

## 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.



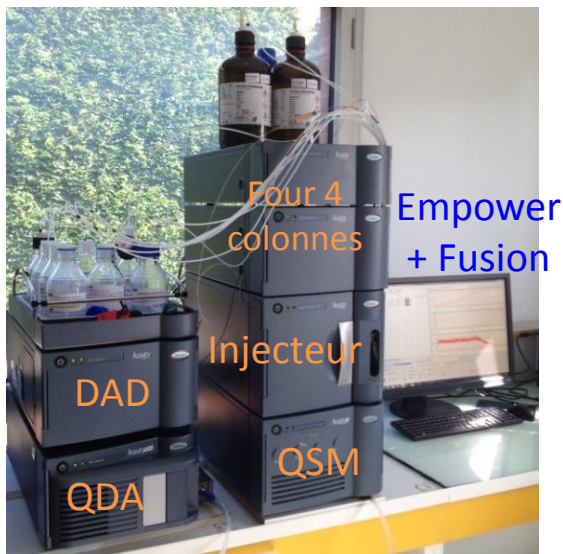


# Introduction – Plateforme de développement LC



## Plateforme de développement

UHPLC/DAD/MS

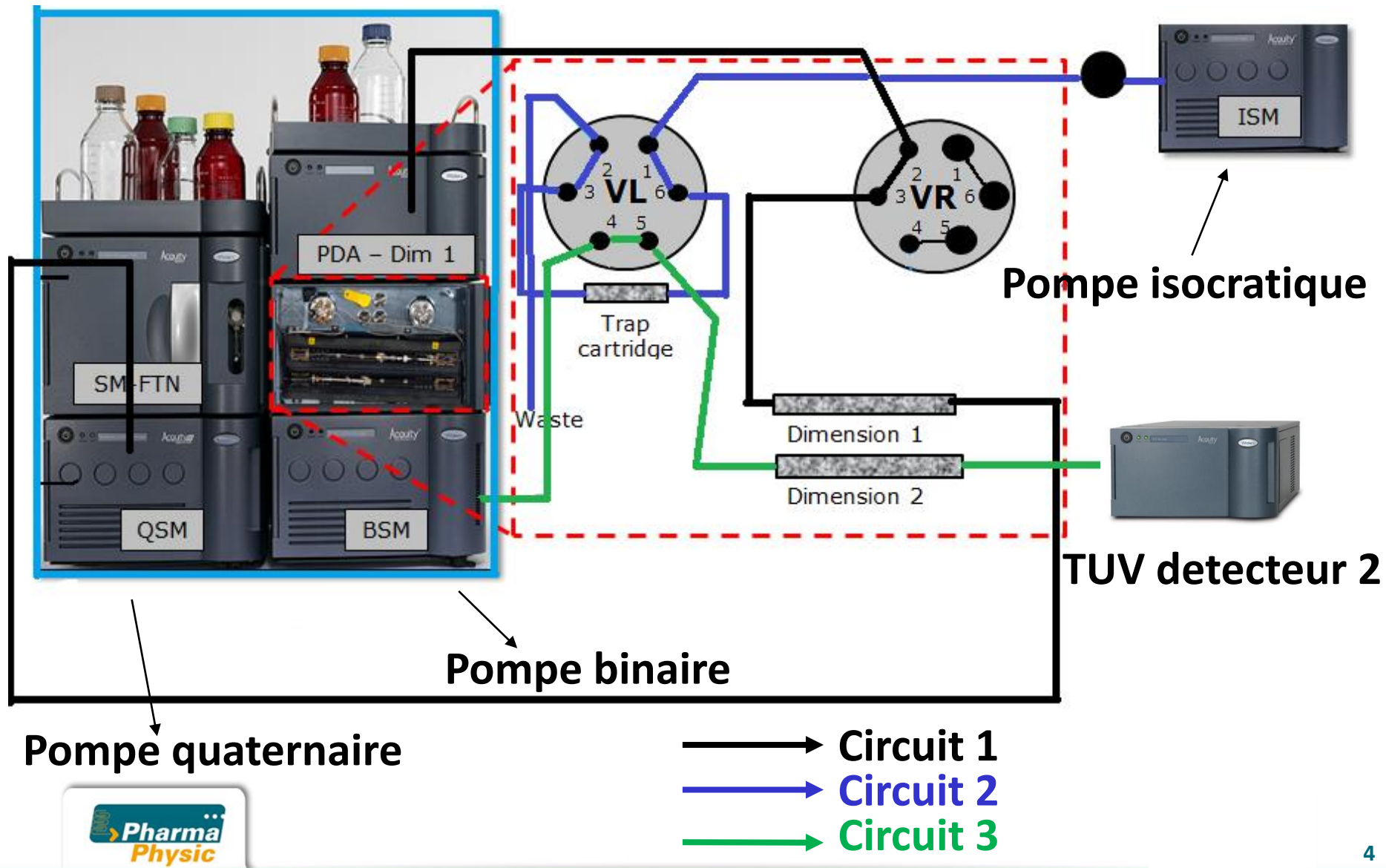


LC2D/DAD/UV



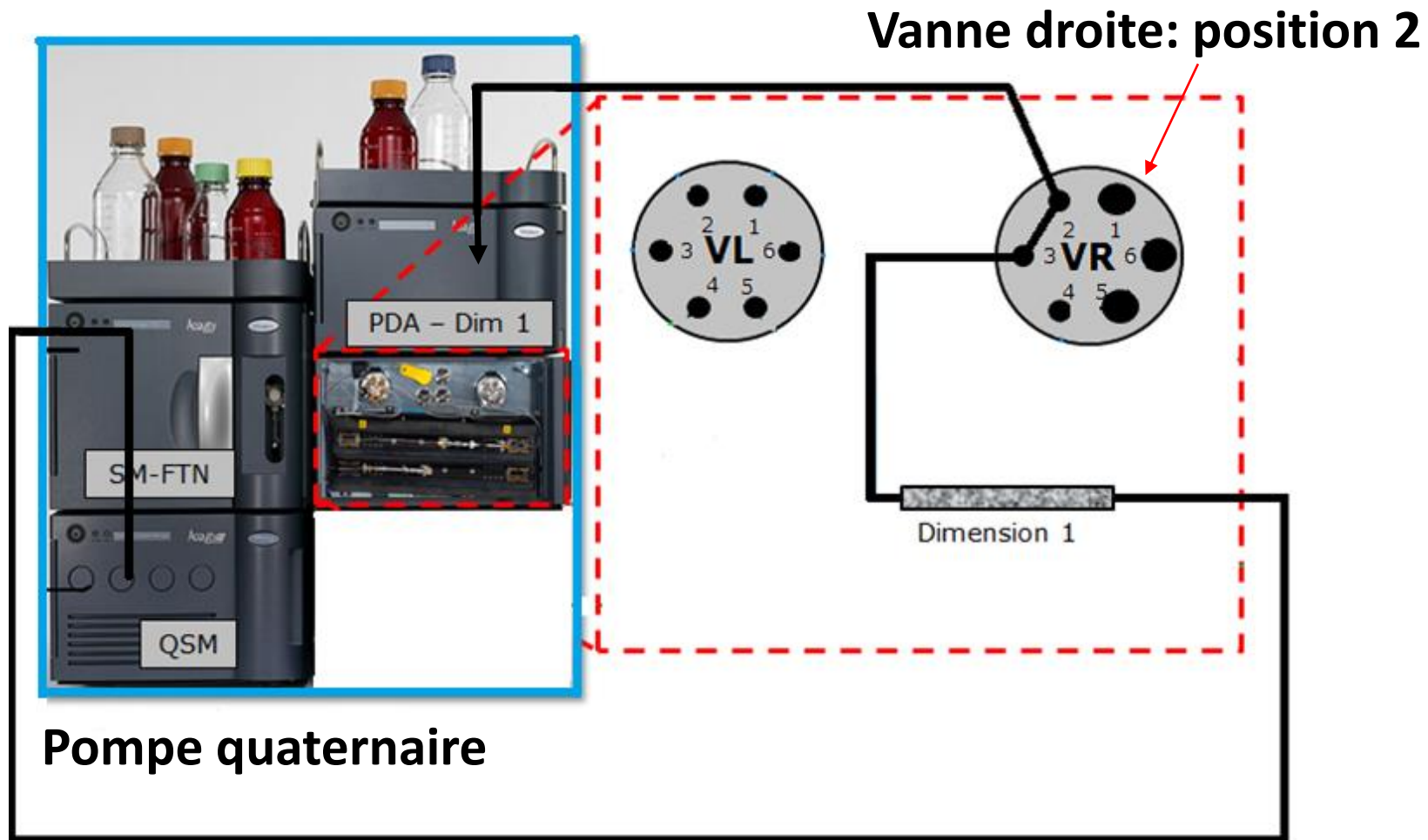


# Description générale du système LC 2D





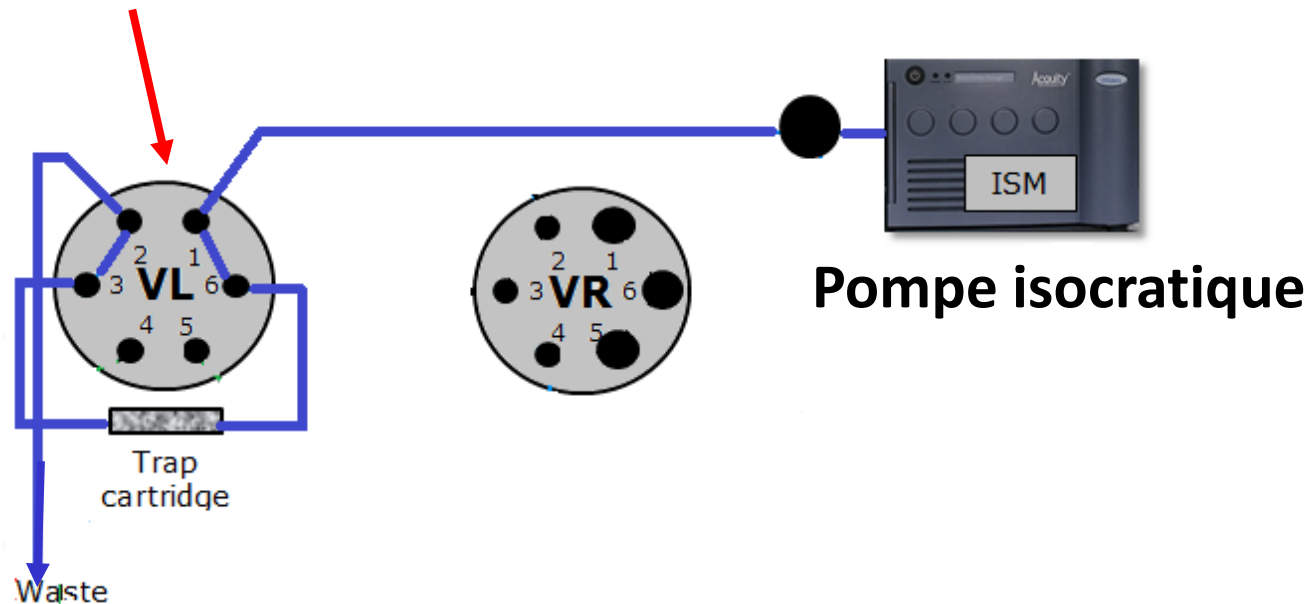
# Circuit 1 alimenté par la pompe quaternaire





# Circuit 2 alimenté par la pompe isocratique

Vanne de gauche: position 2



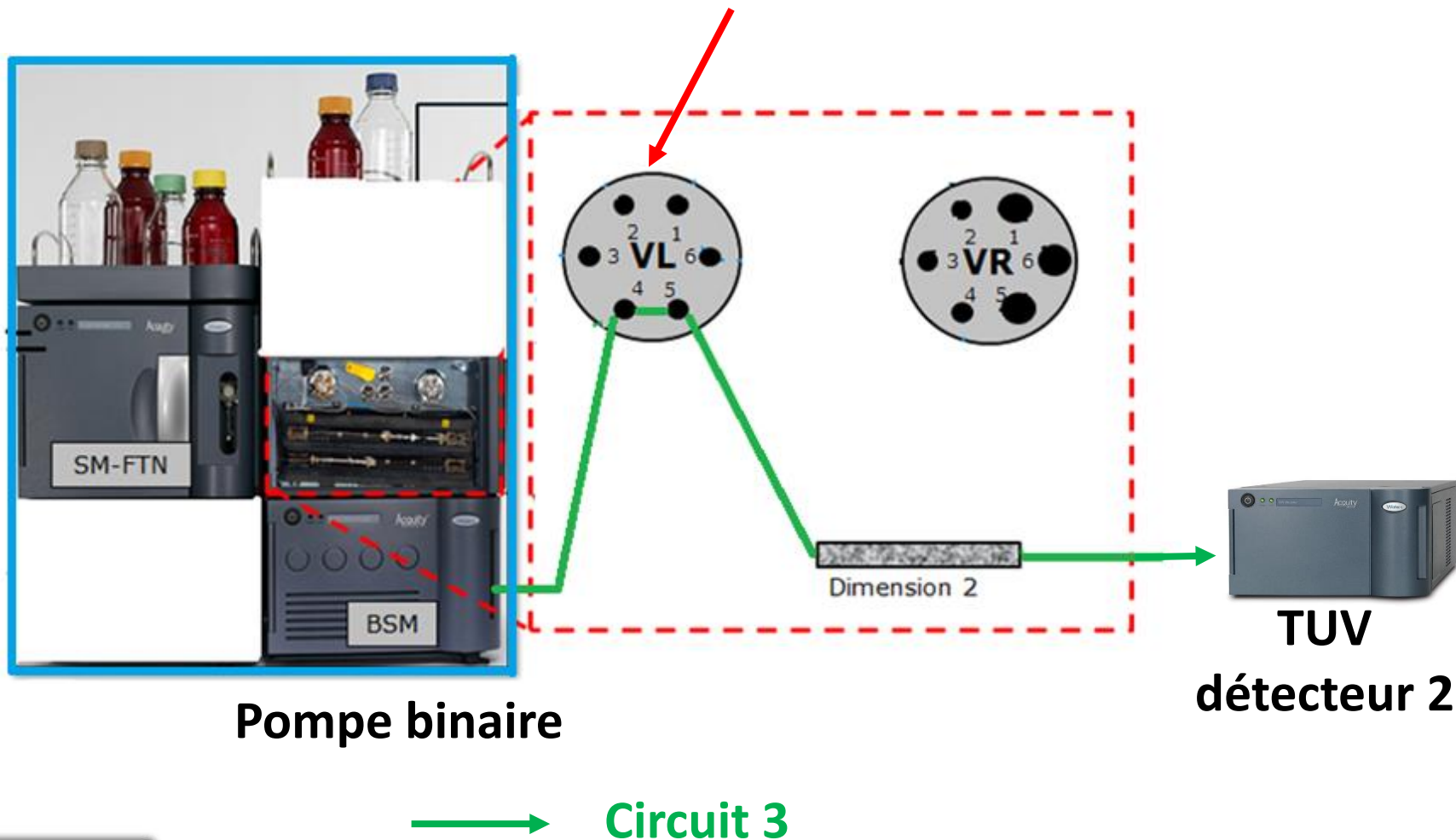
→ Circuit 2





## Circuit 3 alimenté par la pompe binaire

Vanne gauche: position 2



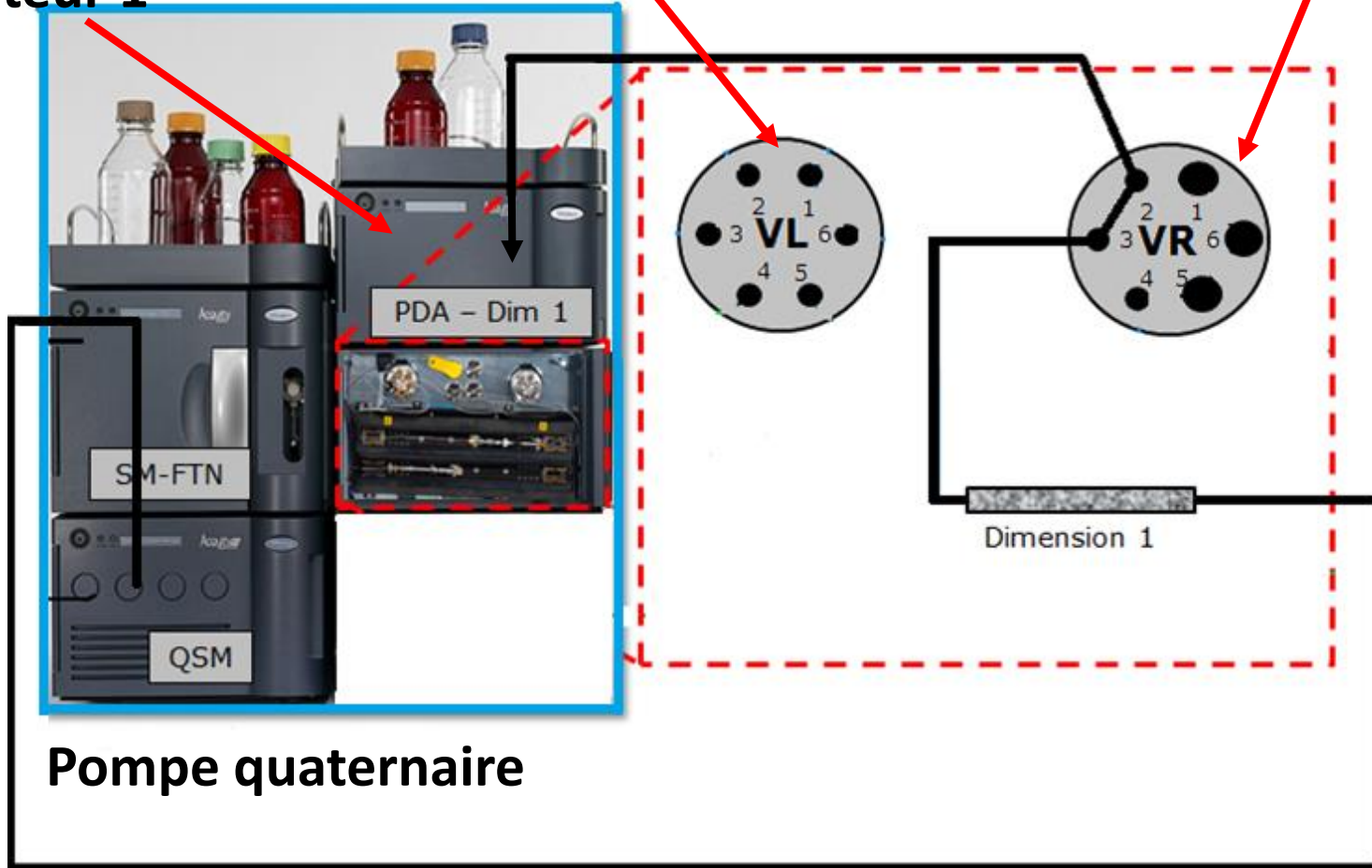


# Phase 1: Analyse en dimension 1

Vanne de gauche: position 2

Vanne de droite: position 2

Détecteur 1



→ Circuit 1 (dimension 1)

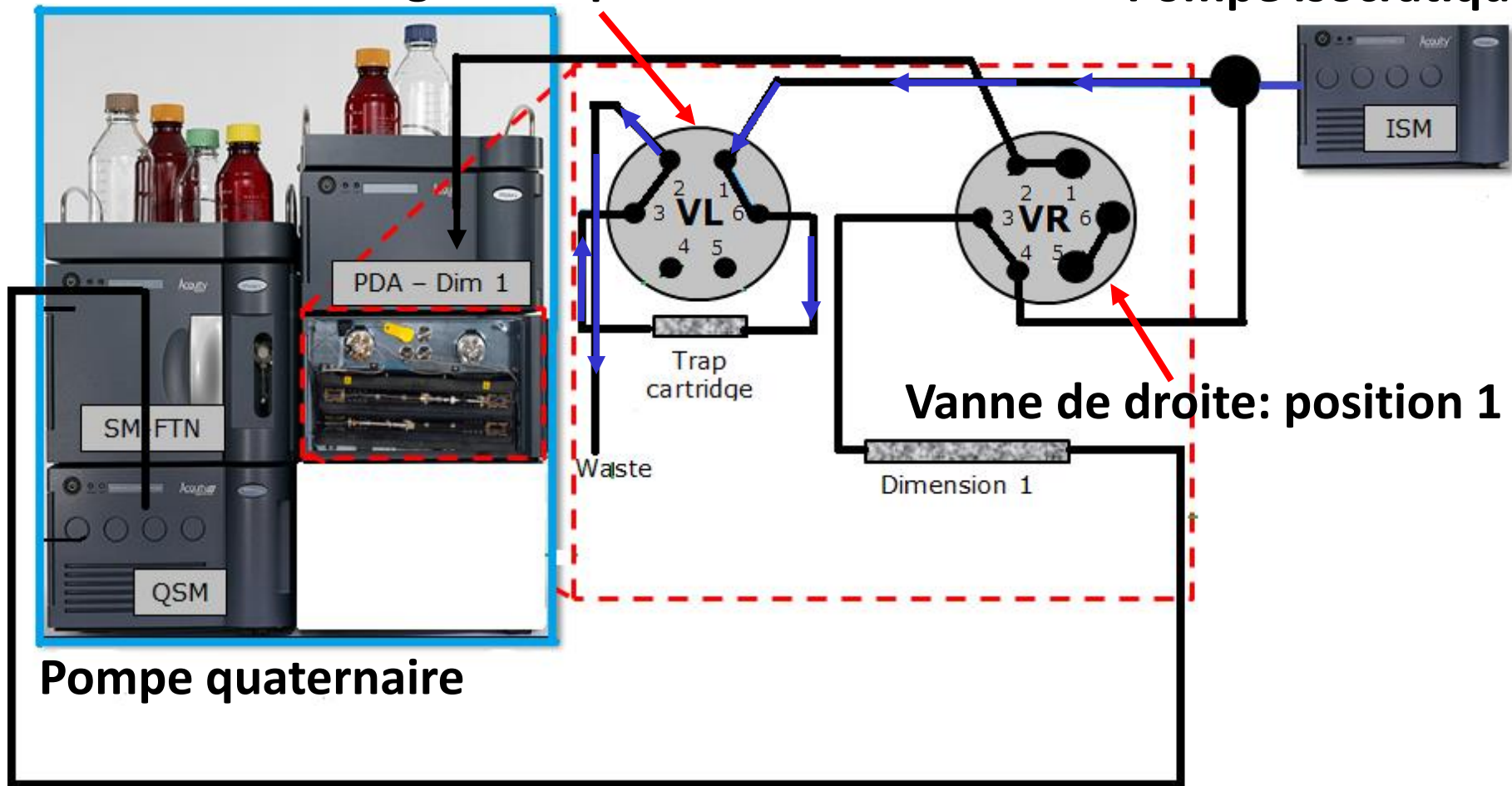




## Phase 2: piégeage sur la cartouche

Vanne de gauche: position 2

Pompe isocratique



Pompe quaternaire

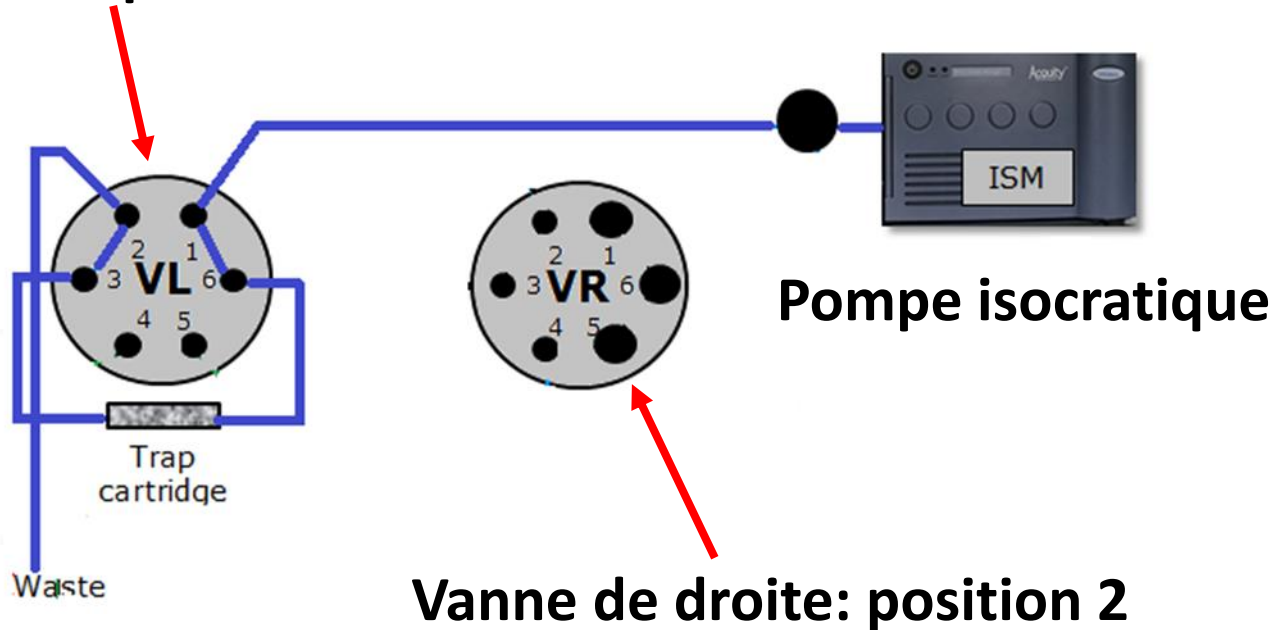
Vanne de droite: position 1

→ Circuit 1 et → Circuit 2



## Phase 3: rinçage du piège

Vanne de gauche: position 2



Vanne de droite: position 2

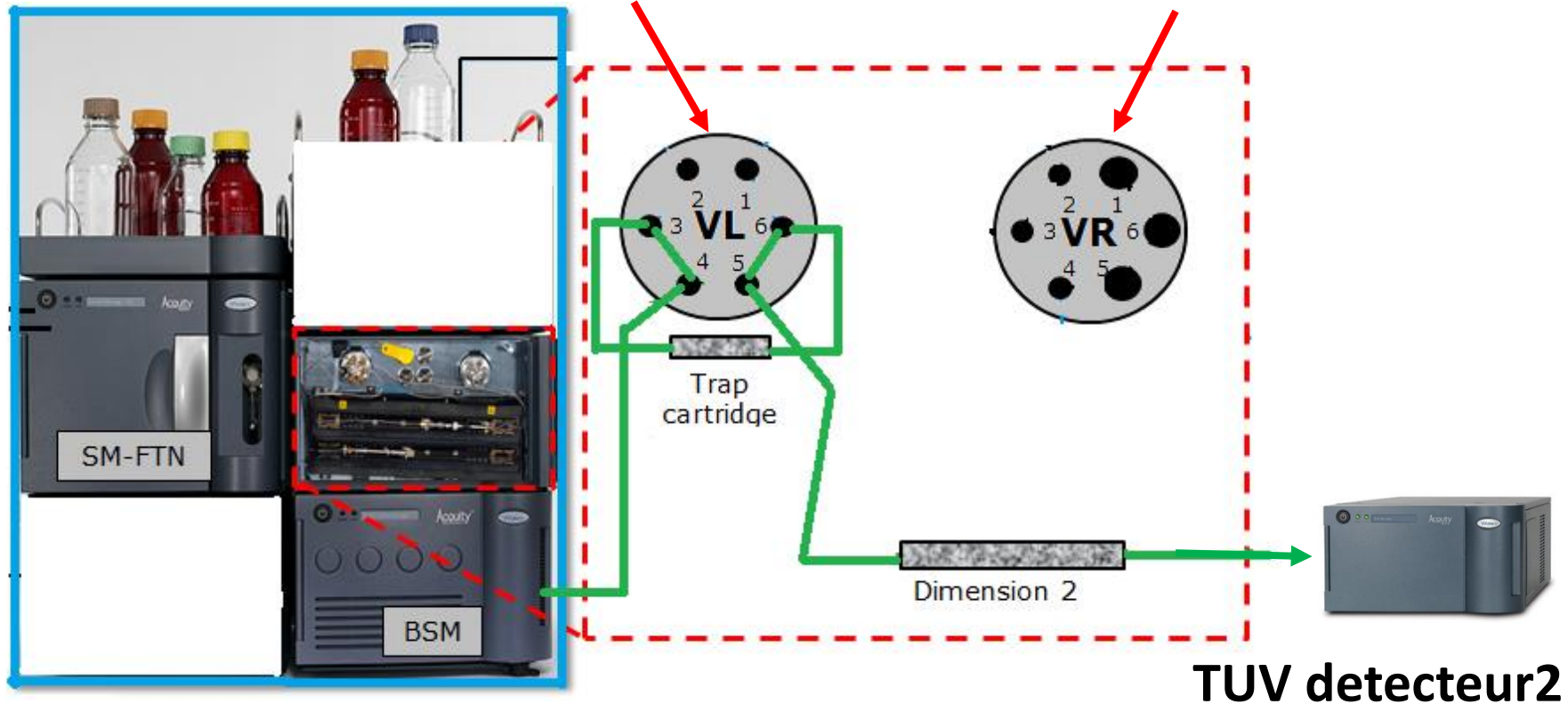
→ Circuit 2



## Phase 4 : élution du piège et analyse en dimension 2

Vanne de gauche: position 1

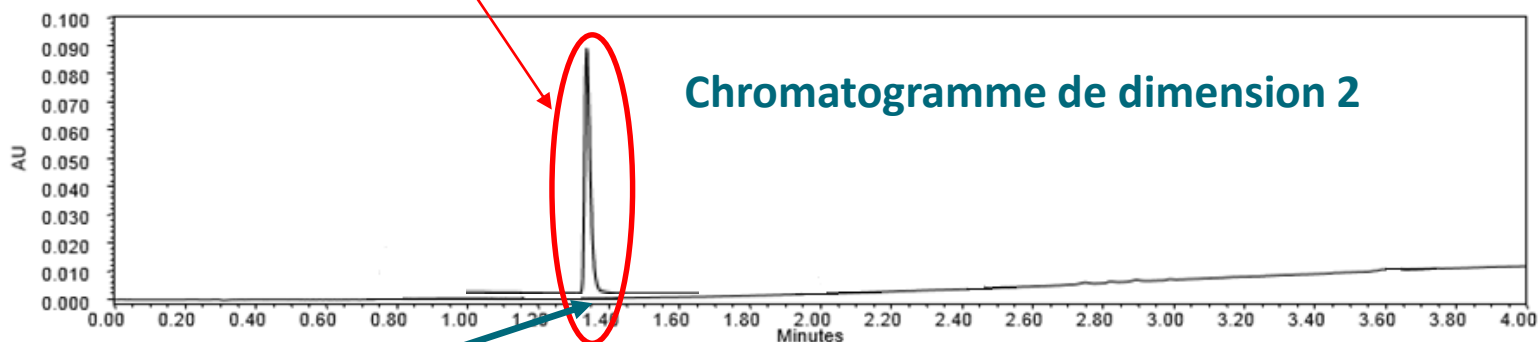
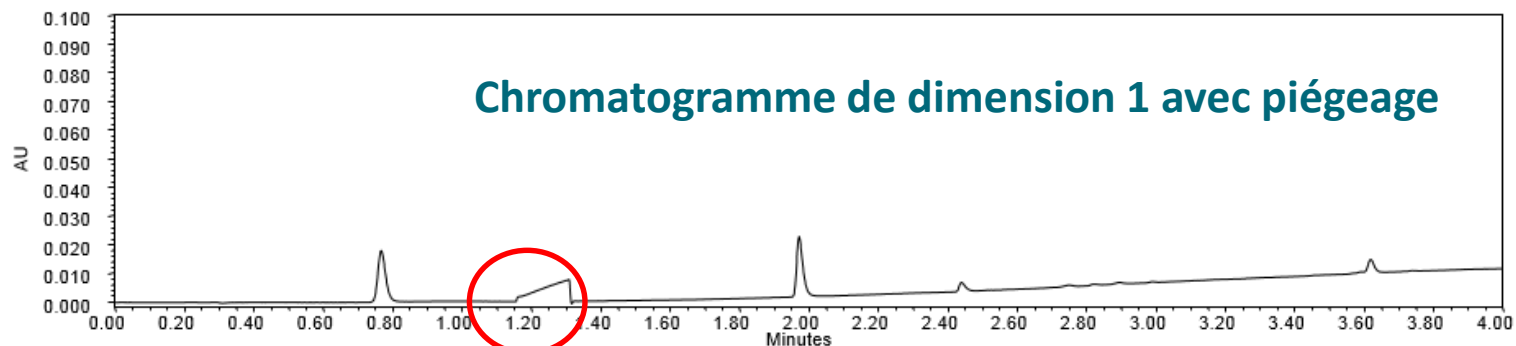
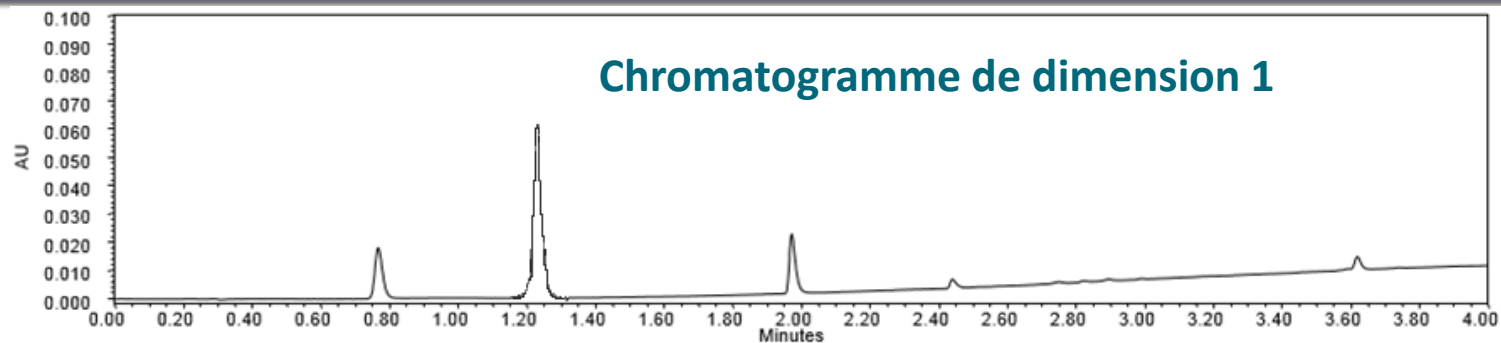
Vanne de droite: position 2



→ 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: On °C  
2: Off °C  
☒ Alarm Band: ± 5.0 °C  
☐ Shutdown all temperatures

Comment:  
[Text Box]

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?

...



# Propositions d'utilisation de la LC2D

## 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 ?

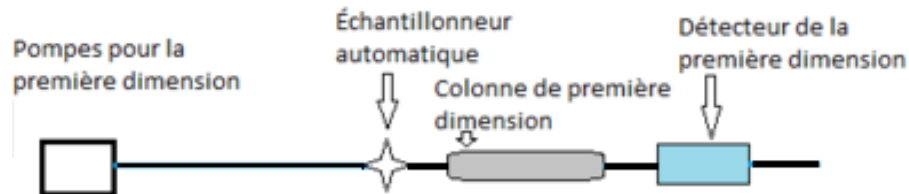
***Contrainte : La sélectivité entre les isomères de l'API et les impuretés n'a pas été obtenue après plusieurs études de développement***



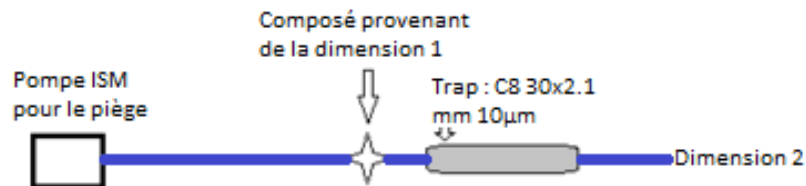
# Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2<sup>ème</sup> dimension après piégeage?

## Conditions chromatographiques du test

### Première dimension (circuit 1)

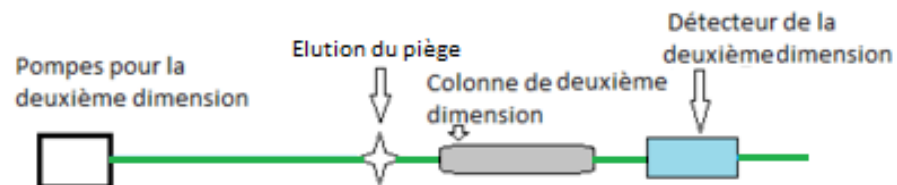


### Piégeage (circuit 2)



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

### Deuxième dimension (circuit 3)

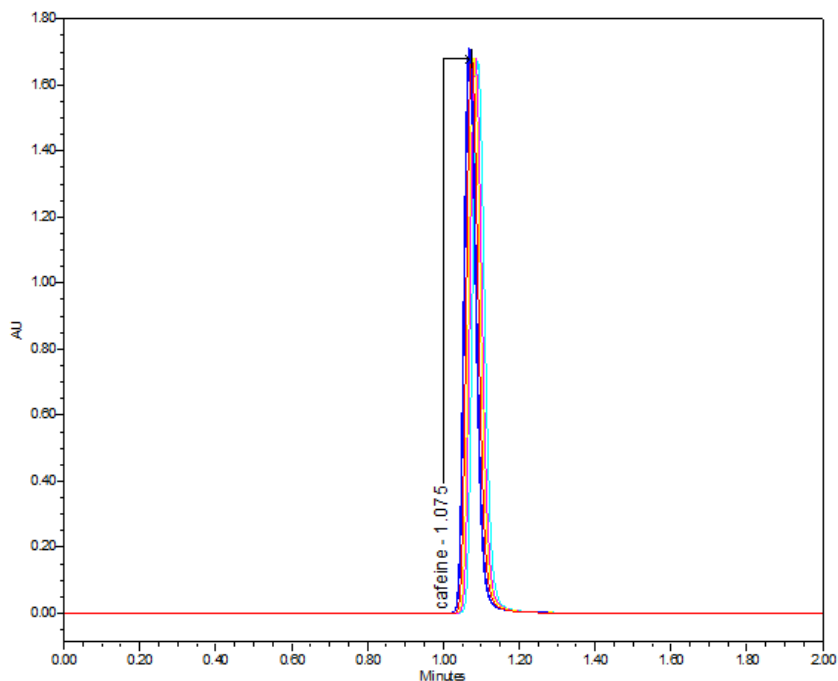




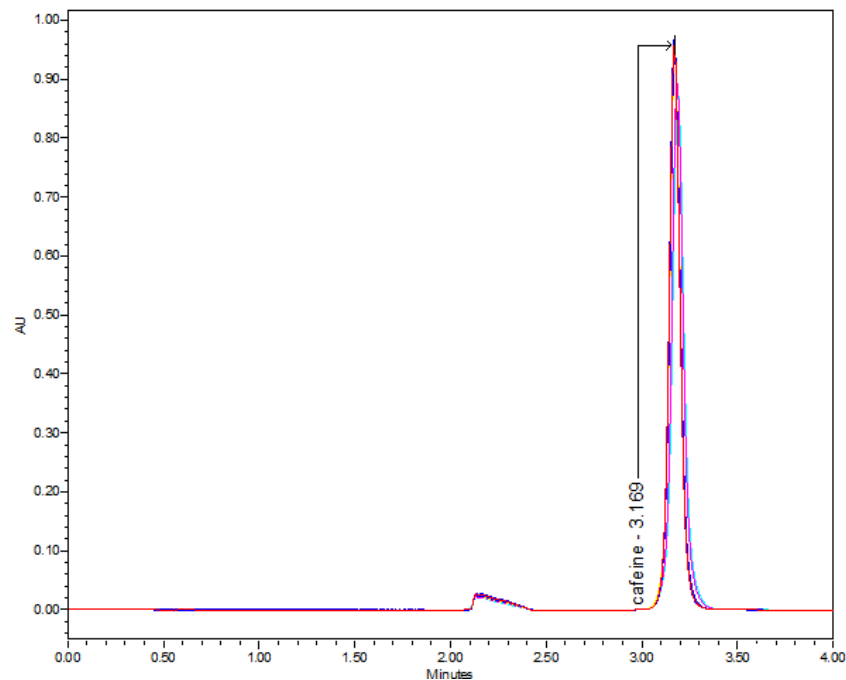
# Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2<sup>ème</sup> dimension après piégeage?

Conditions chromatographiques isocratiques (caféine)

Première dimension (6 injections)



Deuxième dimension après piégeage  
(6 injections)



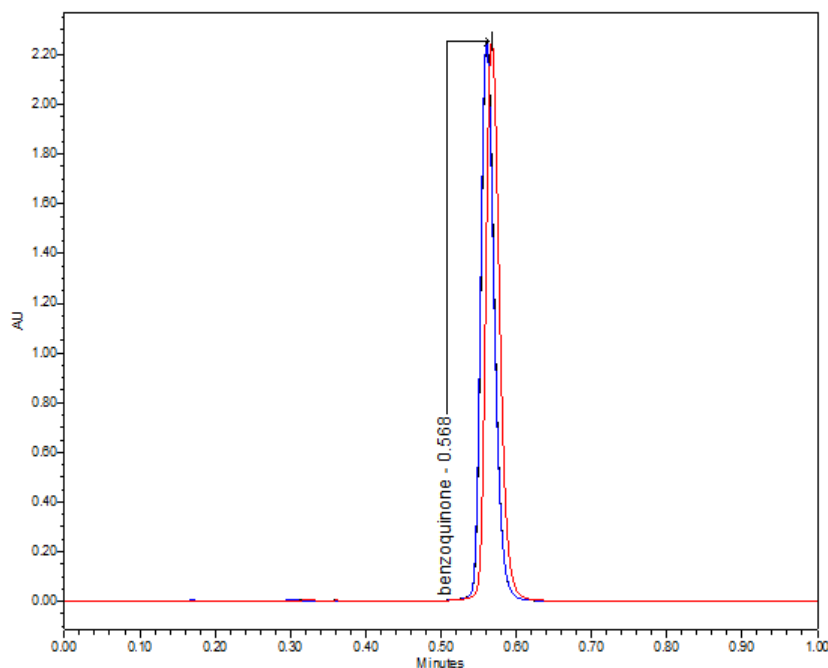




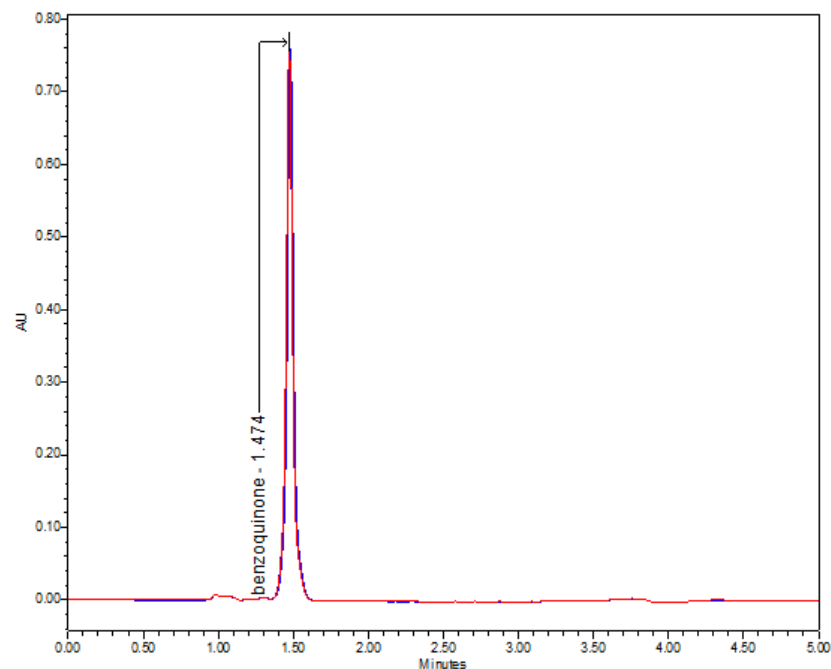
# Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2<sup>ème</sup> dimension après piégeage?

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<sup>ème</sup> 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 apparait 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.



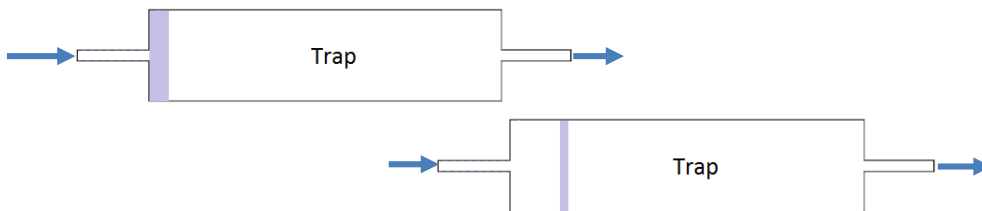
## Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2<sup>ème</sup> dimension après piégeage?

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

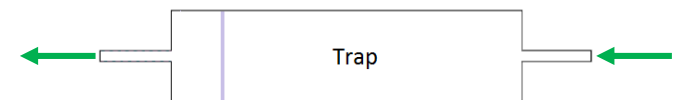
	Dimension 1	Dimension 2
Cafeine (n=6) (dimension 1 et 2 isocratique)	0.19	0.11
Benzoquinone (n=3) (dimension 1 et 2 gradient)	1.0	0.4

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<sup>ème</sup> dimension.

*Etape de piégeage*



*Etape d'élution*

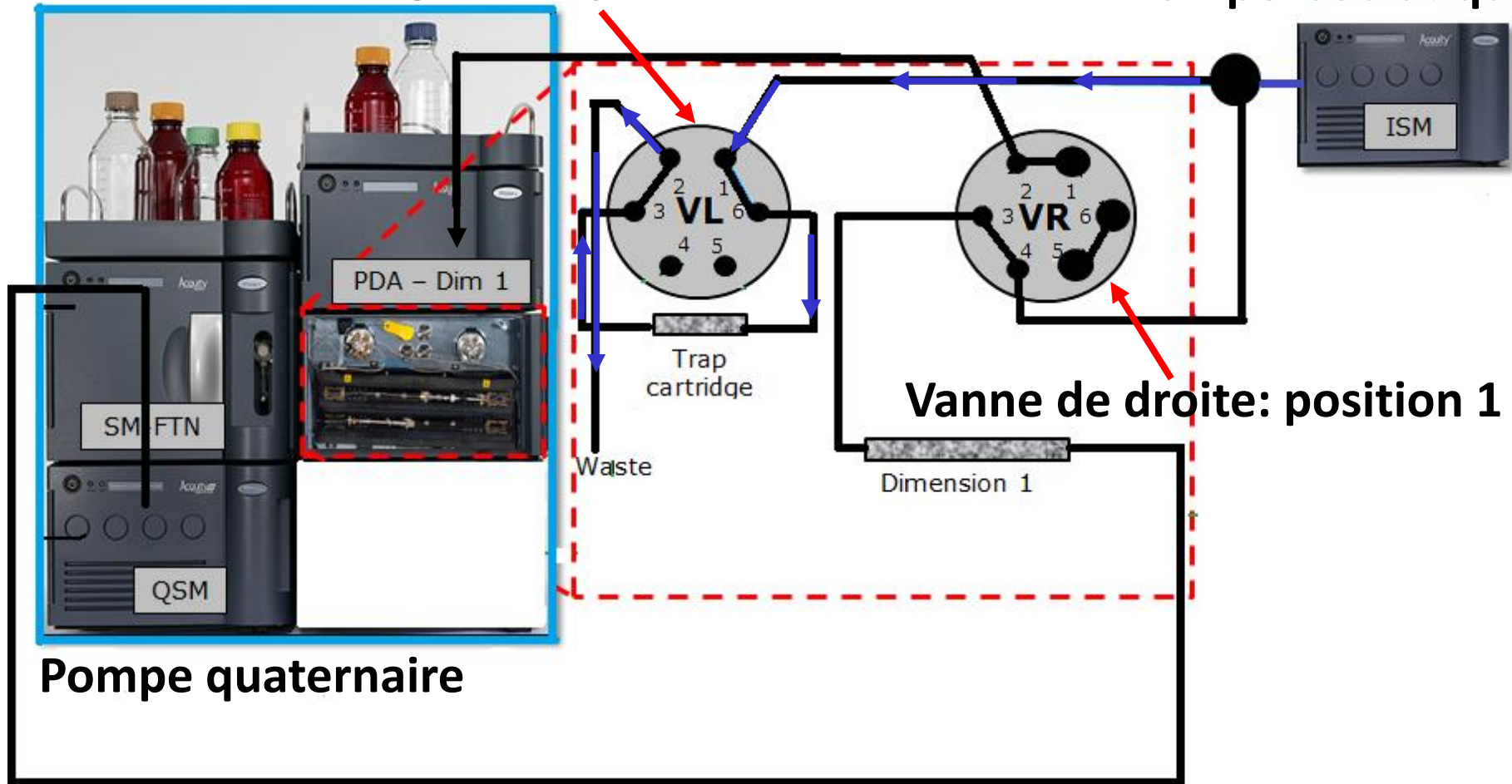




Question 2 : Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?

Vanne de gauche: position 2

Pompe isocratique



Pompe quaternaire

Vanne de droite: position 1

→ Circuit 1 et → Circuit 2



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

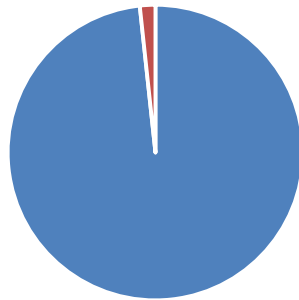
**Le débit du circuit 2 (ISM) a une influence très importante sur la composition de la phase qui traverse la cartouche et donc la qualité du piégeage**

Exemple en élution isocratique :

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

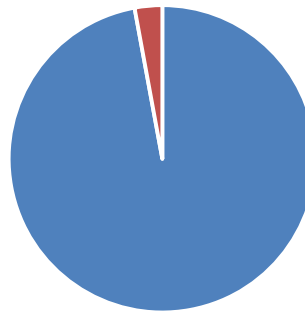
Circuit 2 = eau 100%

Débit = 2ml/min



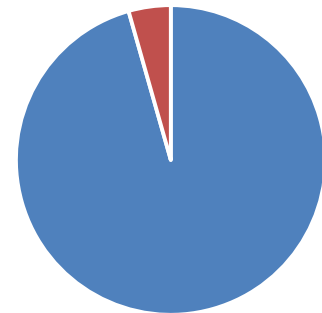
■ %eau ■ %org

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/acétonitrile-90/10 à 5/95 en 2.5 min-0,4 ml/min

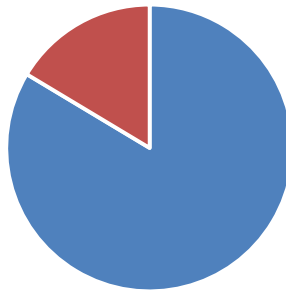
Circuit 2 = eau 100% - 1ml/min

T = 0.6 min



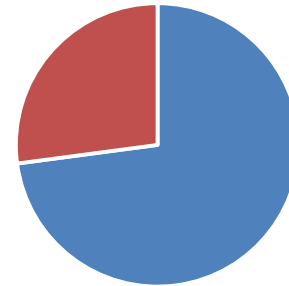
■ %eau ■ %org

T = 1.5 min



■ % eau ■ % org

T = 2.5 min



■ %eau ■ %org

*Facteur de rétention sur un piège apolaire*

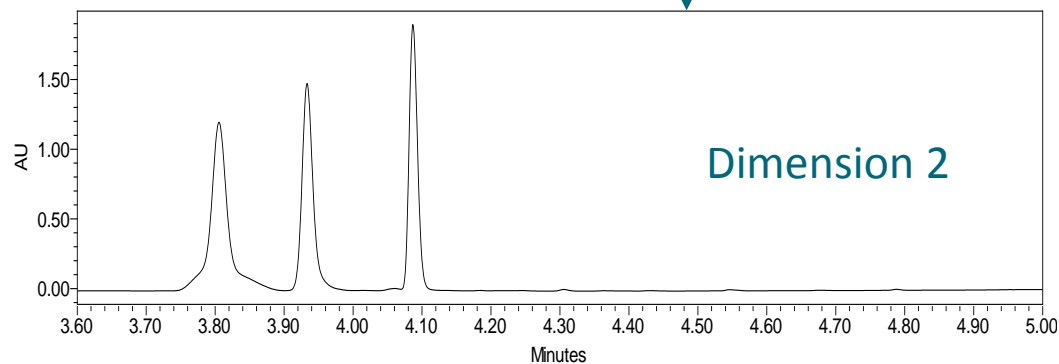
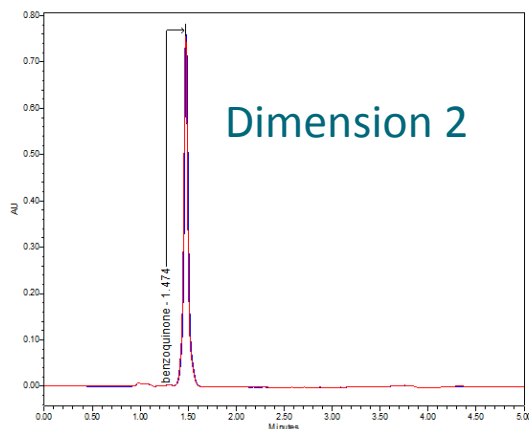
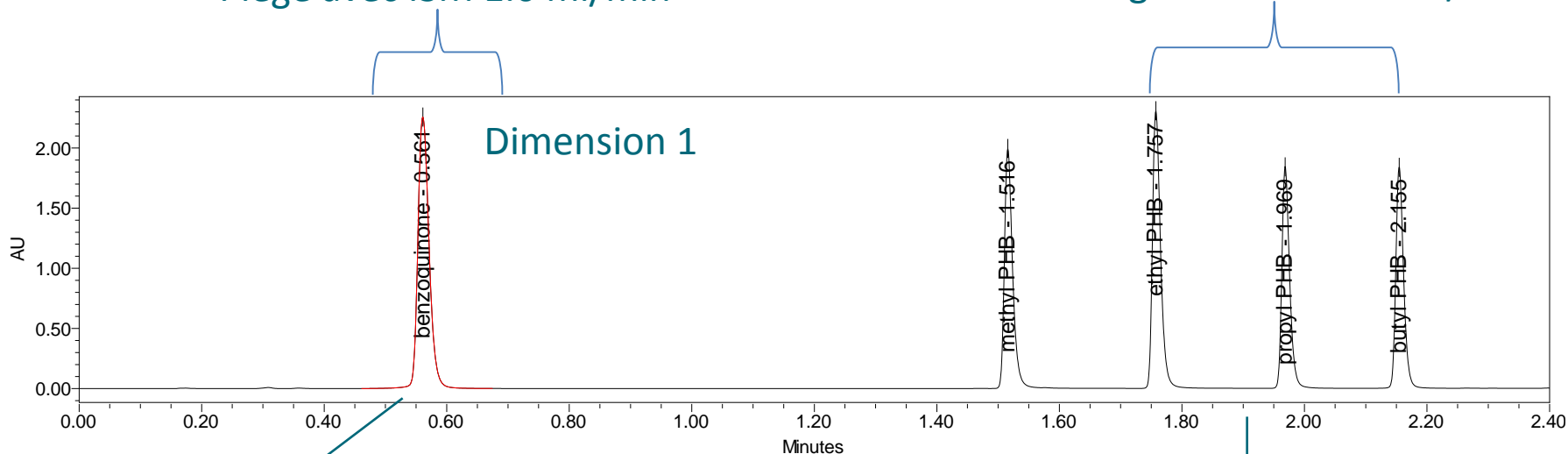


## Question 2 : Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?

### Exemple avec un piège C8

Piégé avec ISM 1.0 ml/min

Piégé avec ISM 1.8 ml/min

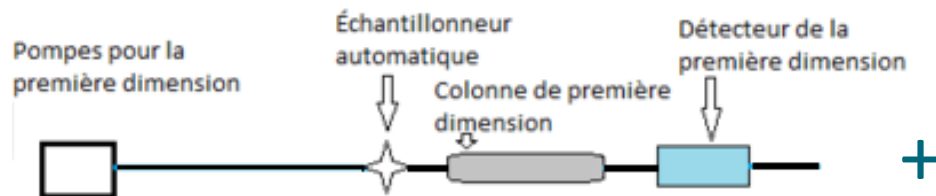


Changer la nature du piège

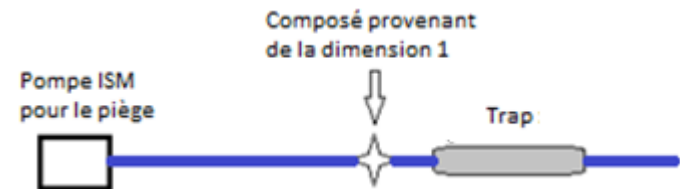
# Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

## Conditions chromatographiques du test

### Première dimension



### Piégeage

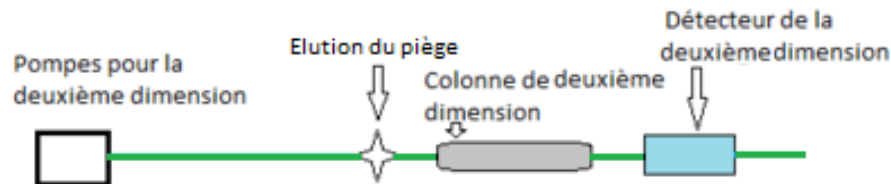


n répétitions

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

Circuit 2 = eau

### Deuxième dimension

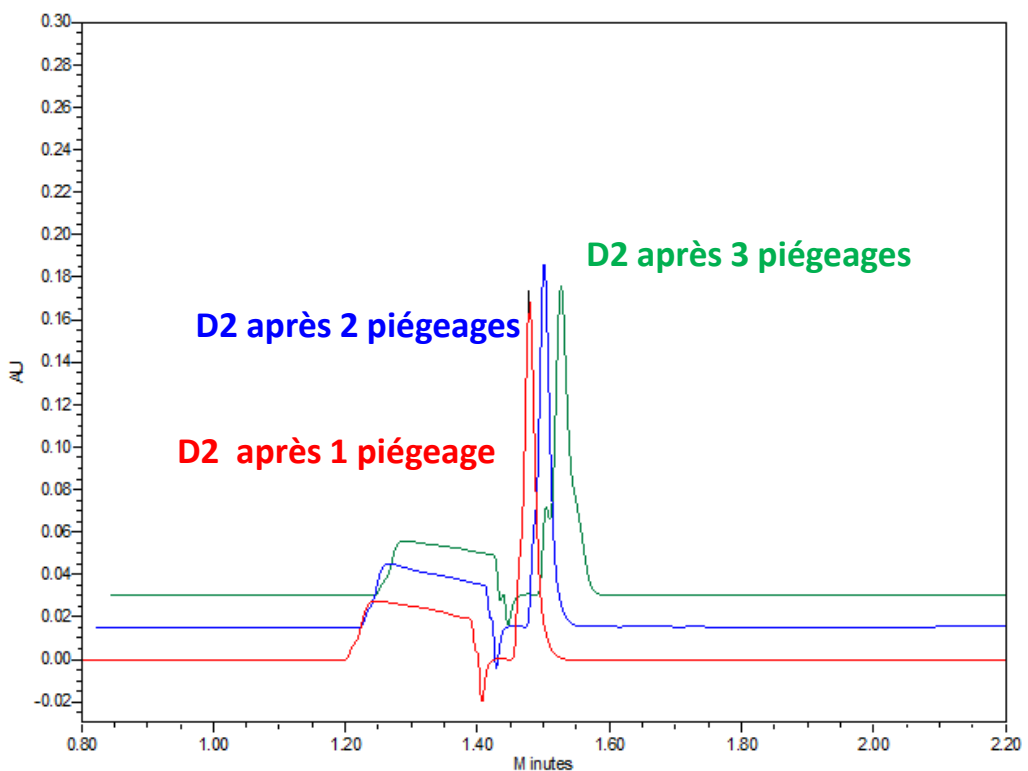


Chromatographie UHPLC de la dimension 2  
Colonne C18 – Circuit 3 = ACN



# 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)

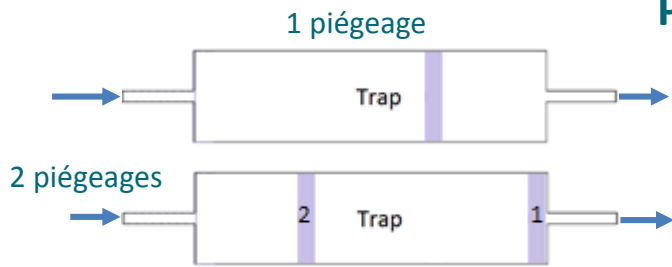


### Piégeage sur cartouche C8

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



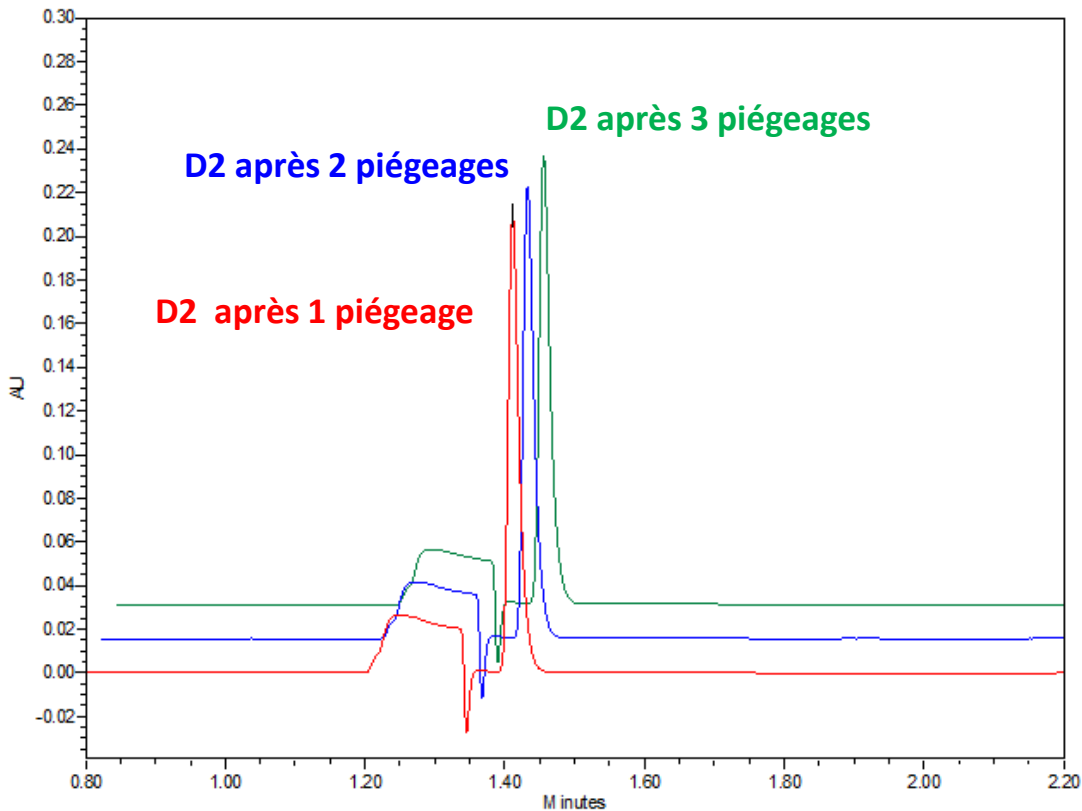
Pas d'accumulation





# 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

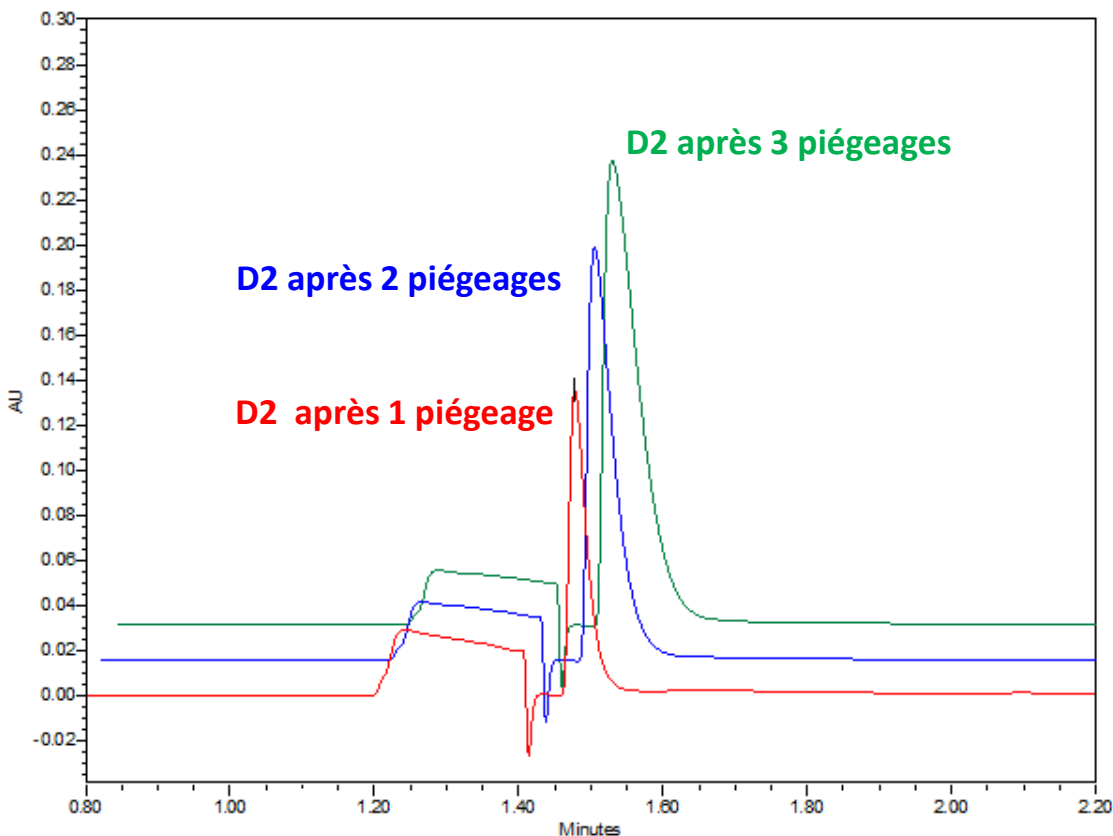


**Pas d'accumulation**



# 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



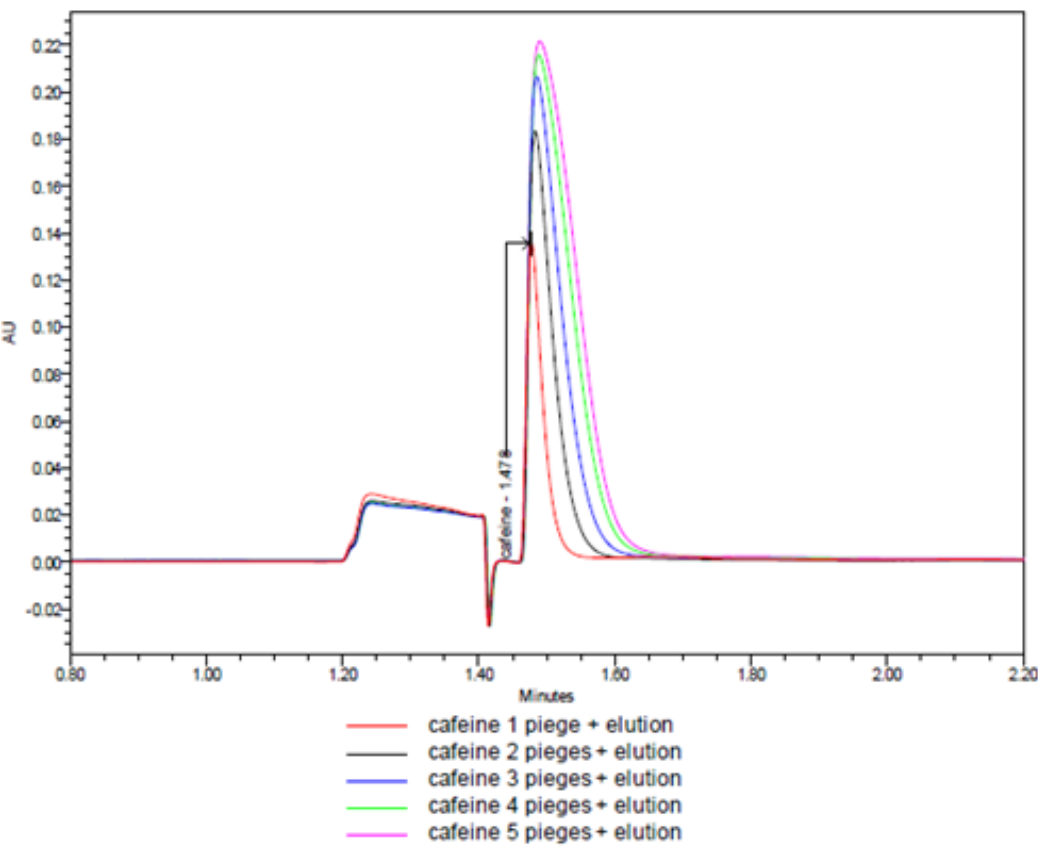
**Accumulation proportionnelle**



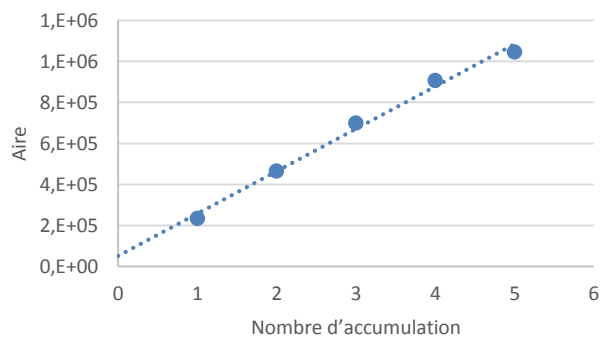


# Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

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



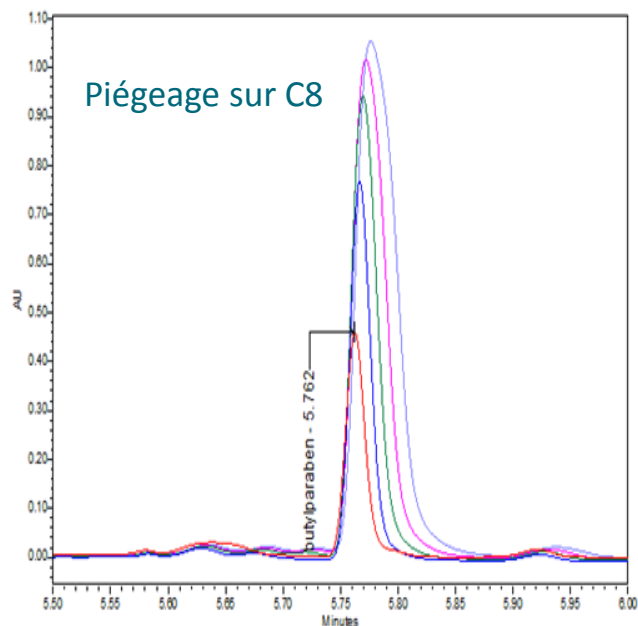
	Aires des pics Dimension 2
1 piégeage	233 415
2 piégeages	465 209
3 piégeages	698 602
4 piégeages	906 858
5 piégeages	1 046 441



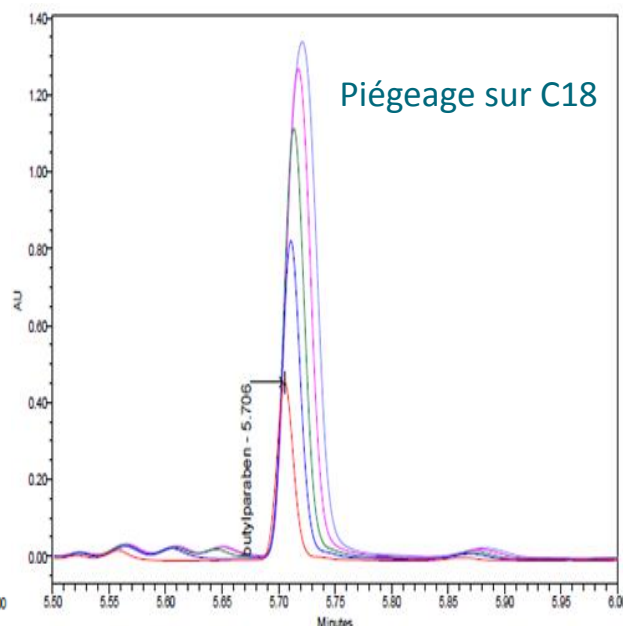
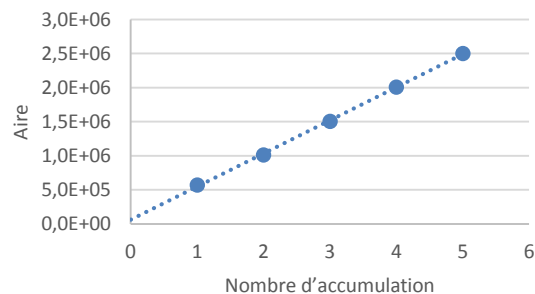


# Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

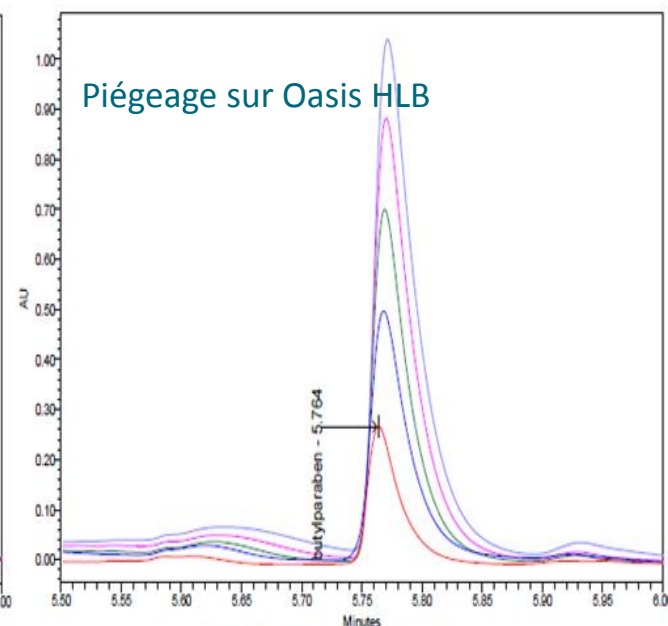
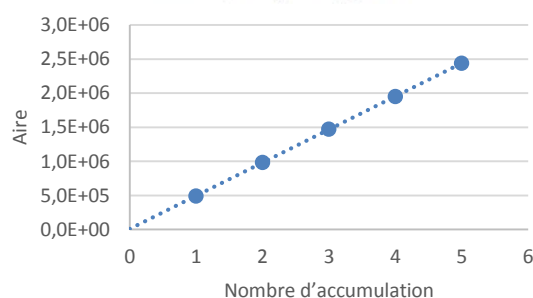
## Analyse d'un composé de facteur de capacité K' forte (butylparaben)



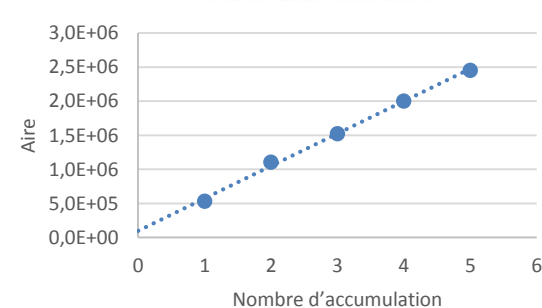
— SampleName butylparabene 1 piege+ elution  
— SampleName butylparabene 2 pieges + elution  
— SampleName butylparabene 3 pieges + elution  
— SampleName butylparabene 4 pieges+elution  
— SampleName butylparabene 5 pieges + elution



— 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

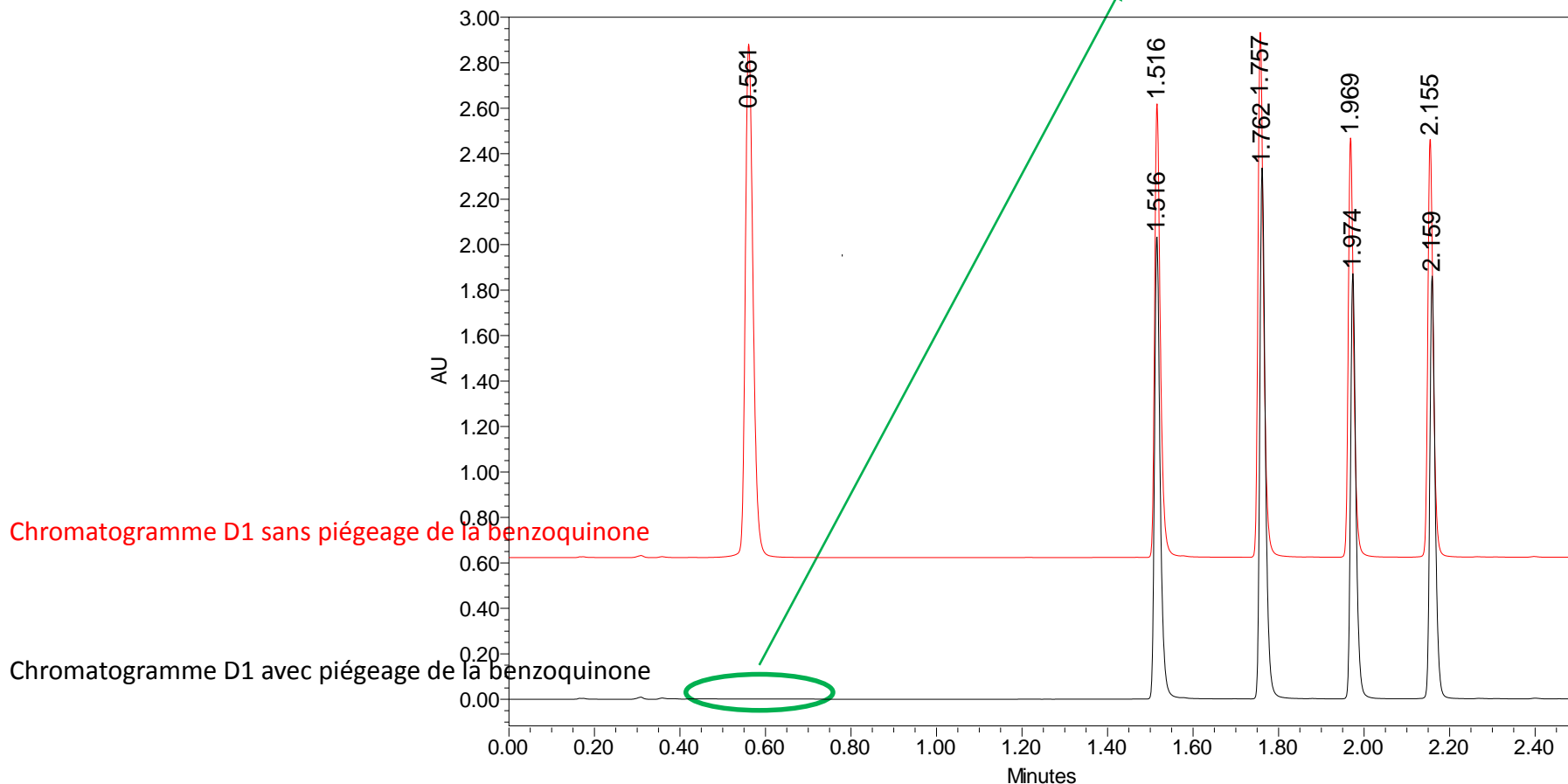
....

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



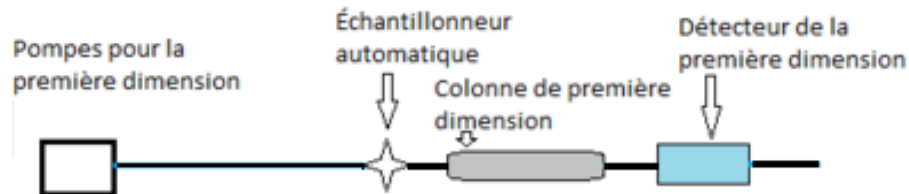
**Le piégeage ne perturbe pas le reste du chromatogramme de la dimension 1.**



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

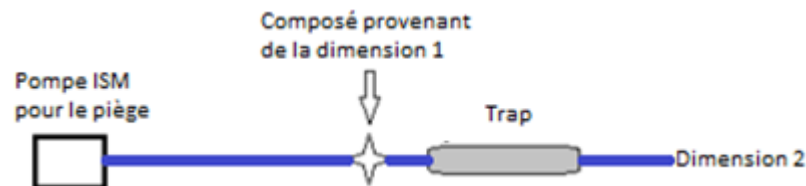
## Conditions chromatographiques du test

### Première dimension (circuit 1)



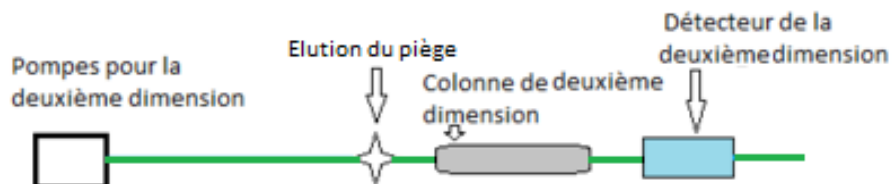
Chromatographie de la dimension 1  
Core-shell 100x4,6 2,7  $\mu\text{m}$  C18  
Circuit 1 = gradient H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/MeOH - 1 ml/min  
Détection UV

### Piégeage (circuit 2)



Trap : Xbridge C18 20x2,1 - 5  $\mu\text{m}$   
Circuit 2 = Acide formique 0,1 % v/v - 1,5 ml/min

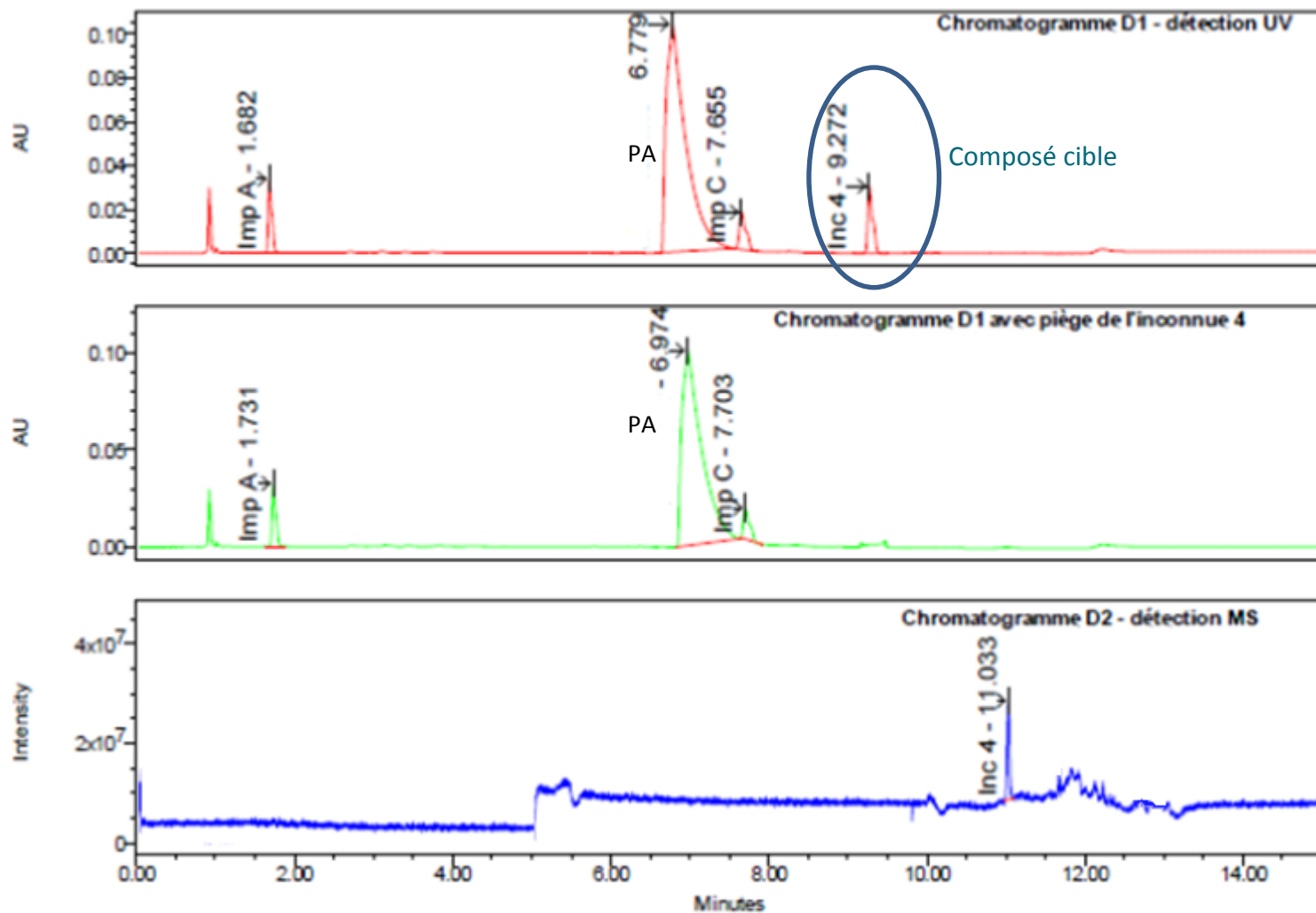
### Deuxième dimension (circuit 3)



Chromatographie de la dimension 2  
Colonne HSS C18 50-2,1 1,7  $\mu\text{m}$   
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

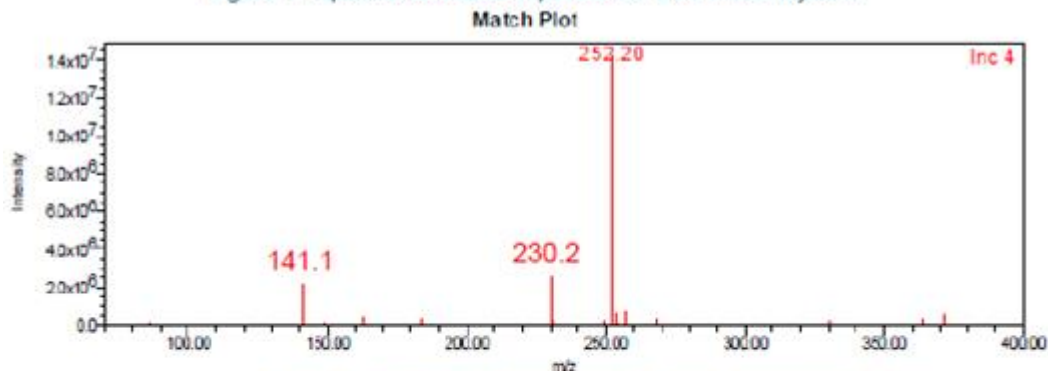
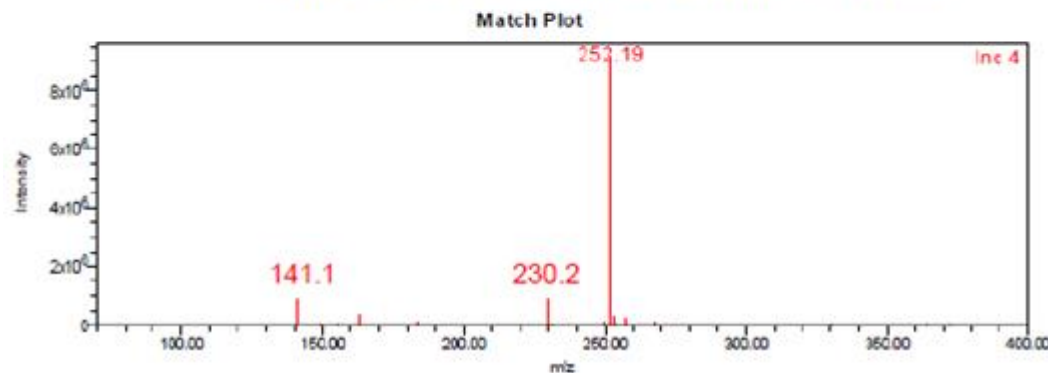
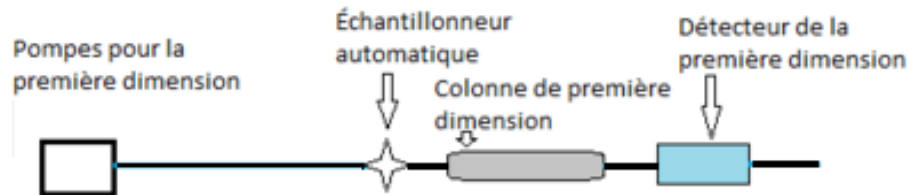


Figure 2 : Spectre de masse impureté Inc 4 comprimé T15 mois



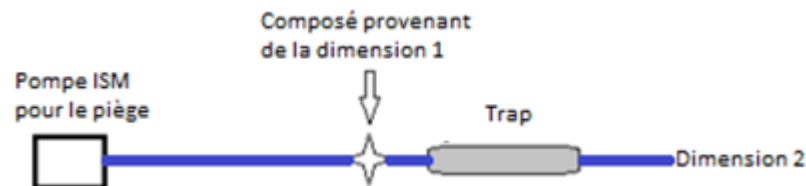
## Conditions chromatographiques du test

### Première dimension (circuit 1)



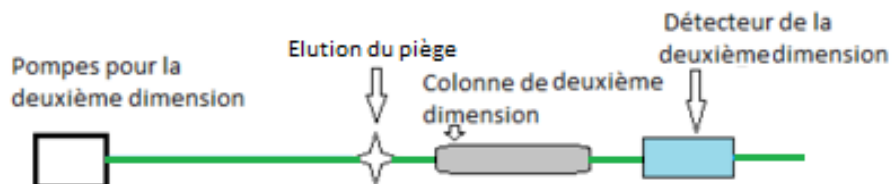
Chromatographie de la dimension 1  
C18 75x4,6 1,8  $\mu\text{m}$   
Circuit 1 = gradient SDS/ACN – 0,6 ml/min  
Détection UV

### Piégeage (circuit 2)



Trap : Xbridge C8 30x2,1 - 10  $\mu\text{m}$   
Circuit 2 = Acide formique 0,1 % v/v - 1,5 ml/min

### Deuxième dimension (circuit 3)

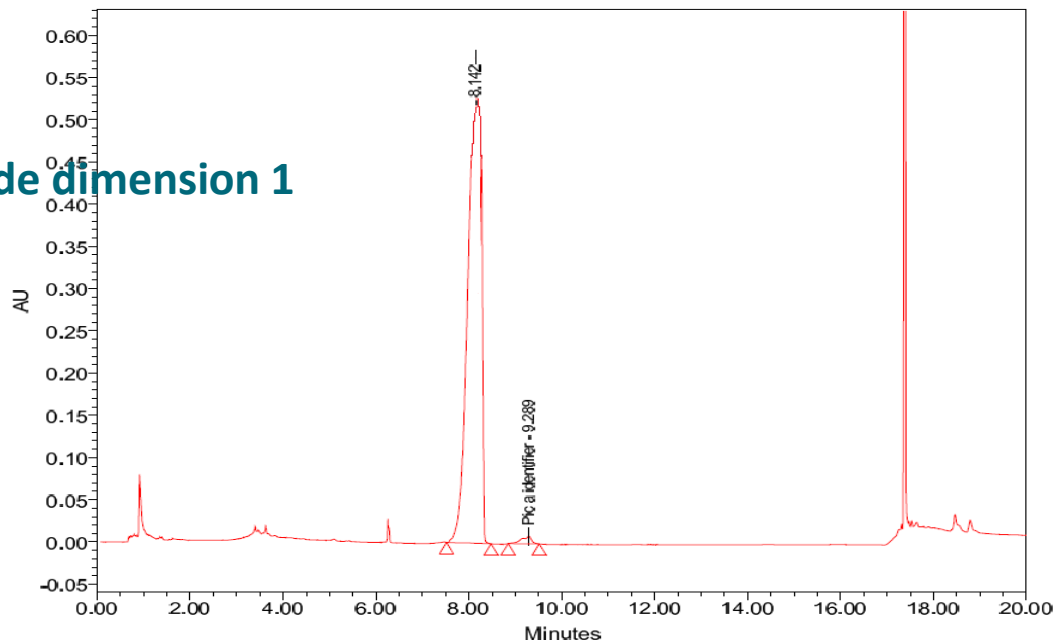


Chromatographie de la dimension 2  
Colonne C18 50-2,1 1,7  $\mu\text{m}$   
Circuit 3 = ACN - 0,6 ml/min  
Détection QDA ES+

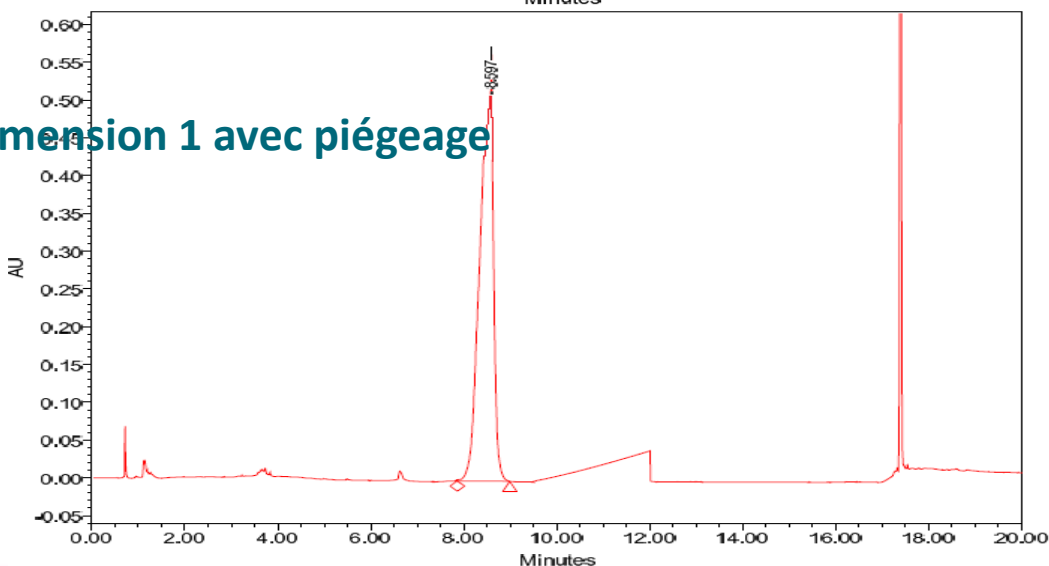


## Client 2 : Comment apporter des informations sur la caractérisation d'un pic détecté dans des conditions HPLC spécifiques ?

Chromatogramme de dimension 1



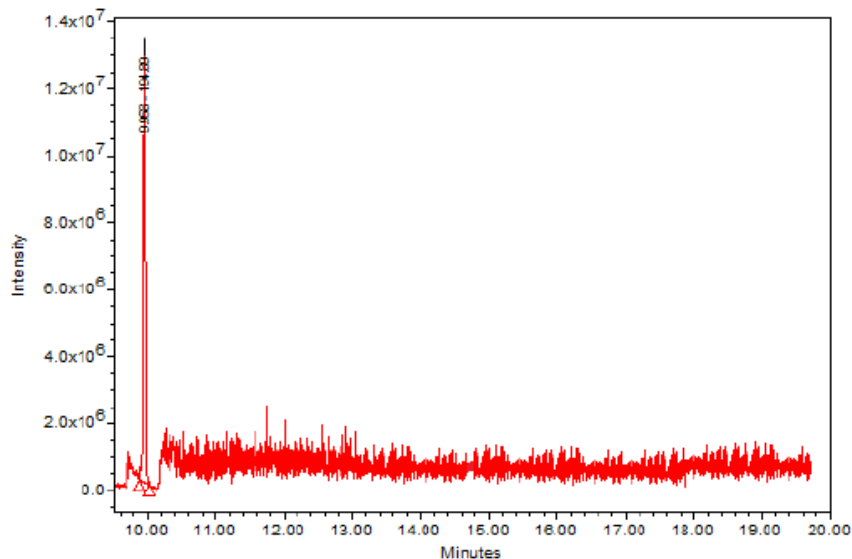
Chromatogramme de dimension 1 avec piégeage





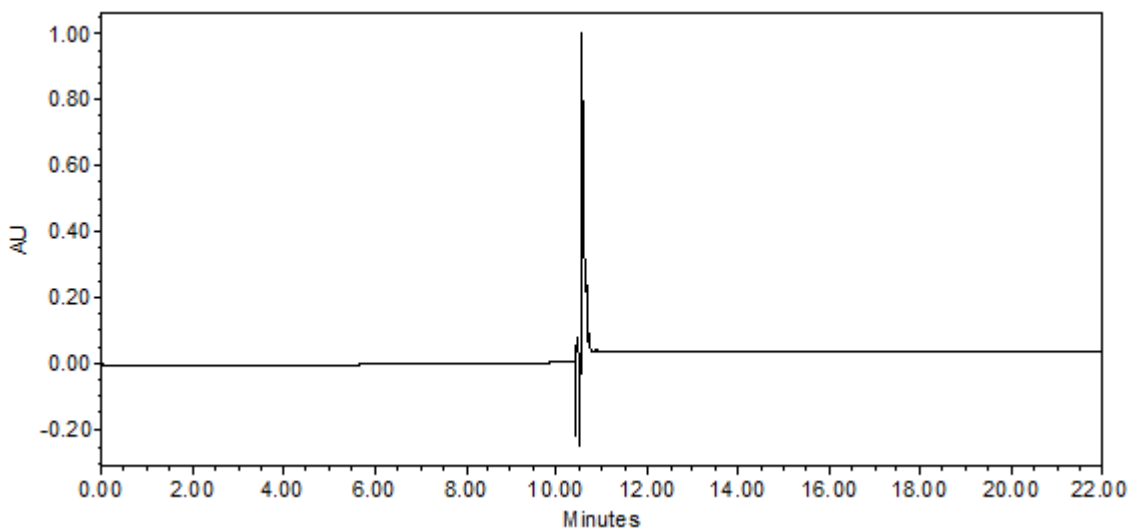
## Client 2 : Comment apporter des informations sur la caractérisation d'un pic détecté dans des conditions HPLC spécifiques ?

### Chromatogramme de dimension 2



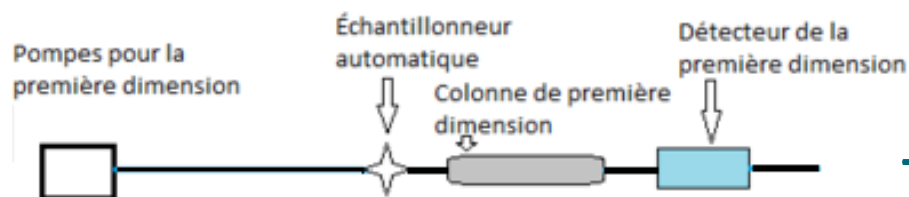
Détection MS (ES+/-)

Détection UV 278 nm



## Conditions chromatographiques de l'accumulation

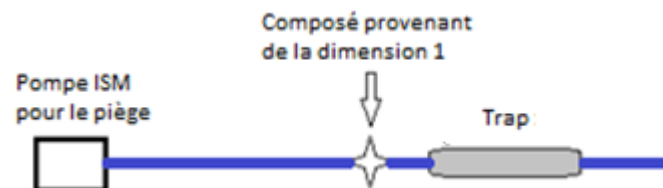
### Première dimension



Chromatographie de la dimension 1  
C18 75x4,6 1,8  $\mu\text{m}$   
Circuit 1 = gradient SDS/ACN – 0,6 ml/min  
Détection UV

n répétitions

### Piégeage

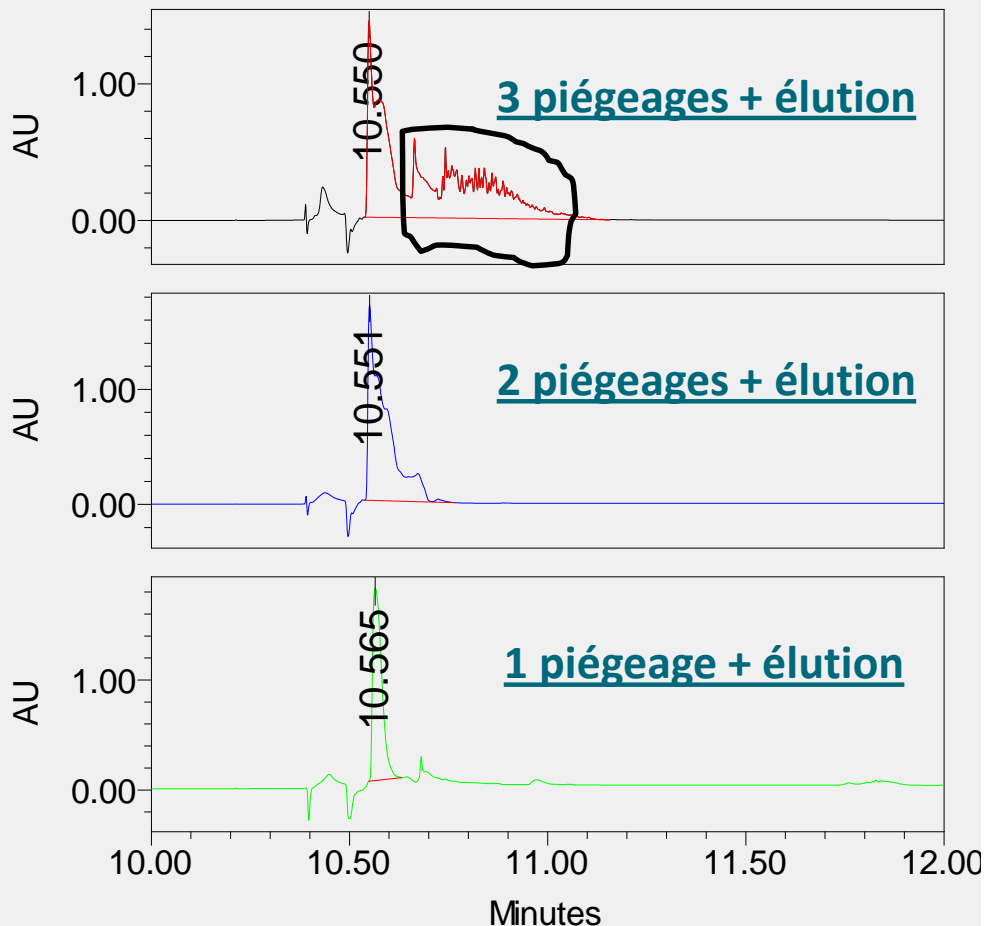


Trap : Xbridge C8 30x2,1 - 10  $\mu\text{m}$   
Circuit 2 = Acide formique 0,1 % v/v  
1,5 ml/min

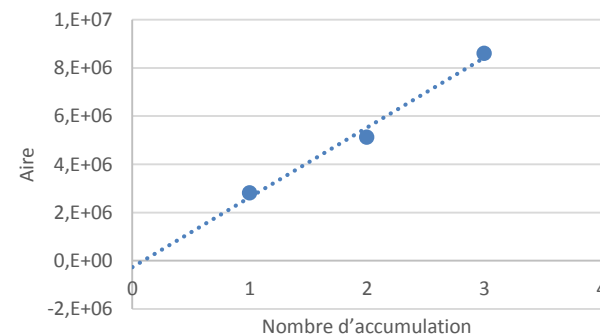


# Client 2 : Comment apporter des informations sur la caractérisation d'un pic détecté dans des conditions HPLC spécifiques ?

## Vérification de l'accumulation sur le piège



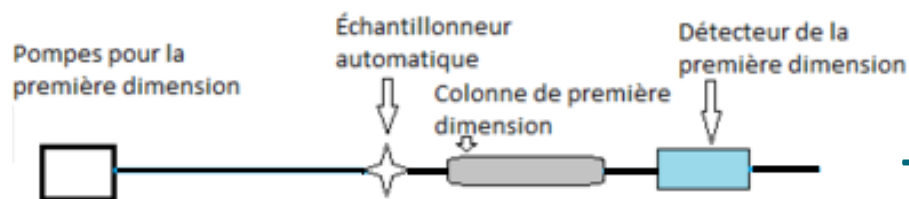
	Dimension 2
3 piégeages	8 609 418
2 piégeages	5 127 914
1 piégeage	2 823 059



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

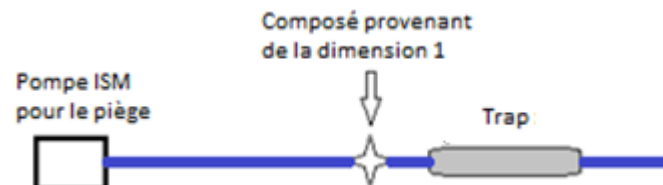
## Conditions chromatographiques de l'accumulation puis de la collecte

### Première dimension



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

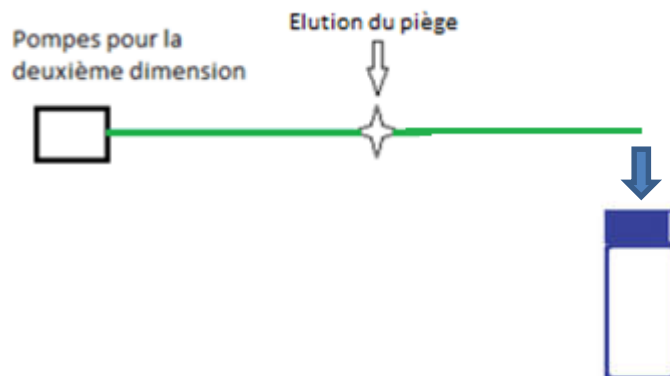
### Piégeage



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

n répétitions

### Deuxième dimension



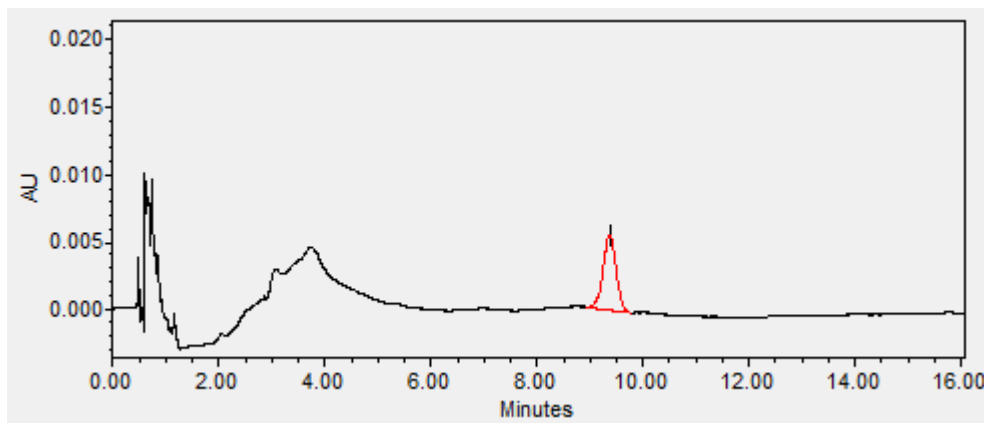
Chromatographie de la dimension 2  
Colonne C18 – Circuit 3 = ACN





## 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



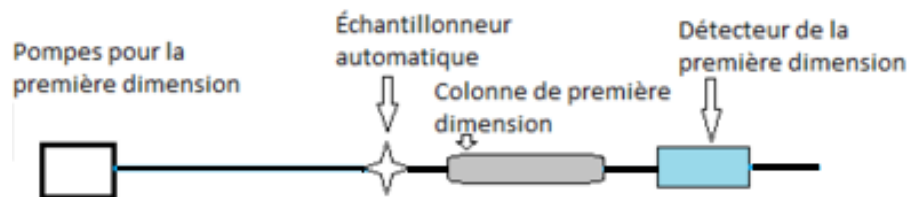
MS impact électronique  
En cours



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

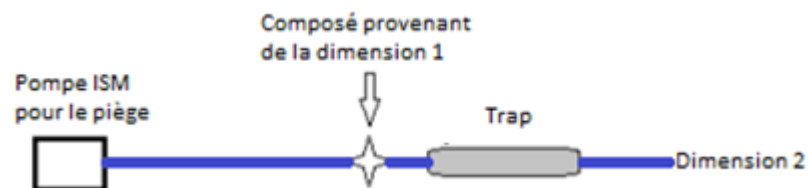
## Conditions chromatographiques du test

### Première dimension (circuit 1)



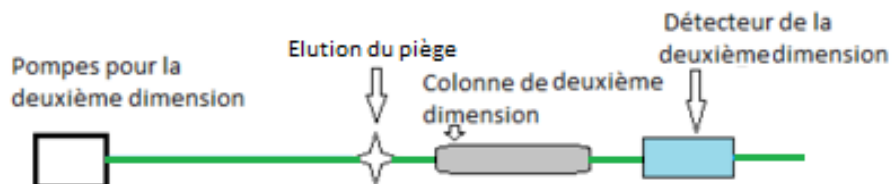
Chromatographie de la dimension 1  
C18 50x4,6 1,8  $\mu\text{m}$   
Circuit 1 = gradient eau/ACN – 0,4 ml/min  
Détection UV

### Piégeage (circuit 2)



Trap : Xbridge C8 30x2,1 - 10  $\mu\text{m}$   
Circuit 2 = Acide formique 0,1 % v/v - 1,0 ml/min

### Deuxième dimension (circuit 3)

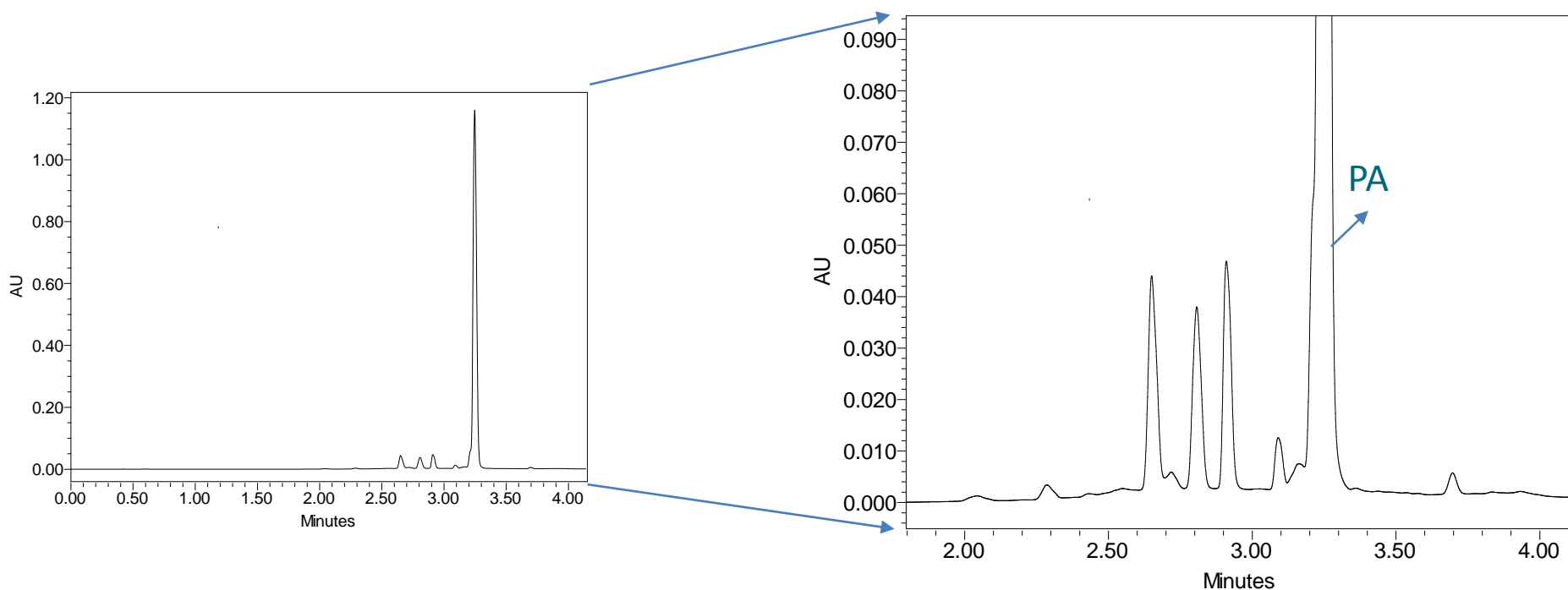


Chromatographie de la dimension 2  
Hypercarb 250-2,1 5  $\mu\text{m}$   
Circuit 3 = Isocratique eau/ACN – 1 ml/min  
Détection UV



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

Chromatogramme D1 : séparation des impuretés du PA

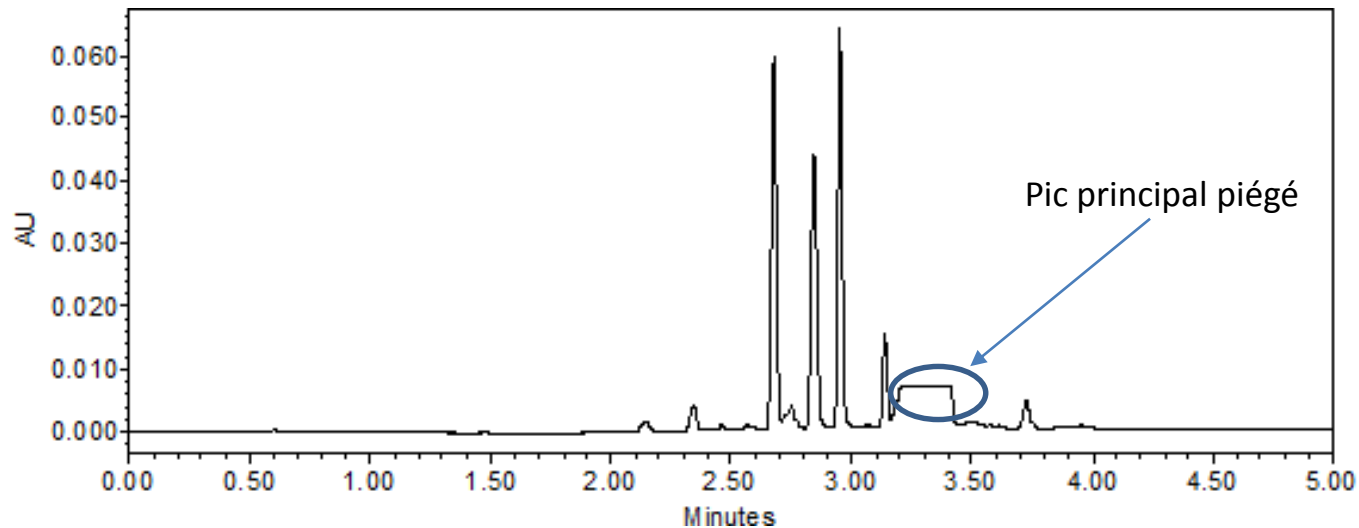


Mise en place de la D2 pour étude des isomères du PA

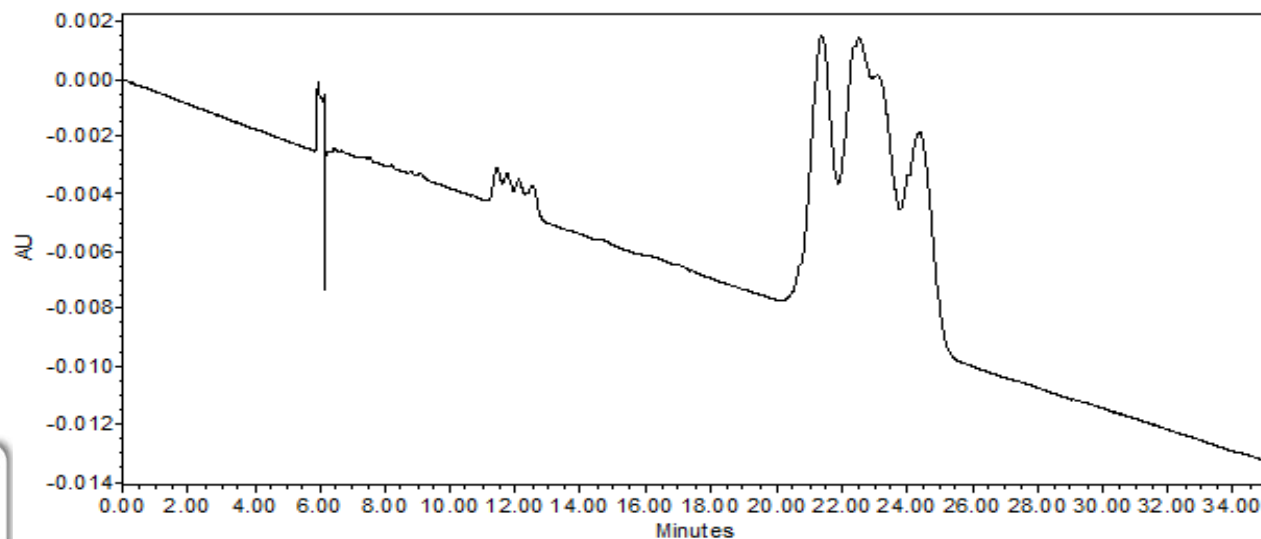


## Client 3 : Comment obtenir le isomérique d'un API sans l'interférence des impuretés ?

### Chromatogramme de dimension 1 avec piégeage

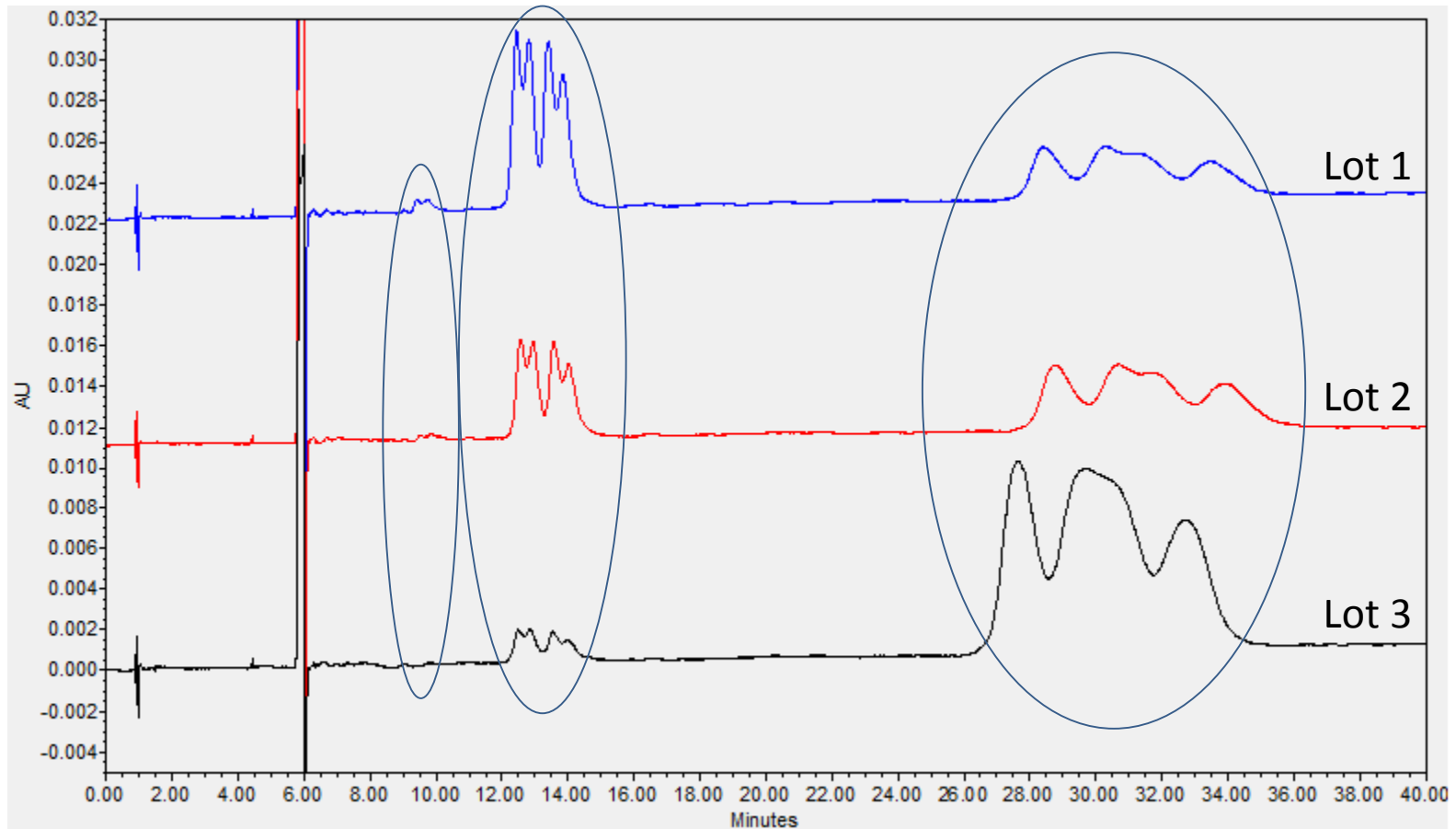


### Chromatogramme de dimension 2





## 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



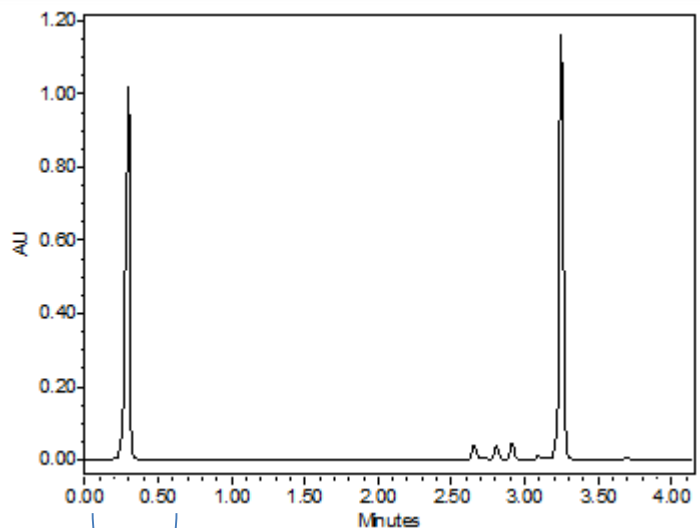
- Un outil complémentaire à une plateforme de développement
- La LC2D apporte des informations sur la spécificité des méthodes LC
- Peu de contraintes sur les conditions chromatographiques de la première dimension
- La LC2D est une solution pour couplage LC/MS utilisant des phases mobiles incompatible 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
- ....

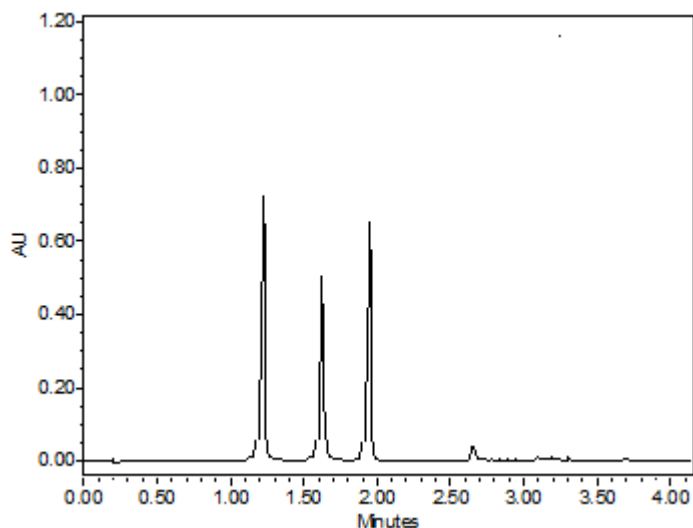


Difficulté à séparer l'ensemble des composés recherchés dans une seule méthode



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](mailto:mfoulon@pharmaphysic.fr)

Mail: [fpiolet@pharmaphysic.fr](mailto:fpiolet@pharmaphysic.fr)

