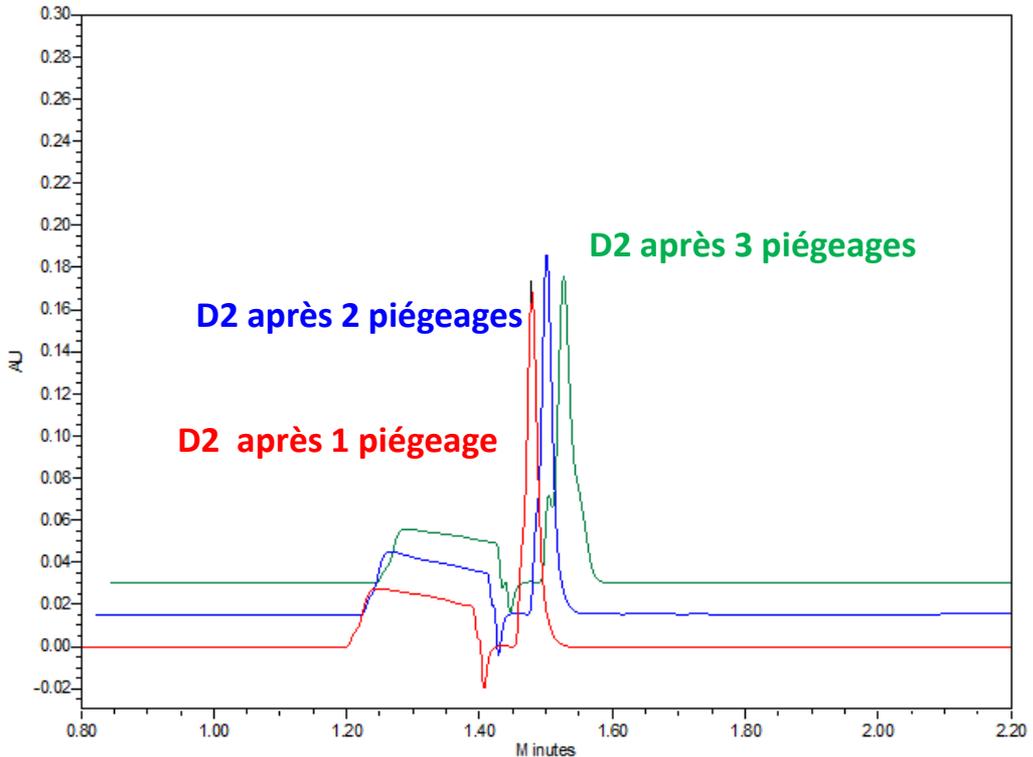


Chromatographie UHPLC de la dimension 2
Colonne C18 – Circuit 3 = ACN



Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

Analyse d'un composé de facteur de capacité K' faible (Caféine)

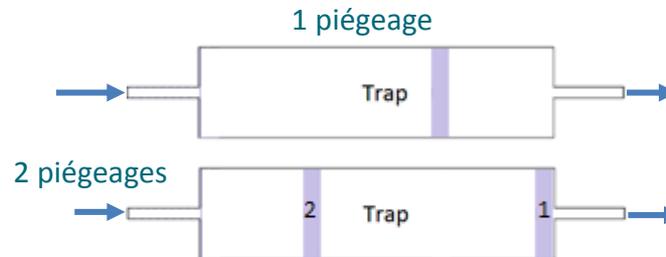


Piégeage sur cartouche C8

	Aires des pics Dimension 2
1 piégeage	220 313
2 piégeages	222 706
3 piégeages	266 194



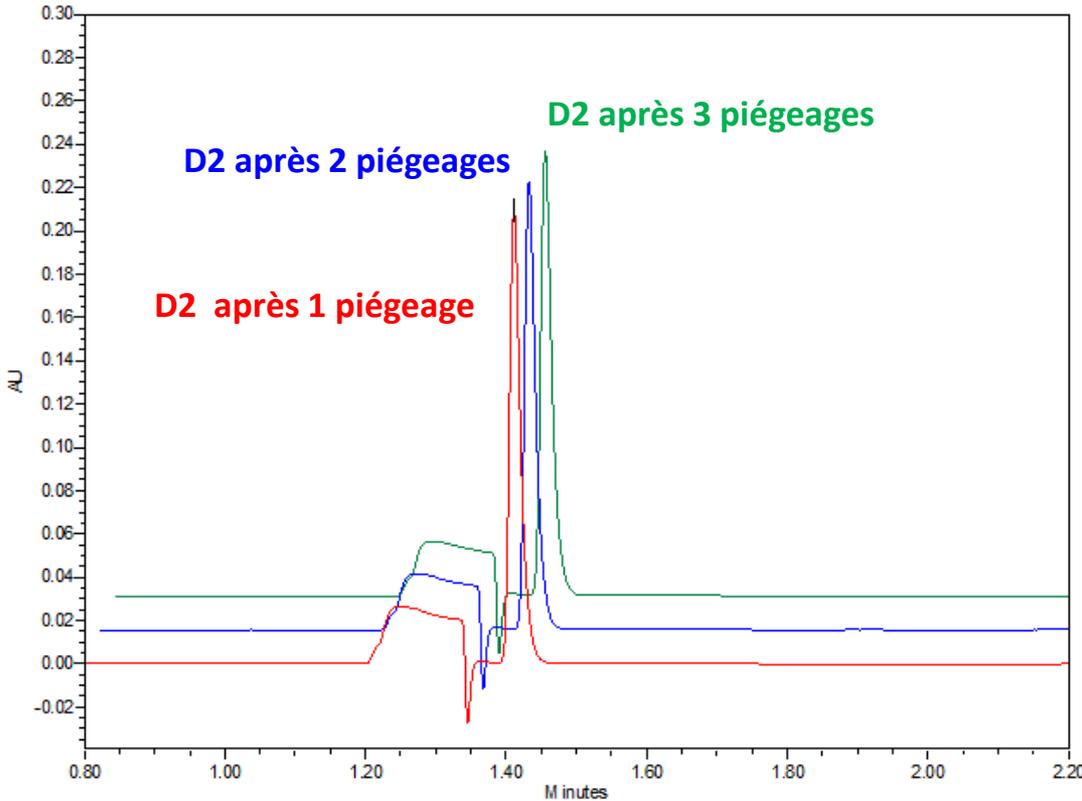
Pas d'accumulation





Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

Analyse d'un composé de facteur de capacité K' faible (Caféine)



Piégeage sur cartouche C18

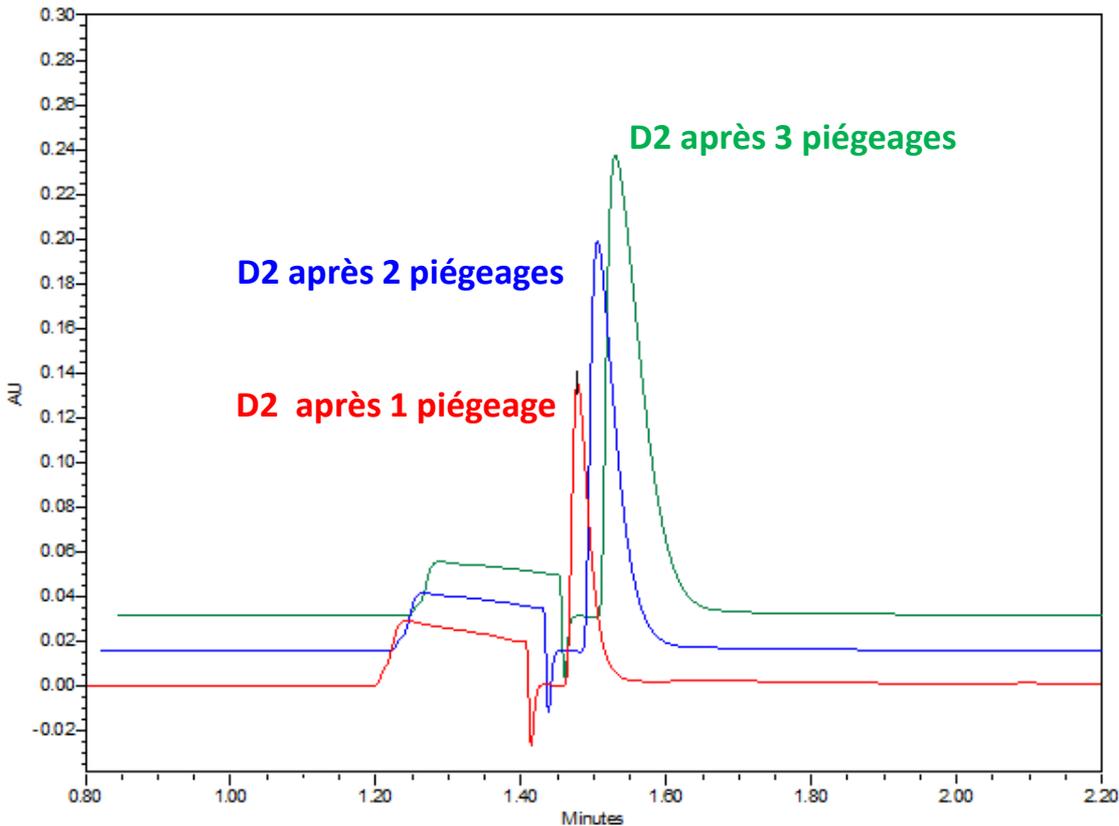
	Aires des pics Dimension 2
1 piégeage	232 163
2 piégeages	233 107
3 piégeages	233 501



Pas d'accumulation

Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

Analyse d'un composé de facteur de capacité K' faible (Caféine)



Piégeage sur cartouche Oasis HLB

	Aires des pics Dimension 2
1 piégeage	233 415
2 piégeages	465 209
3 piégeages	698 602



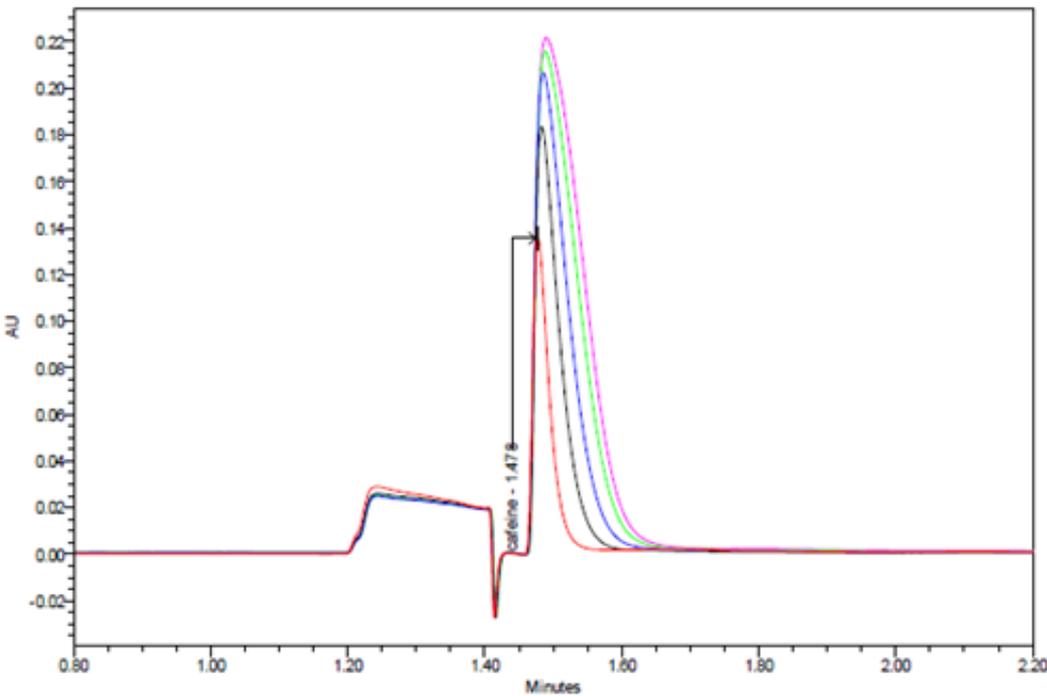
Accumulation proportionnelle





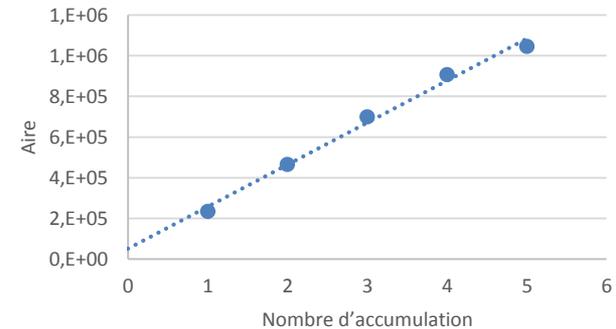
Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

Analyse d'un composé de facteur de capacité K' faible (Caféine)



- cafeine 1 piege + elution
- cafeine 2 pieges + elution
- cafeine 3 pieges + elution
- cafeine 4 pieges + elution
- cafeine 5 pieges + elution

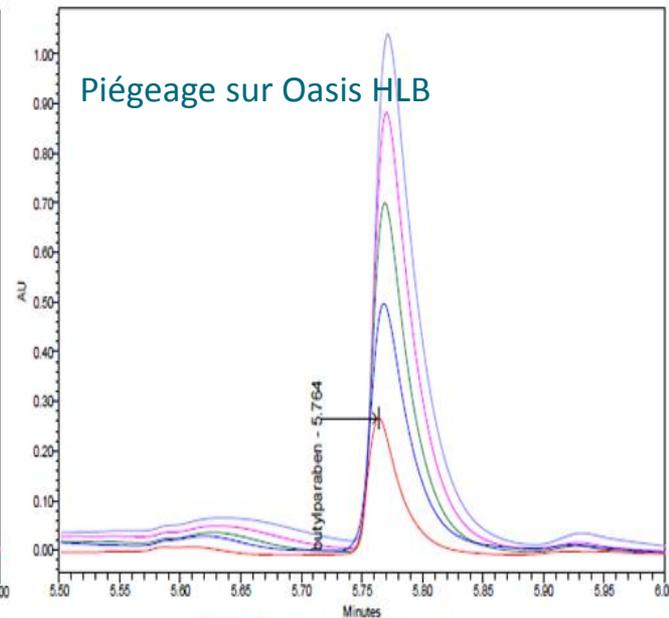
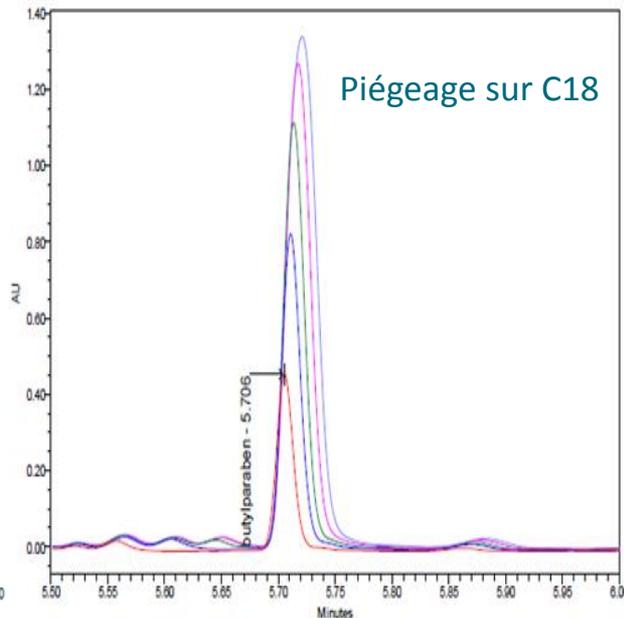
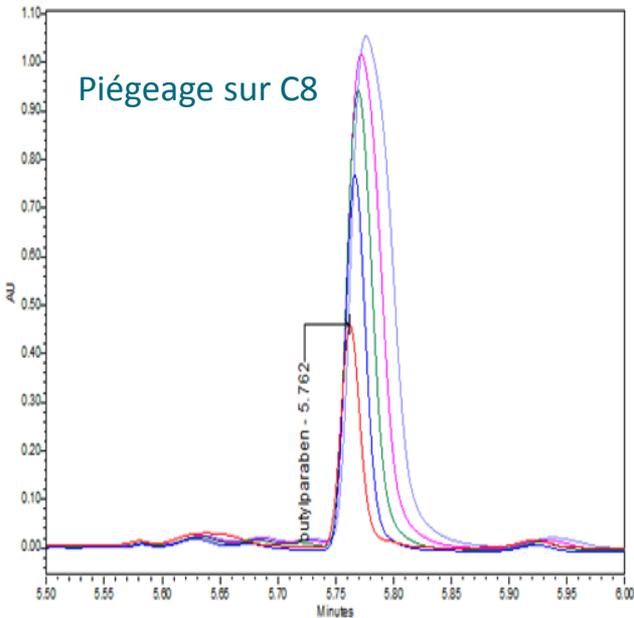
	Aires des pics Dimension 2
1 piégeage	233 415
2 piégeages	465 209
3 piégeages	698 602
4 piégeages	906 858
5 piégeages	1 046 441





Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

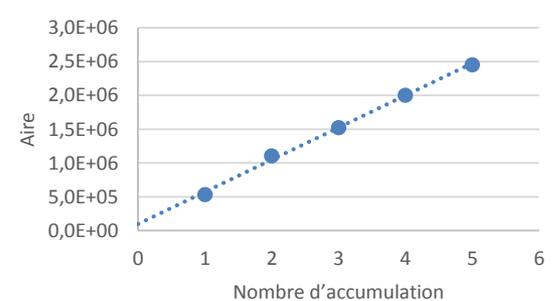
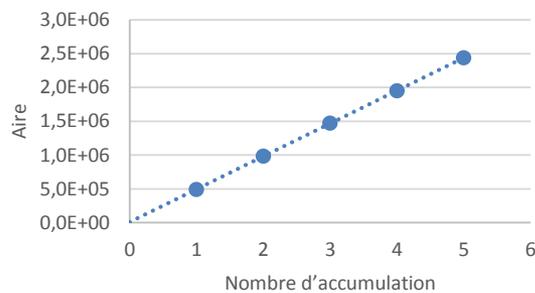
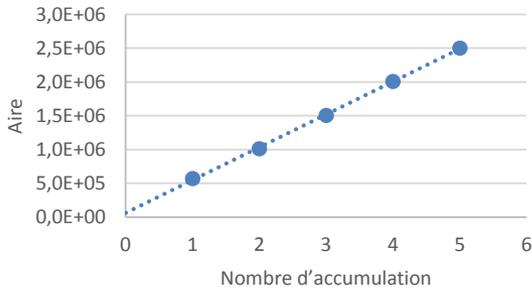
Analyse d'un composé de facteur de capacité K' forte (butylparaben)



- SampleName butylparabene 1 piege+ elution
- SampleName butylparabene 2 pieges + elution
- SampleName butylparabene 3 pieges + elution
- SampleName butylparabene 4 pieges+elution
- SampleName butylparabene 5 pieges + elution

- SampleName butylparabene 1 piege+ elution
- SampleName butylparabene 2 pieges + elution
- SampleName butylparabene 3 pieges + elution
- SampleName butylparabene 4 pieges + elution
- SampleName butylparabene 5 pieges + elution

- SampleName butylparabene 1 piege+ elution
- SampleName butylparabene 2 pieges + elution
- SampleName butylparabene 3 pieges + elution
- SampleName butylparabene 4 pieges + elution
- SampleName butylparabene 5 pieges + elution





Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

L'accumulation sur le piège est quantitative

Améliorer la sensibilité

Améliorer la LOD/LOQ

Stocker pour une autre analyse

Piégeage d'un groupe de pics

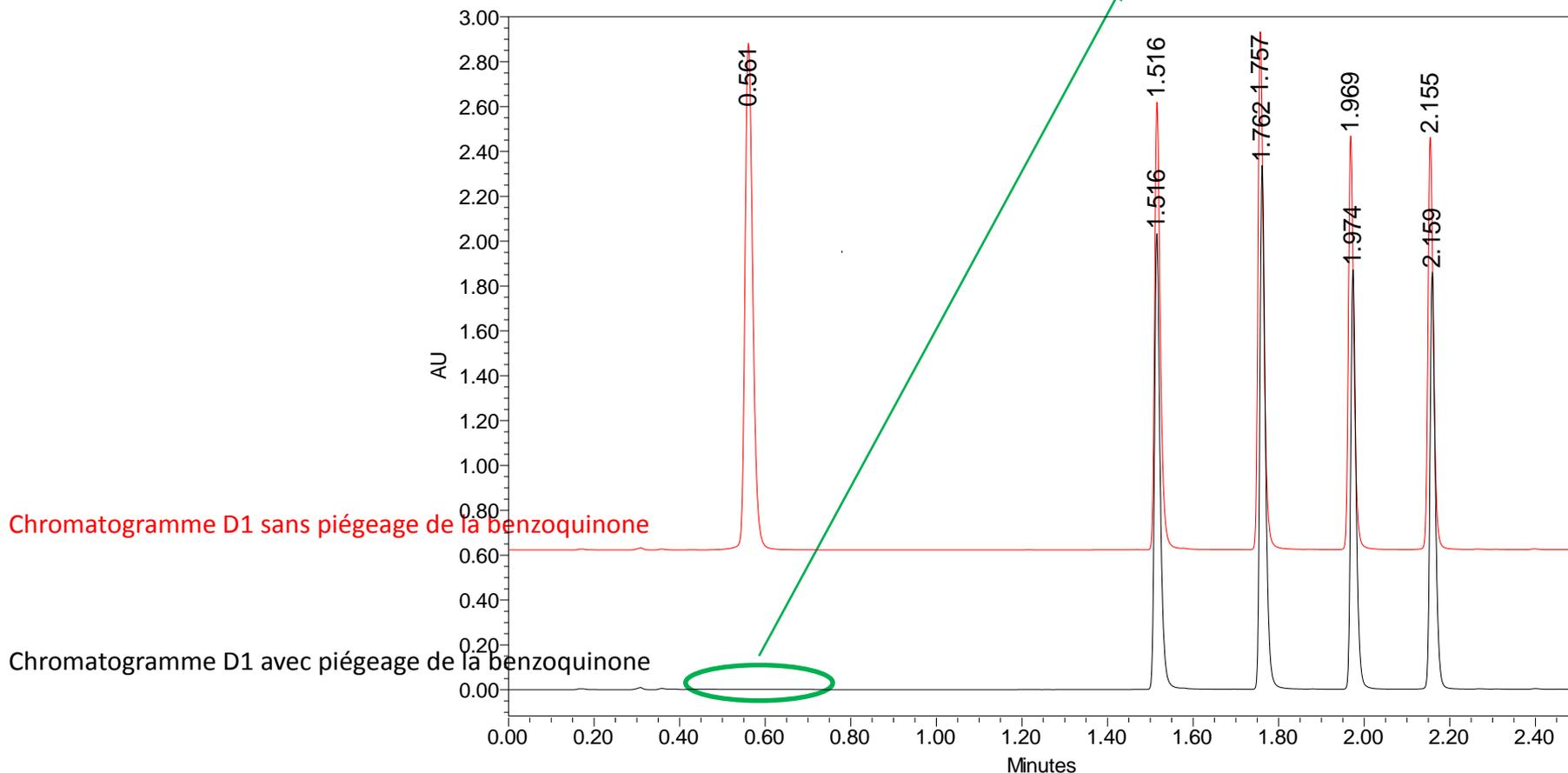
...

Perspectives d'applications multiples



Question 4 : le cutting perturbe-t-il le reste du chromatogramme de 1ere dimension?

Absence du pic de la benzoquinone piégée



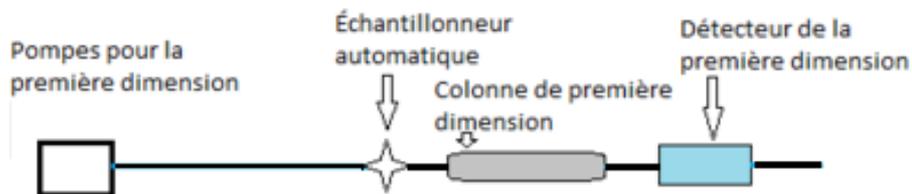
Le piégeage ne perturbe pas le reste du chromatogramme de la dimension 1.



Client 1 : Le pic observé en stabilité est-il issu du même composé que celui observé en dégradation forcée en milieu oxydant.

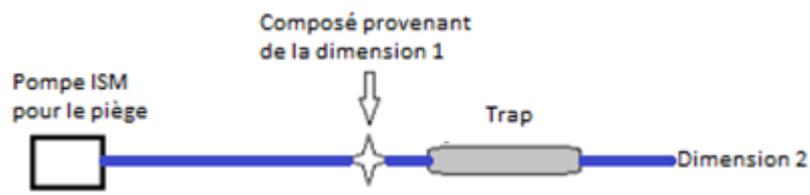
Conditions chromatographiques du test

Première dimension (circuit 1)



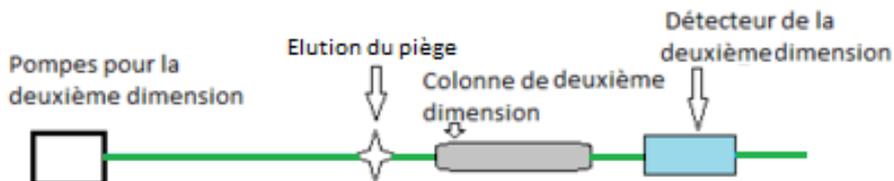
Chromatographie de la dimension 1
Core-shell 100x4,6 2,7 μm C18
Circuit 1 = gradient H3PO4/MeOH - 1 ml/min
Détection UV

Piégeage (circuit 2)



Trap : Xbridge C18 20x2,1 - 5 μm
Circuit 2 = Acide formique 0,1 % v/v - 1,5 ml/min

Deuxième dimension (circuit 3)

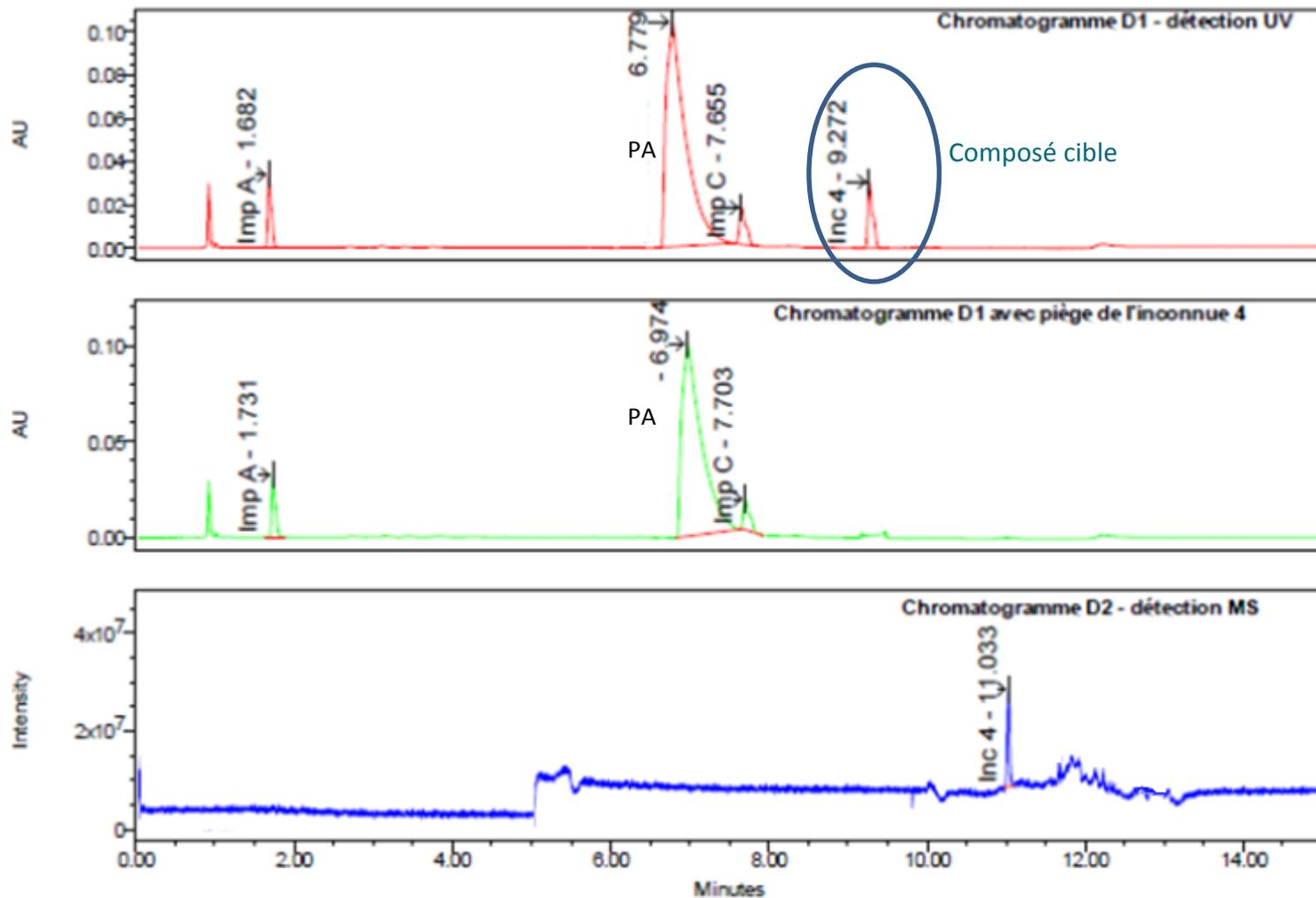


Chromatographie de la dimension 2
Colonne HSS C18 50-2,1 1,7 μm
Circuit 3 = Acide formique 0,1 % v/v/ACN - 0,6 ml/min
Détection QDA ES+





Client 1 : Le pic observé en stabilité est-il issu du même composé que celui observé en dégradation forcée en milieu oxydant.





Client 1 : Le pic observé en stabilité est-il issu du même composé que celui observé en dégradation forcée en milieu oxydant.

Conclusions de l'étude

Spectre de masse du composé identique dans les deux échantillons

Spectres de masse obtenus avec une phase mobile de la D1 non compatible MS

Information obtenue sans modification des conditions chromatographiques de la méthode de la monographie du produit

Figure 1 : Spectre de masse impureté Inc 4 en milieu oxydant

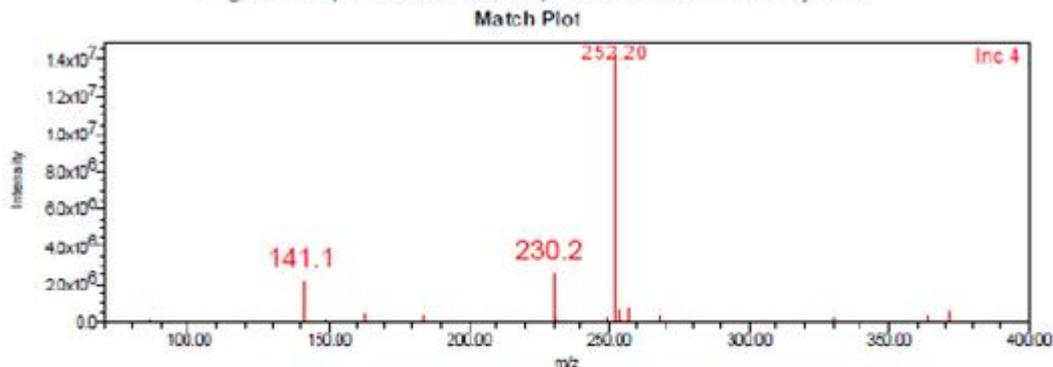
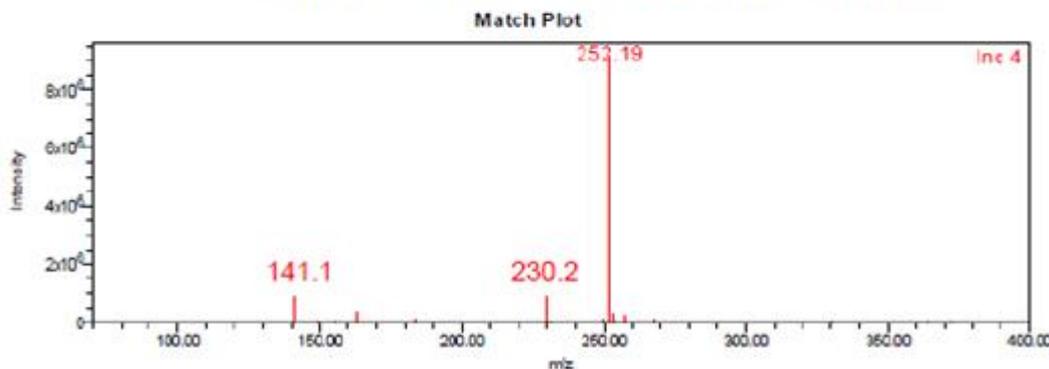
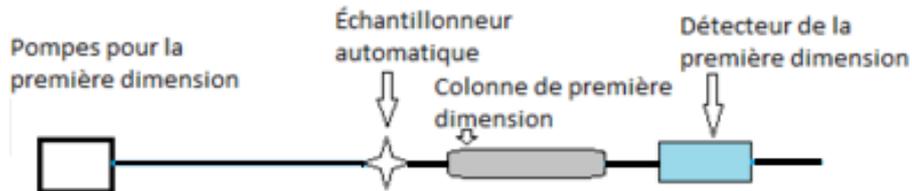


Figure 2 : Spectre de masse impureté Inc 4 comprimé T15 mois



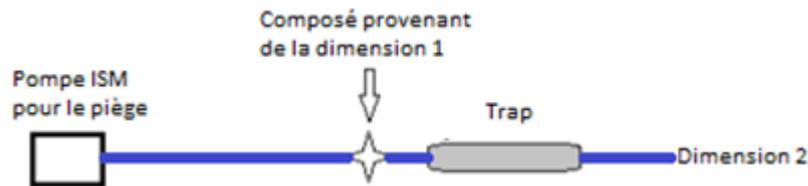
Conditions chromatographiques du test

Première dimension (circuit 1)



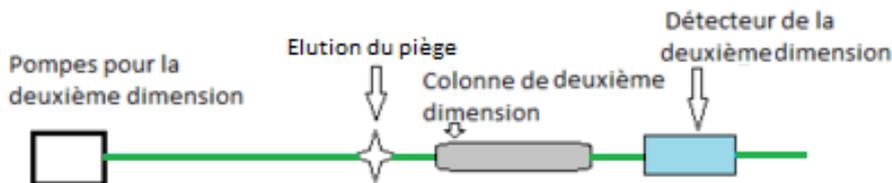
Chromatographie de la dimension 1
C18 75x4,6 1,8 μm
Circuit 1 = gradient SDS/ACN – 0,6 ml/min
Détection UV

Piégeage (circuit 2)



Trap : Xbridge C8 30x2,1 - 10 μm
Circuit 2 = Acide formique 0,1 % v/v - 1,5 ml/min

Deuxième dimension (circuit 3)

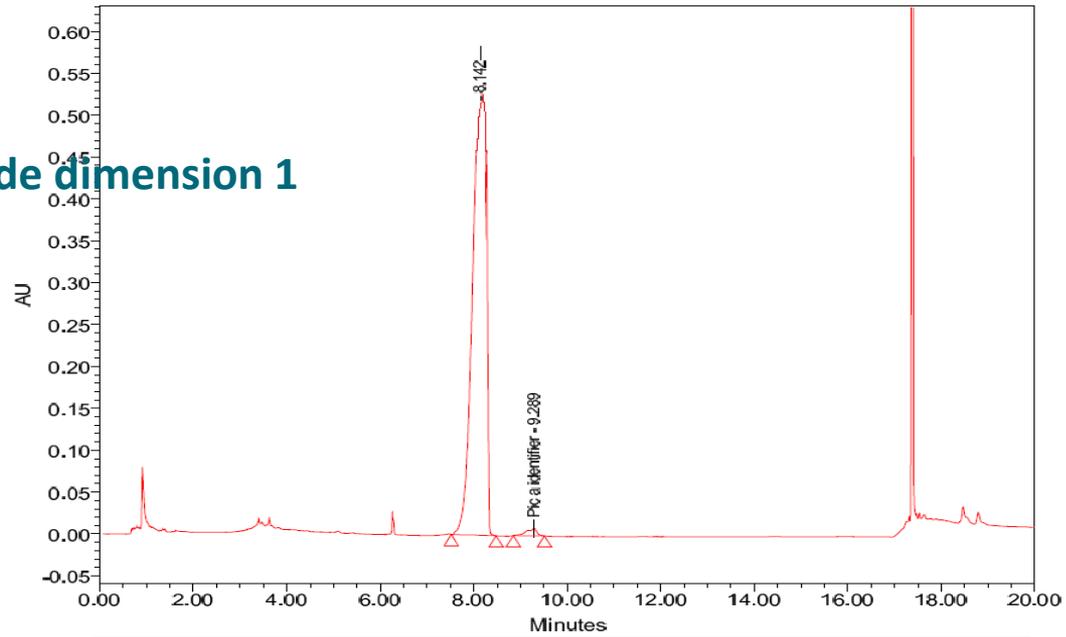


Chromatographie de la dimension 2
Colonne C18 50-2,1 1,7 μm
Circuit 3 = ACN - 0,6 ml/min
Détection QDA ES+

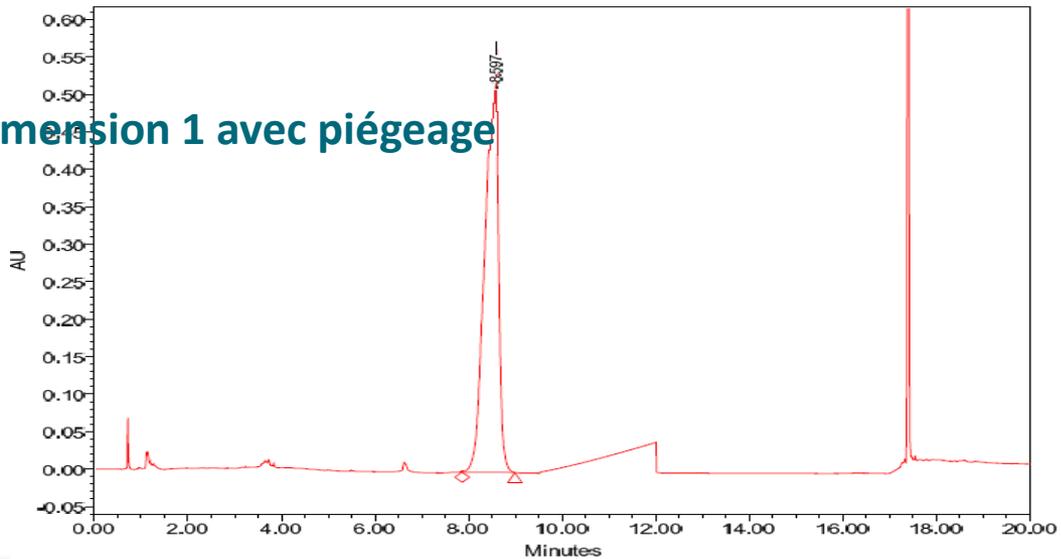


Client 2 : Comment apporter des informations sur la caractérisation d'un pic détecté dans des conditions HPLC spécifiques ?

Chromatogramme de dimension 1



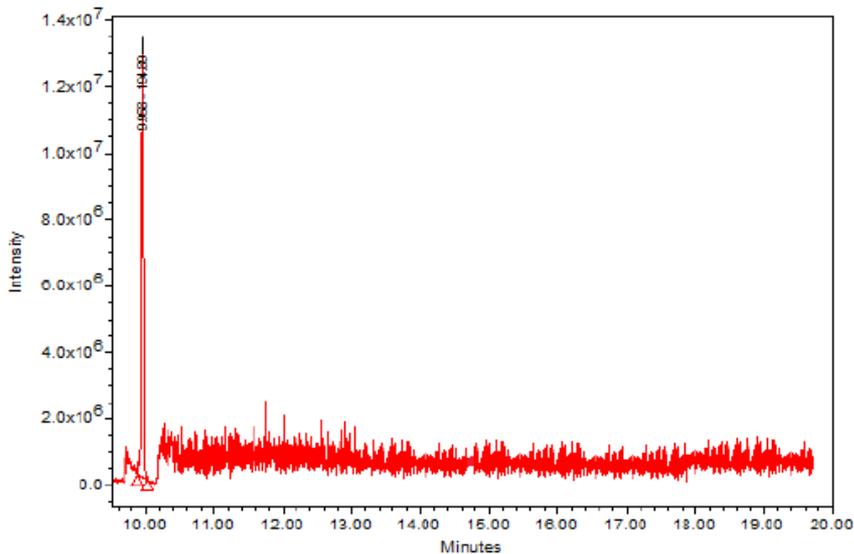
Chromatogramme de dimension 1 avec piégeage





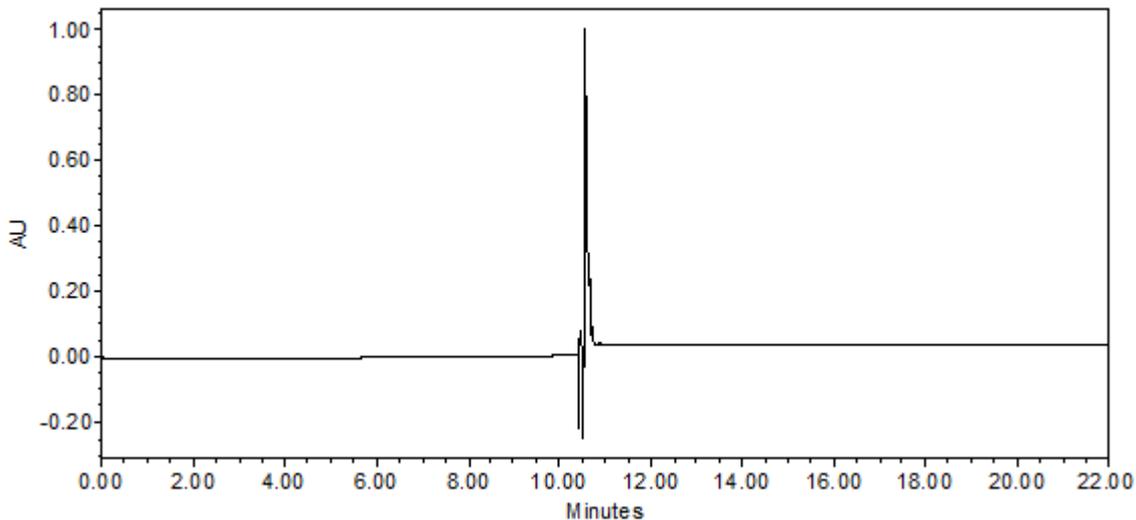
Client 2 : Comment apporter des informations sur la caractérisation d'un pic détecté dans des conditions HPLC spécifiques ?

Chromatogramme de dimension 2



Détection MS (ES+/-)

Détection UV 278 nm

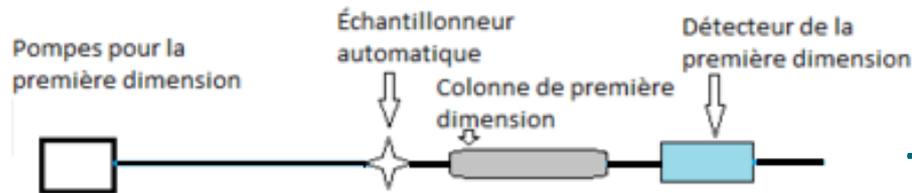




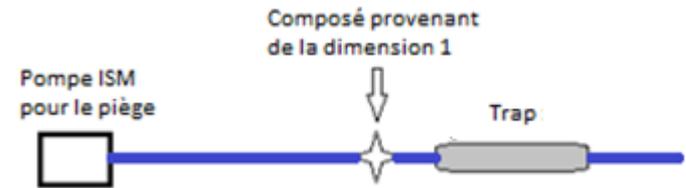
Client 2 : Comment apporter des informations sur la caractérisation d'un pic détecté dans des conditions HPLC spécifiques ?

Conditions chromatographiques de l'accumulation

Première dimension



Piégeage



n répétitions

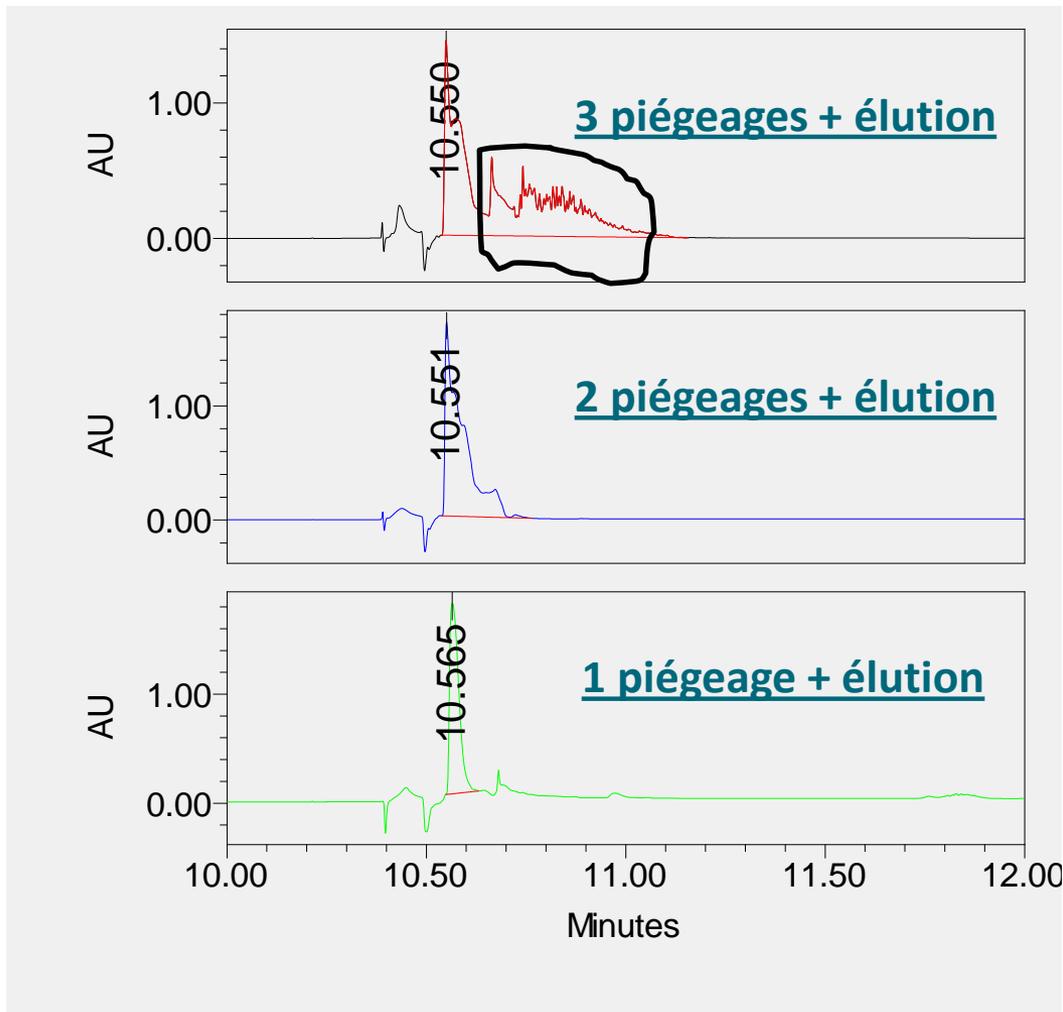
Chromatographie de la dimension 1
C18 75x4,6 1,8 μm
Circuit 1 = gradient SDS/ACN – 0,6 ml/min
Détection UV

Trap : Xbridge C8 30x2,1 - 10 μm
Circuit 2 = Acide formique 0,1 % v/v
1,5 ml/min

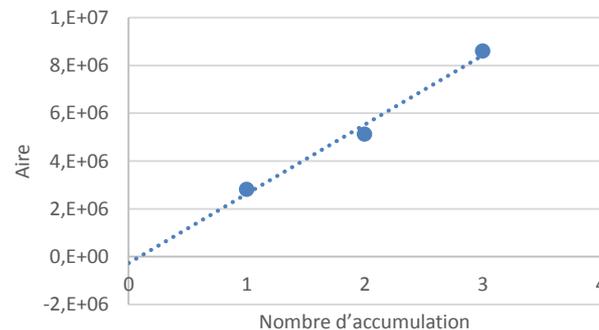


Client 2 : Comment apporter des informations sur la caractérisation d'un pic détecté dans des conditions HPLC spécifiques ?

Vérification de l'accumulation sur le piège



	Dimension 2
3 piégeages	8 609 418
2 piégeages	5 127 914
1 piégeage	2 823 059

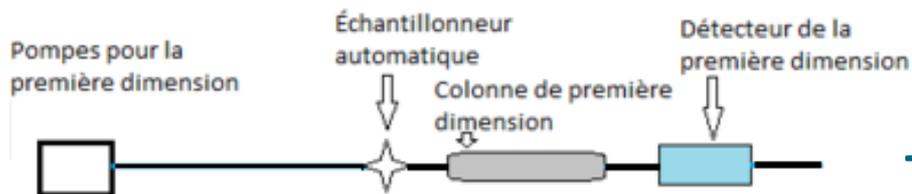




Client 2 : Comment apporter des informations sur la caractérisation d'un pic détecté dans des conditions HPLC spécifiques ?

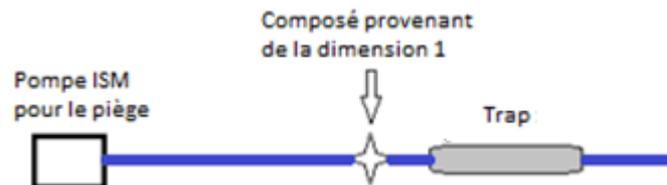
Conditions chromatographiques de l'accumulation puis de la collecte

Première dimension



Chromatographie de la dimension 1
C18 75x4,6 1,8 µm
Circuit 1 = gradient SDS/ACN – 0,6 ml/min
Détection UV

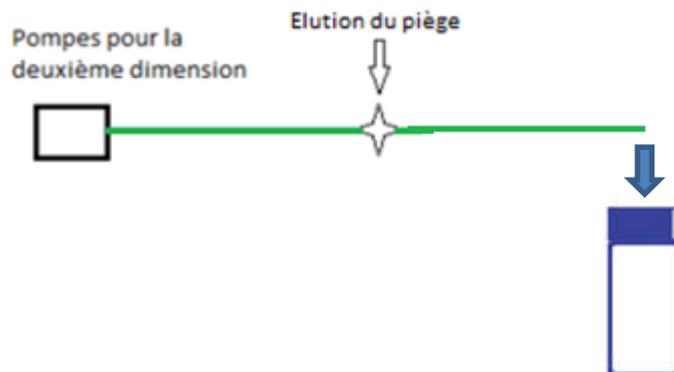
Piégeage



Trap : Xbridge C8 30x2,1 - 10 µm
Circuit 2 = Acide formique 0,1 % v/v
1,5 ml/min

n répétitions

Deuxième dimension



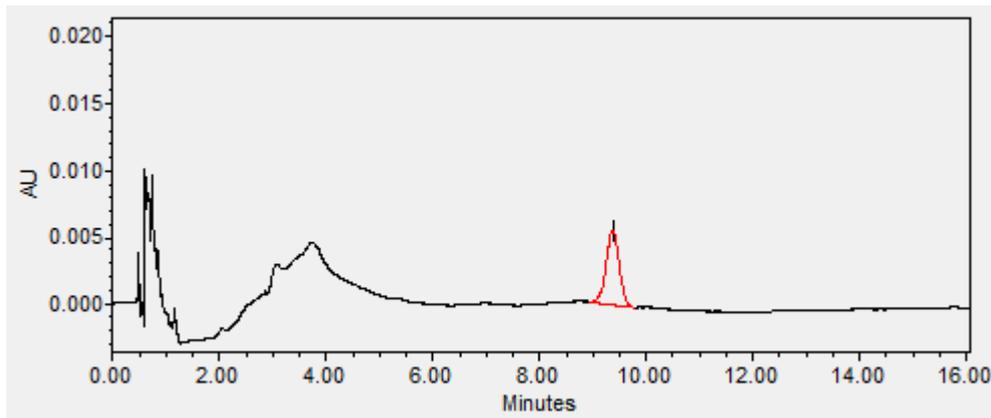
Chromatographie de la dimension 2
Colonne C18 – Circuit 3 = ACN





Client 2 : Comment apporter des informations sur la caractérisation d'un pic détecté dans des conditions HPLC spécifiques ?

Analyse de la fraction recueillie après évaporation



Vérification dans les conditions D1



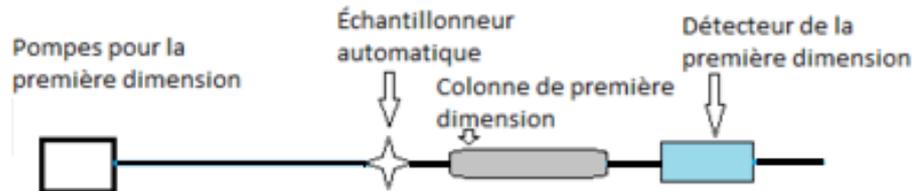
MS impact électronique
En cours



Client 3 : Comment obtenir le isomérique d'un API sans l'interférence des impuretés ?

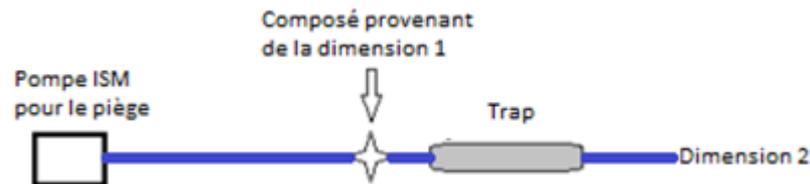
Conditions chromatographiques du test

Première dimension (circuit 1)



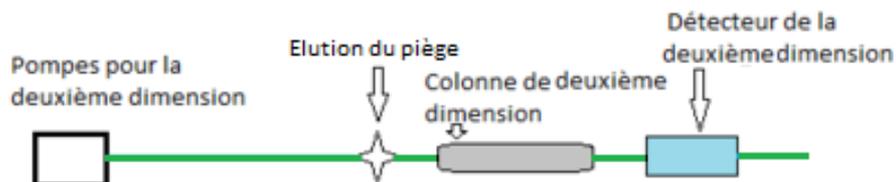
Chromatographie de la dimension 1
C18 50x4,6 1,8 μm
Circuit 1 = gradient eau/ACN – 0,4 ml/min
Détection UV

Piégeage (circuit 2)



Trap : Xbridge C8 30x2,1 - 10 μm
Circuit 2 = Acide formique 0,1 % v/v - 1,0 ml/min

Deuxième dimension (circuit 3)

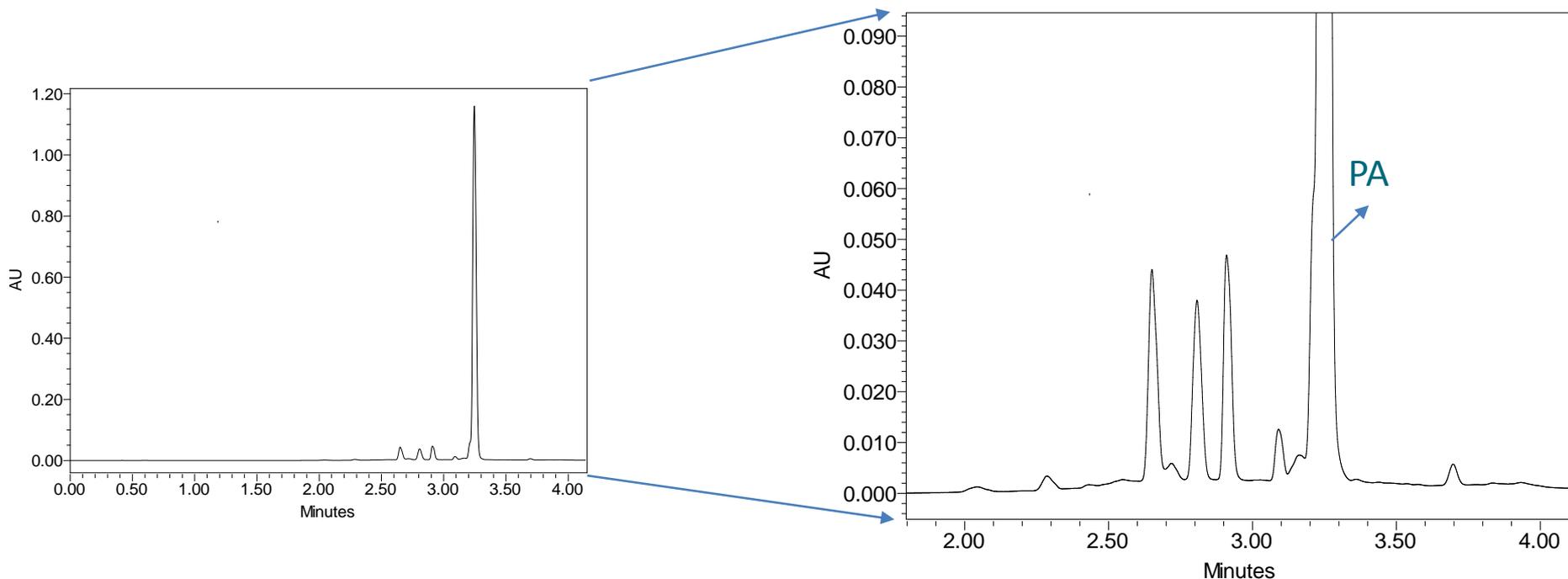


Chromatographie de la dimension 2
Hypercarb 250-2,1 5 μm
Circuit 3 = Isocratique eau/ACN – 1 ml/min
Détection UV



Client 3 : Comment obtenir le isomérique d'un API sans l'interférence des impuretés ?

Chromatogramme D1 : séparation des impuretés du PA

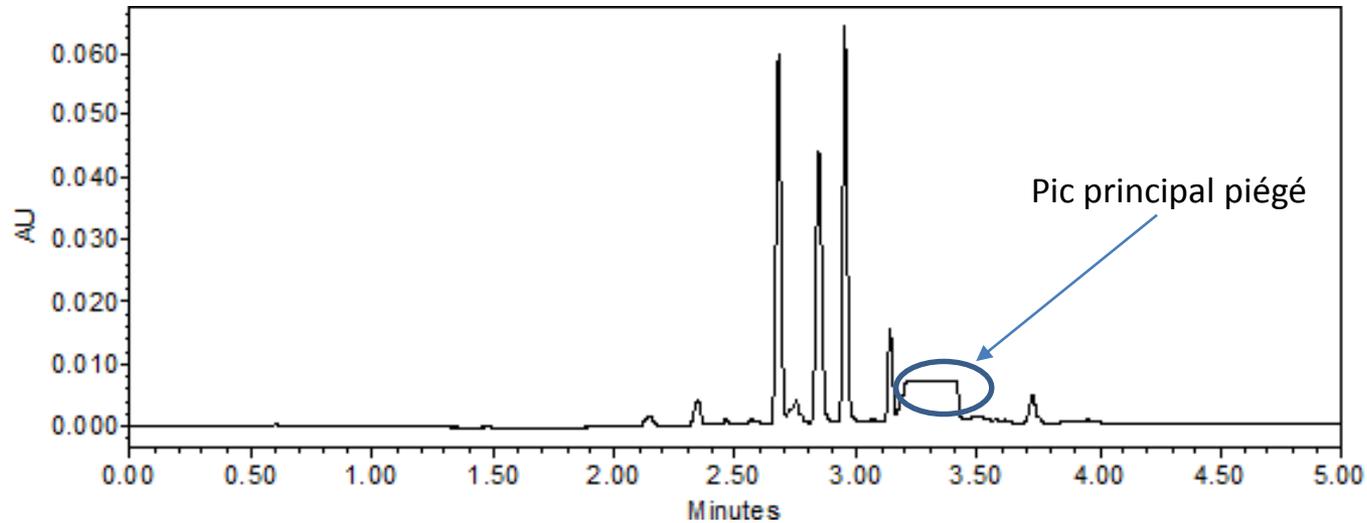


Mise en place de la D2 pour étude des isomères du PA

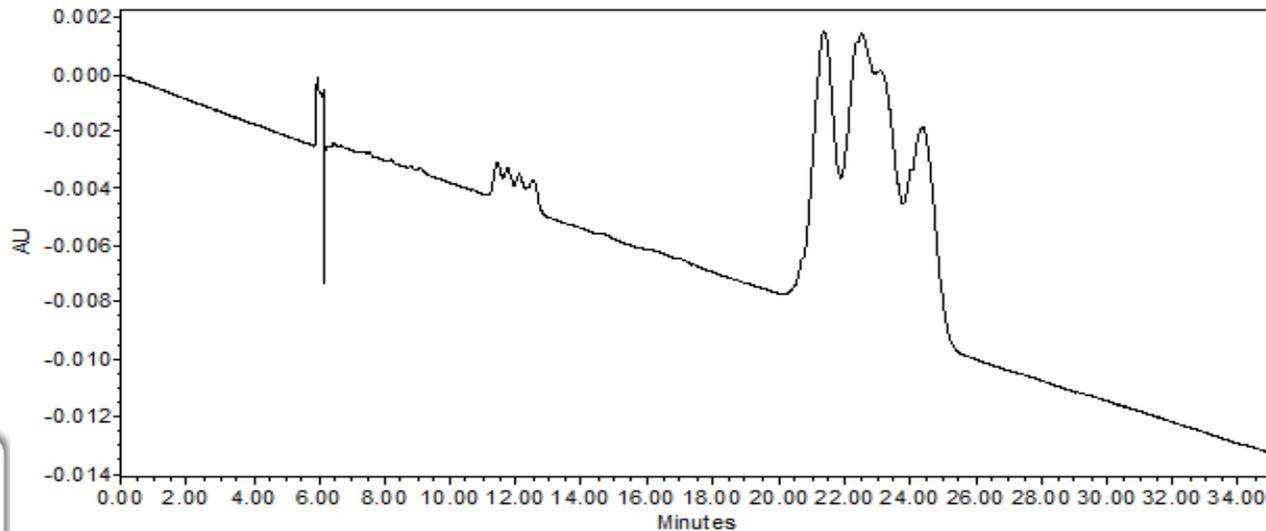


Client 3 : Comment obtenir le isomérique d'un API sans l'interférence des impuretés ?

Chromatogramme de dimension 1 avec piégeage

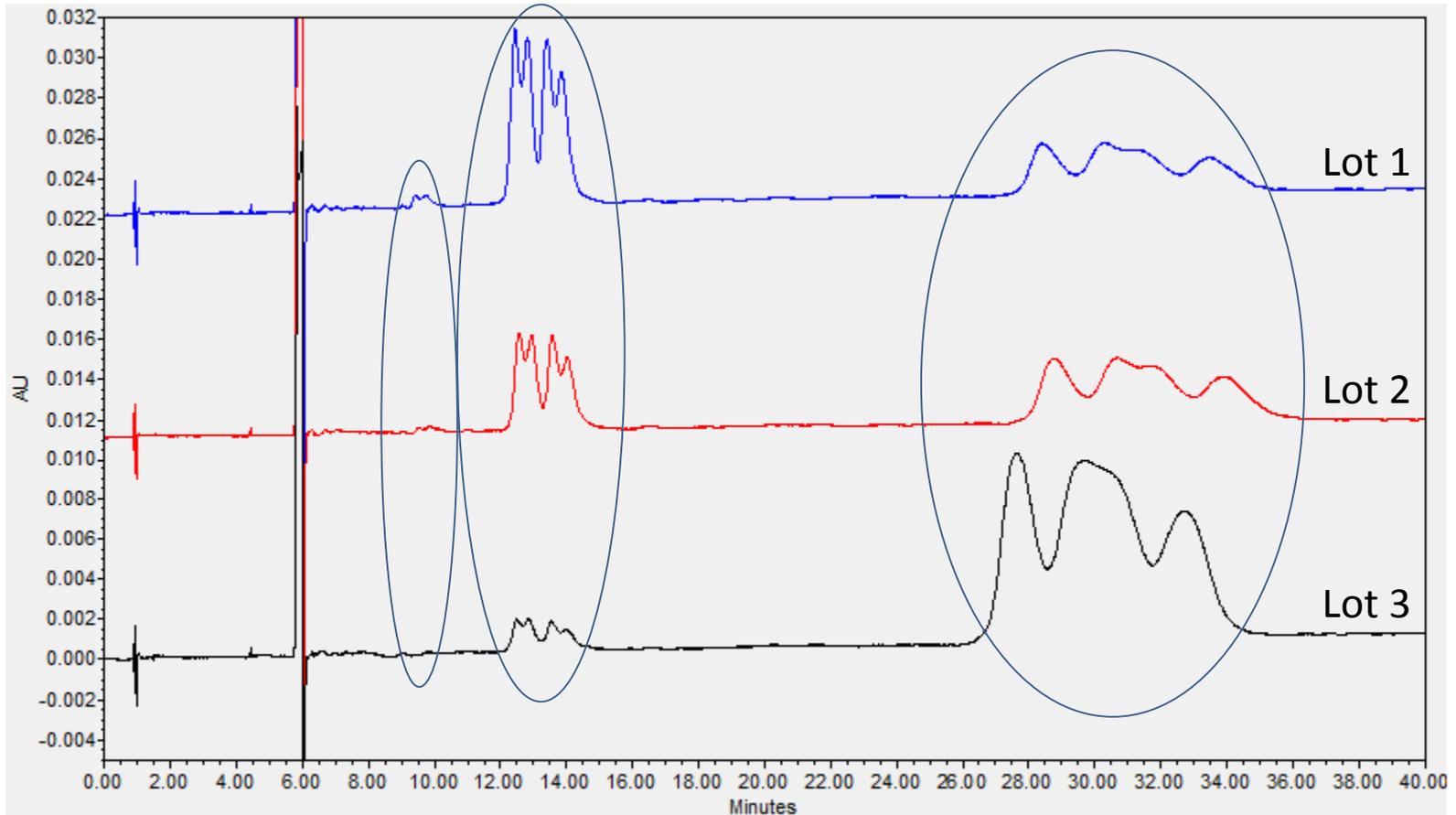


Chromatogramme de dimension 2





Client 3 : Comment obtenir le isomérique d'un API sans l'interférence des impuretés ?



L'analyse des isomères n'est pas perturbée par les impuretés



- Un outil complémentaire à une plateforme de développement
- La LC2D apporte des informations sur la spécificité des méthodes LC
- Peu de contraintes sur les conditions chromatographiques de la première dimension
- La LC2D est une solution pour couplage LC/MS utilisant des phases mobiles incompatible avec la MS.
- L'accumulation sur le piège peut être une solution alternative pour l'étude structurale d'un composé et la recherche de traces.
- Orthogonalité de la LC2D.
- Utilisation simple et rapide.

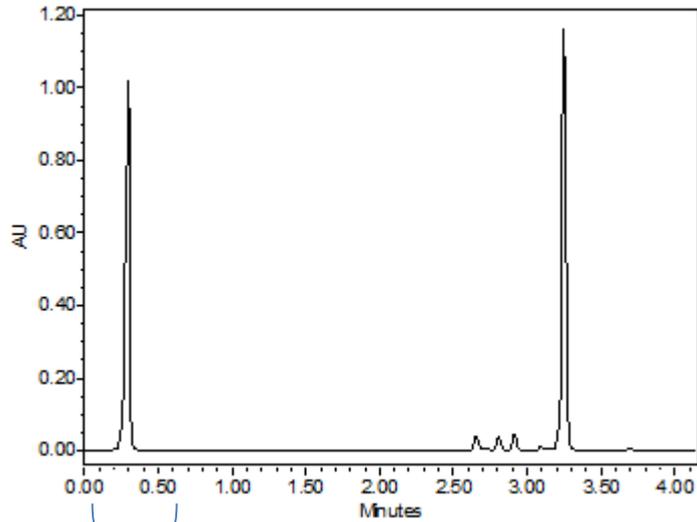
Perspectives :

- Orthogonalité Hilic/phase inverse/SEC...
- Complément de validation des méthodes dans la spécificité
- Intégration d'une méthode L2D dans une monographie
-



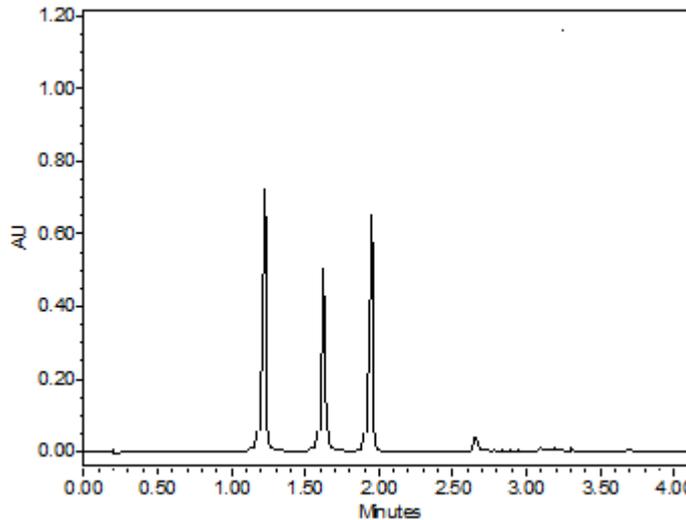


Difficulté à séparer l'ensemble des composés recherchés dans une seule méthode



Chromatogramme de dimension 1

Chromatogramme de dimension 2





Merci de votre attention

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



Floriana Fernandez

<http://blog.pharmaphysic.fr>
<http://www.pharmaphysic.fr>

Mail: mfoulon@pharmaphysic.fr

Mail: fpiolet@pharmaphysic.fr

