

Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Mouloud Mammeri
Faculté de Médecine
Tizi-Ouzou



جامعة مولود معمري
لكلية الطب
تيزي وزو

Département de Pharmacie

†.⊙%∧∧.⊂ξ† †:‡:∧ † †H%⊂⊂:Q

N° D'ordre :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté sous forme d'article et soutenu publiquement

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Le : 16/07/2025

Sous le Thème

Validation d'une méthode de dosage d'une impureté connue dans un produit fini comprimé selon la ligne directrice ICH Q2(R2). Application d'une spécialité pharmaceutique fabriquée par le Groupe SAIDAL.

Réalisé par :

AIT YAHIA TENE Karima
BELFADEL Yasmine
GACEB Sophie

Encadré par :

Dr N. MECHTOUB

Membres du jury :

Pr M. MAMOU
Dr H. BEN SI SAID
Dr T. CHEKROUN

Professeur en chimie analytique
MAHU en chimie analytique
Praticienne spécialiste Assistante
en chimie analytique

Président du jury
Examineur
Examinatrice

Résumé

Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire de contrôle qualité du Groupe Pharmaceutique SAIDAL –Dar El Beida- pour la quantification d'une impureté connue. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne ZORBAX Phényle C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) en mode isocratique, avec une phase mobile composée de méthanol et d'acide phosphorique, à un débit de 0,6 mL/min. La détection a été assurée par un détecteur à barrette de diodes réglé à 206 nm. La température de la colonne était maintenue à 25 °C, le volume d'injection était de 10 µL et le temps total d'analyse était de 60 minutes. La méthode a été validée conformément aux lignes directrices ICH Q2(R2) en évaluant les paramètres suivants : spécificité, linéarité, limite de détection, limite de quantification, fidélité (répétabilité et précision intermédiaire), l'exactitude ainsi que la robustesse. La linéarité a été démontrée de la limite de quantification jusqu'à 200 % de la concentration cible. Des études de dégradation forcée ont été réalisées sous différentes conditions de stress (acide, basique, oxydante et thermique), confirmant le caractère indicateur de stabilité de la méthode. L'ensemble des résultats satisfait les critères d'acceptation, démontrant ainsi la pertinence de la méthode développée par SAIDAL pour l'analyse régulière de cette impureté.

Mots-clés : Validation analytique, ICH Q2(R2), dosage, impureté, HPLC-DAD, dégradation forcée

Abstract

The present work was carried out within the quality control laboratory of the SAIDAL Pharmaceutical Group – Dar El Beida for the quantification of a known impurity. Chromatographic separation was achieved on a ZORBAX Phenyl column C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) using isocratic program, with methanol and phosphoric acid as a mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min. Detection was performed using a diode array detector set at 206 nm. The column temperature was maintained at 25 °C, the injection volume was 10 µL, and the total analysis time was 60 minutes. The method was validated to fulfill International Conference on Harmonization ICH Q2(R2) guidelines by evaluating the following parameters: specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy and robustness. Linearity was demonstrated from the limit of quantification up to 200% of the target concentration. Forced degradation studies were conducted under various stress conditions (acidic, basic, oxidative, and thermal), confirming the stability-indicating nature of the method. The results obtained for all parameters were within the acceptance criteria, demonstrating the suitability of the method developed by SAIDAL for the regular analysis of this known impurity.

Keywords : Analytical validation, ICH Q2(R2), assay, impurity, HPLC-DAD, forced degradation

Abréviations :

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquide à haute performance);
DAD : Diode Array Detector (détecteur à réseau de diodes); PA : Principe Actif ; Imp X : Impureté X ;
RRT : Relative Retention Time (temps de rétention relatif); RRF : Relative Response Factor (facteur de réponse relatif); SD : écart-type résiduel ; RSD : Relative Standard Deviation (écart-type relatif); LOQ : Limit of Quantification (limite de quantification); LOD : Limit of Detection (limite de détection); WS : Working Standard (substance de référence de travail); SCR : Substance Chimique de Référence; USP : United States Pharmacopeia (pharmacopée des États-Unis); HCl : acide chlorhydrique; NaOH : hydroxyde de sodium; PPM : Parts Per Million (parties par million); CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

I. INTRODUCTION

Le développement et la validation des méthodes analytiques pour le contrôle du principe actif et la détection des impuretés sont devenus des éléments fondamentaux dans les laboratoires de contrôle qualité des médicaments (1). Les laboratoires pharmaceutiques doivent prouver que leurs produits demeurent stables tout au long de leur cycle de vie, que les impuretés présentes sont maintenues à des niveaux acceptables, et que les méthodes d'analyse utilisées pour le contrôle de leurs produits sont parfaitement valides et fiables (2) (3) (4).

En effet, si la validité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, toute décision relative à la conformité des produits finis, fondée sur les données issues du contrôle qualité réalisé avec cette méthode, devient contestable. C'est pourquoi l'assurance de la fiabilité d'une méthode, garantie par la validation, constitue non seulement une exigence réglementaire, mais également un pilier fondamental de l'assurance qualité (5) (4) (6).

La validation analytique fait partie du module 3 du dossier CTD (Common Technical Document) relatif à l'autorisation de mise sur le marché d'un produit pharmaceutique. Dictée par des exigences scientifiques et réglementaires (directives européennes, FDA, ICH, BPF, etc.), elle constitue généralement l'étape finale du développement d'une nouvelle méthode analytique (7). Cette validation vise à évaluer les performances de la procédure dans des conditions analytiques préalablement définies, à travers l'étude de plusieurs paramètres appelés communément « critères de validation », en utilisant des outils statistiques appropriés (3) (4) (6) (8).

Dans le cadre de l'amélioration continue du système qualité, visant à sécuriser le processus de libération des lots et à répondre aux exigences croissantes des autorités réglementaires

compétentes, les autorités ont exigé du groupe SAIDAL une réévaluation des méthodes de contrôle d'une de ses spécialités pharmaceutiques. Cette réévaluation concerne spécifiquement la recherche et la quantification d'une impureté connue, dénommée X, présentant une forte analogie structurale avec le principe actif (PA). En effet, la méthode précédemment utilisée, basée sur la chromatographie sur couche mince (CCM), ne répond plus aux standards actuels (sensibilité insuffisante, forte variabilité entre opérateurs...) (8).

Pour répondre à ces enjeux, une nouvelle méthode chromatographique (HPLC-DAD), a été développée par le groupe SAIDAL –DAR EL BEIDA- et validée selon les exigences ICH Q2(R2) pour la recherche et la quantification de l'impureté X (21).

L'objectif principal de cette étude est de remplacer la technique classique par CCM, utilisée jusqu'à présent à des fins de détection, par une méthode plus performante et précise, la HPLC, afin de permettre la quantification fiable de cette impureté. Cette nouvelle méthode a fait l'objet d'une validation complète selon les recommandations de la norme ICH Q2(R2).

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Réactifs et produits chimiques

Le méthanol (**CHROMASOLV™**, **HONEYWELL RIEDEL-DE HAËN™**), l'acide phosphorique (**PANREAC APPLICHEM**), la triéthylamine (**SIGMA-ALDRICH**), l'eau purifiée (**SYSTEME MILLI-Q**).

Principe Actif working standard (**WS**) et son Impureté X (**SCR:l'EDQM**), Les échantillons de comprimés (incluant le placebo) ont été fournis par le Groupe pharmaceutique SAIDAL.

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique.

II.2. Instruments et verrerie

Un système HPLC (**WATERS ALLIANCE E2696**) équipé d'un détecteur **PDA**, piloté par le logiciel Empower 3, un système HPLC (**SHIMADZU LC-2050C**) équipé d'un détecteur **DAD** couplé au logiciel LabSolutions. Une balance analytique (**METTLER TOLEDO XPE205**), pH-mètre (**METROHM 744**), bain à ultrasons (**ISOLAB**), agitateur magnétique (**RS3**), étuve (**MEMMERT VO200**), un système de filtration (**Millipore Millex-LCR 0,45 µm PTFE Hydrophile**).

Fioles jaugées (25, 50 et 100 mL), béchers (50, 100 mL), éprouvettes graduées 1 L, mortiers et pilons.

II.3. Conditions Chromatographiques

L'analyse HPLC a été réalisée sur une colonne **ZORBAX Phényle C18** (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) dont la température est maintenue à celle de l'air ambiant. L'élution est en mode isocratique à un débit de 0,6 mL/min. La longueur d'onde a été fixée à 206 nm. Le volume d'injection est 10 µL.

II.4. Préparation des solutions

II.4.1. Phase mobile

Une solution tampon a été préparée en mélangeant 5 mL de triéthylamine avec 1 L d'eau purifiée, puis ajusté à un pH de 6,8 à l'aide d'acide

phosphorique. Cette solution tampon a ensuite servi à l'élaboration de la phase mobile, composée d'un mélange Méthanol / solution tampon (100:900, v/v).

II.4.2. Solution placebo

Elle a été préparée en dissolvant une quantité appropriée de matrice inerte dans un volume de 100 mL.

II.4.3. Solution standard du principe actif

Obtenu par une dilution au 1/10ème à partir de la solution standard stock (100ppm).

II.4.4. Solution standard de l'impureté X

Elle a été préparée en dissolvant 5 mg de l'impureté X SCR dans 25 mL d'eau purifiée.

II.4.5. Solution mère de l'impureté X

Utilisée pour charger l'échantillon a été préparée en dissolvant 20 mg de l'impureté X dans un volume de 25 mL.

II.4.6. Solution à examiner

Vingt comprimés de la spécialité pharmaceutique ont été broyés et une prise d'essai convenable a été transférée dans un volume de 100 mL.

II.4.7. L'échantillon chargé

Il a été préparé en ajoutant 1 mL de la solution mère de l'impureté X dans la solution à examiner.

II.4.8. Solution d'identification des pics

5 mg de PA (WS) et 5 mg de son impureté X ont été transférés dans une fiole jaugée de 100 mL.

II.4.9. Solution de linéarité

Les solutions mères du PA et de son impureté X ont été préparées en dissolvant 20 mg et 5 mg de leurs standards dans des volumes de 100 mL et de

25 mL respectivement, et en transférant 10,0 ml et 2,0 ml de ces dernières dans une fiole jaugée de 100ml.

- **Spécification**

Les seuils d'acceptation des impuretés ont été exprimés en pourcentage par rapport à la quantité de substance active, l'impureté connue et inconnue majeure est limitée à 0,2% avec une teneur totale ne dépassant pas les 2,00% (9).

II.5. La validation analytique

Cette méthode analytique a été développée en interne.

« In-house » pour le dosage de l'impureté X du PA étudié. Elle a été validée conformément aux exigences de la ligne directrice ICH Q2(R2) relatives à la validation des procédures analytiques (10).

La validation a été établie dans le but de démontrer que la méthode est fiable, reproductible et adaptée à l'usage prévu. Elle a été réalisée conformément au protocole de validation du laboratoire de contrôle qualité du groupe pharmaceutique SAIDAL.

La validation a couvert les paramètres requis par l'ICH Q2(R2) notamment : la spécificité, la dégradation forcée, la linéarité, LOD) et LOQ, la précision, l'exactitude ainsi que la robustesse (10).

La méthodologie suivie pour valider chaque critère est décrite ci-dessous.

II.5.1. Conformité du système

La conformité du système a été évaluée avant la validation de chaque paramètre en injectant le blanc et la solution d'identification des pics une fois et la solution standard du principe actif six fois.

Les critères d'acceptation, définis, exigeaient : un facteur de résolution (R) $>1,5$; un facteur d'asymétrie $< 2,0$, le nombre de plateaux théoriques (N) ≥ 1500 . Un %RSD $< 2,0$ % (11).

II.5.2. Spécificité

La spécificité d'une méthode analytique correspond à sa capacité à mesurer de manière exacte et sélective l'analyte cible en présence d'autres composants susceptibles d'être présents dans l'échantillon (10).

Dans cette étude, une seule injection a été effectuée pour les solutions du blanc, le placebo, la phase mobile ainsi que la solution d'identification des pics. Les solutions standards du principe actif et de son impureté X ont été injectées chacune 6 fois, l'échantillon et l'échantillon chargé ont été injectés 3 fois chacun. Un indice de pic de pureté a ensuite été déterminé à l'aide du logiciel LabSolutions (21).

Les critères d'acceptation établis avant l'étude exigeaient : l'absence de pic chromatographique au temps de rétention du principe actif et de son impureté dans le blanc, le placebo et la phase mobile (12) ; un indice de pureté du pic égale à 0.99 (13).

II.5.3. Dégradation forcée

Des études de la dégradation forcée ont été réalisées afin d'évaluer la spécificité et le pouvoir indicateur de stabilité de la méthode optimisée dans cette étude (10) (14). Des échantillons et des placebos ont été préparés, puis soumis à différentes conditions de dégradation (tableau 1). Après traitement, chaque échantillon dégradé a été dilué à une concentration de 0,06 mg/mL. Une solution témoin non stressée a également été préparée et diluée dans les mêmes conditions. Les teneurs en principe actif ainsi que les pourcentages d'impuretés ont ensuite été déterminés pour la solution témoin et l'ensemble des solutions soumises à un stress (15).

Le temps de dégradation a été augmenté si une dégradation entre 5% à 20% n'a pas été atteint (16) (21).

Tableau 1. Conditions de dégradation forcée

Contrainte	Réactif	Volume	Température	Durée
Hydrolyse acide	HCl 0,1 N	5 mL	t.a	4 h
Hydrolyse basique	NaOH 0,1 N	5 mL	t.a	4 h
Oxydation	H ₂ O ₂ 3 %	5 mL	t.a	4 h
Dégradation thermique	-	-	80 °C	5 jours

Les critères d'acceptation, définis avant l'étude de dégradation, exigeaient : l'absence d'interférence dans les solutions placebo au temps de rétention du PA et de son impureté X. Tous les pics de dégradations générés, y compris le pic de l'impureté X doivent être séparés les uns des autres, ainsi que du pic correspondant au PA étudié (17). Les pics du PA et de son impureté X doivent être purs, et sont déterminés à l'aide du logiciel Empower 3 (Angle de pureté inférieur à l'angle threshold) (17), un bilan de masse ≥ 95 % calculé à l'aide de l'équation suivante (15) (18) (21).

$$MB = \frac{PA_{Stressé} + Imp_{Stressé}}{PA_{témoin} + Imp_{témoin}} \times 100$$

II.5.4. Linéarité

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à produire des résultats d'essai qui sont directement ou par une transformation mathématique bien définie, proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons à l'intérieur d'une gamme donnée (10).

La linéarité a été établie par une série de préparations standards du principe actif et de son impureté sur un intervalle de dosage allant de 10% à 200% des limites de spécification

Les solutions correspondantes aux différents niveaux de concentration pour les deux substances ont été injectées. Les courbes de régression

linéaire ont été tracées. Les pentes, les ordonnées à l'origine, les coefficients de corrélation, les résidus ainsi que la somme des carrés résiduels ont été déterminées pour le PA et son impureté X (10). Un facteur de réponse relatif a notamment été déterminé.

Les critères d'acceptation, définis avant l'étude de linéarité exigeaient : Un coefficient de corrélation $\geq 0,99$, un % RSD $\leq 10,0$ %, avec une valeur de l'ordonnée à l'origine qui ne dépasse pas 5% de la réponse à 100% (19) (20).

II.5.5. Limite de détection et limite de quantification (LOD et LOQ)

La LOD et la LOQ ont été calculées à partir des formules 3,3 SD/S et 10 SD/S respectivement, leur estimation a été validée par l'analyse indépendante d'un nombre approprié d'échantillons connus pour être proches préparés au LOD et LOQ et injectés six fois (10).

Les critères d'acceptation fixés avant l'étude exigeaient un %RSD $< 33\%$ pour la LOD et $< 15\%$ pour la LOQ (19).

II.5.6. Exactitude

L'exactitude est définie comme le degré de concordance entre la valeur obtenue par la méthode analytique et la valeur réelle ou une valeur de référence acceptée. Elle reflète donc la justesse de la méthode par rapport à une valeur connue (10).

Cette évaluation a été réalisée en préparant des échantillons de contrôle enrichis en impureté X aux niveaux LOQ, 50 %, 100 % et 150 % du niveau de spécification de l'impureté. Au niveau de la LOQ, six préparations indépendantes ont été injectées une seule fois. Pour les niveaux de concentration 50%, 100% et 150%, trois préparations indépendantes ont été injectées une seule fois pour chaque niveau.

Les critères d'acceptation, définis avant l'étude exigeaient : une récupération individuelle comprise entre 70,0 % et 130,0 % pour le niveau LOQ, et entre 80,0 % et 120,0 % pour les autres niveaux. Le %RSD devait être $\leq 15,0$ % pour la LOQ, et $\leq 10,0$ % pour les autres niveaux (10).

II.5.7. Fidélité

La fidélité d'une méthode analytique correspond à l'étroitesse accord entre les résultats obtenus par l'analyse individuelle de plusieurs échantillons à partir d'un échantillon homogène. Elle est classiquement évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la précision intermédiaire et la reproductibilité (10).

Dans cette étude, seuls la répétabilité et la précision intermédiaire ont été évaluées. La précision du système a été vérifiée par six injections consécutives des solutions standards du principe actif et de son impureté X avec un %RSD inférieur à 2 % pour le principe actif et inférieur à 10 % pour l'impureté X.

La répétabilité a été évaluée par l'injection de six préparations indépendantes d'échantillons chargés en impureté X à une concentration cible correspondant à 100 % de la solution standard d'impureté dans les mêmes conditions opératoires et par le même analyste (10).

Quant à la fidélité intermédiaire, elle a été évaluée par un second analyste, à l'aide d'une colonne chromatographique et un système HPLC différents lors d'une journée distincte.

Le %RSD du premier analyste et du second analyste ont été calculés individuellement, à partir des pourcentages d'impuretés.

Les critères d'acceptation, définis avant l'étude de précision, exigeaient : Pour la répétabilité et la précision intermédiaire le %RSD de l'impureté X doit être inférieur à 10% (20).

Le %RSD cumulé de l'impureté X sur douze préparations doit être inférieur à 10%.

II.5.8. Robustesse

La robustesse est définie comme la capacité d'une méthode analytique à rester insensible à de petites variations délibérées des paramètres de méthode, ce qui indique sa fiabilité lors d'une utilisation normale (10).

Dans cette étude, la robustesse a été évaluée en introduisant des variations délibérées, mais contrôlées, sur quatre paramètres critiques de la méthode chromatographique, afin d'en observer l'impact sur l'impureté X et le PA.

Les paramètres variés comprennent : le pH de la phase mobile ($\pm 0,2$ unité), le débit ($\pm 0,1$ mL/min), la température de la colonne (± 5 °C), et la longueur d'onde de détection (± 2 nm). Chaque paramètre a été modifié individuellement, tandis que les autres conditions expérimentales restaient constantes. Pour chaque condition, une injection de la solution d'échantillon chargé a été réalisée. Des solutions de blanc et d'identification des pics ont également été préparées et injectées une seule fois (21).

Les critères d'acceptation établis avant l'étude exigeaient le respect des spécifications de conformité système, pour chaque condition modifiée. Le RRT qui égale au temps de rétention de l'impureté X par rapport au PA devait rester constant avec une variation maximale de $\pm 0,05$ (21).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Conformité du système

La conformité du système réalisée au début de chaque paramètre a montré des résultats conformes aux critères d'acceptation établies, à savoir : un facteur de résolution (R) $>1,5$; un facteur d'asymétrie $< 2,0$, le nombre de plateaux théoriques (N) ≥ 1500 . Un %RSD $< 2,0$ %. Ces résultats confirment que le système est performant, stable et apte à fournir des résultats analytiques fiables et reproductibles.

Tableau 2. Résultats de la spécificité

Nom	Temps de rétention (min)	Aire	Facteur d'asymétrie	Nombre de plateaux théoriques	Résolution	Indice de pureté du pic
Blanc						
Blanc	ND	ND	ND	ND	-	-
Placebo						
Placebo	ND	ND	ND	ND	-	-
Phase mobile						
Phase mobile	ND	ND	ND	ND	-	-
Solution d'identification des pics						
Principe actif	33.72	1460496	1,59	3923	2,76	-
Impureté X	29.20	1718999	1,62	10765		-
Les solutions standards						
Principe actif	33.86	193529	1,59	4259	-	-
Impureté X	29.16	2976426	1,62	10865	-	-
Echantillon						
Principe actif	32.88	2558670	1,59	7820	-	-
Echantillon chargé						
Principe actif	33.17	27175433	1,59	7864	2,52	0,99
Impureté X	29.42	206355	1,62	23026		0,99

(ND = Non-déecté)

Tableau 3. Résultats de la pureté des pics dans l'étude de la dégradation forcée

Expérience	Principe actif		Impureté X	
	Angle de pureté	Seuil de pureté	Angle de pureté	Seuil de pureté
Echantillon témoin	0.276	1.102	0.251	1.138
Dégradation acide	0.371	1.203	0.162	1.394
Dégradation basique	0.183	1.121	0.251	1.174
Dégradation peroxyde	0.147	1,198	0.153	1,069
Dégradation thermique	0.160	1.286	0.234	1,343

Tableau 4. Résultats du bilan de masse dans l'étude de la dégradation forcée

CONDITION	Teneur-1	Teneur-2	Moyenne	% Dégradation	% IMPURETÉ	Masse Totale	% MB
ÉCHANTILLON TÉMOIN	107,20	106,70	106,95	0,0	0,0202	107,00	100,0
DÉGRADATION DE L'ACIDE 0,1N	101,87	100,10	100,99	6,0	0,0091	101,00	94,4
DÉGRADATION DE LA BASE 0,1N	101,40	102,60	102,00	5,0	0,0038	102,00	95,3
DÉGRADATION AU PEROXYDE 3%	101,80	101,80	101,80	5,2	0,0277	101,80	95,1
TEMPÉRATURE -80°C-5 JOURS	102,30	101,50	101,90	5,1	0,0371	101,90	95,2

Tableau 5. Résultats de la linéarité du Principe actif

Principe actif				
% Niveau	Réponse observée (Y1)	Réponse calculée (Y2)	Diff (Y1-Y2)	Diff ² (Y1-Y2) ²
10%	16578	18361,046	-1783,046	3179254,164
20%	38544	44274,856	-5730,85	32842710,492
50%	126782	122016,285	4765,714	22712038,959
80%	203473	199757,714	3715,285	13803349,279
100%	254822	251585,333	3236,666	10476010,202
120%	301076	303412,952	-2336,952	5461348,586
150%	382613	381154,381	1458,618	2127566,777
200%	507398	510723,430	-3325,430	11058486,785
R ²	0,9995			RSS :101660765,247
Pente a	25913809,684			SD : 3810,901
Ordonnée b	-7552,8			
% Ordonnée b	2,963			

Tableau 6. Résultats de la linéarité de l'impureté X

Impureté X				
% niveau	Réponse observée (Y1)	Réponse calculée (Y2)	Diff (Y1-Y2)	Diff ² (Y1-Y2) ²
10%	5731	3620,568	2110,431	4453921,453
20%	9203	9145,160	57,840	3345,465
50%	23351	25718,934	-2367,934	5607114,932
80%	39398	42292,709	-2894,709	8379342,915
100%	53657	53341,892	315,107	99292,654
120%	67311	64391,075	2919,924	8525957,392
150%	81486	80964,850	521,149	271596,770
200%	107926	108587,808	-661,808	437990,384
R ²	0.9969			RSS : 27778561,969
Pente a	27622957,894			SD : 1992,075
Ordonnée b	-1904			
% Ordonnée b	3,548			

Tableau 7. Résultats du RRF pour le principe actif et l'impureté X

Substance	Pente	RRF
Principe actif	25913809,684	1,066
Impureté X	27622957,894	

Tableau 8. Valeur du LOD et LOQ

Substance	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
Principe actif	0,0004853	0,001470606
Impureté X	0,000237985	0,000721167

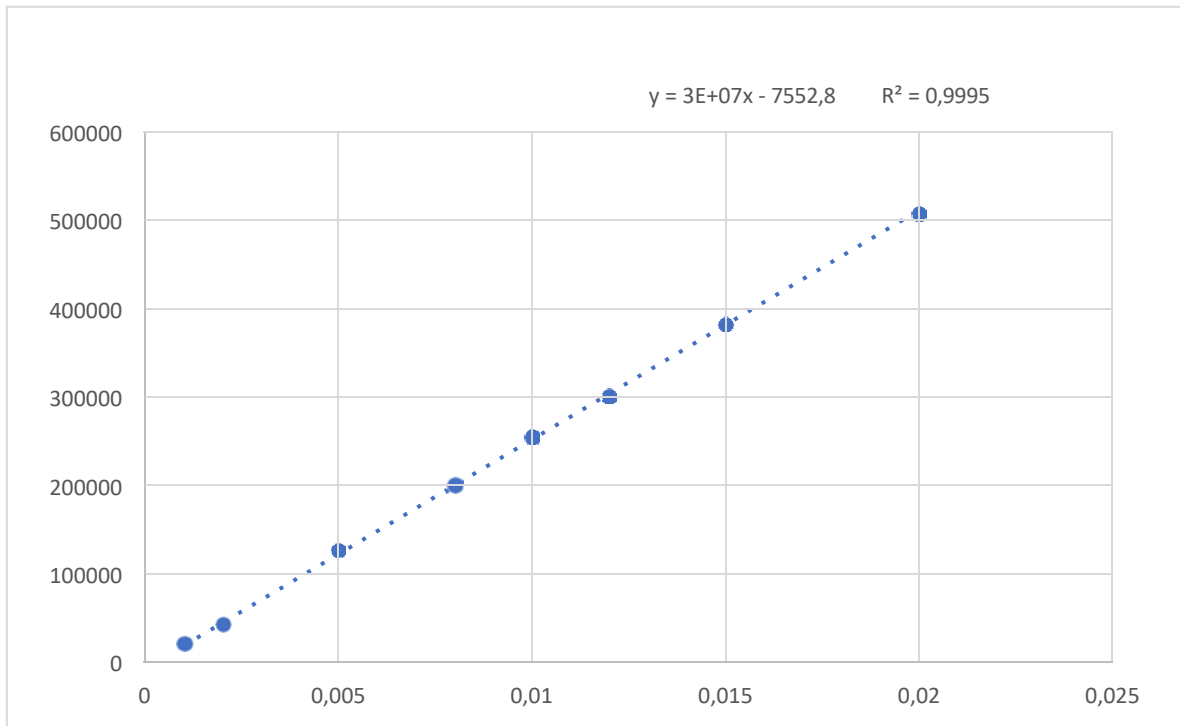


Figure 1. Courbe de régression linéaire du Principe actif.

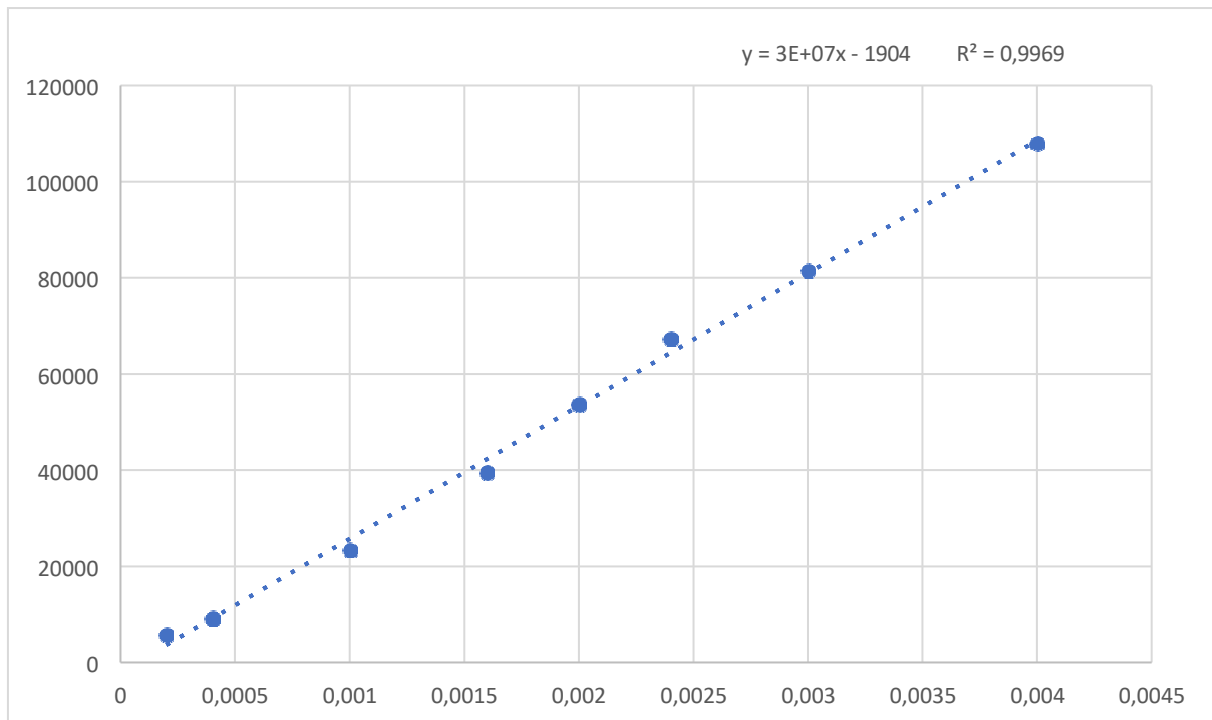


Figure 2. Courbe de régression linéaire de l'impureté X.

Tableau 9. Résultats de l'exactitude de l'impureté X

Niveau d'exactitude	Préparations	%Récupération	%Moyenne	%RSD
LOQ	1	89,5	90,37	1,08
	2	91,1		
	3	90,1		
	4	89,6		
	5	92,0		
	6	89,9		
50%	1	87,3	84,2	2,8
	2	80,7		
	3	84,7		
100%	1	88,7	89,3	1,5
	2	88,4		
	3	90,4		
150%	1	86,0	87,3	2,7
	2	86,0		
	3	90,0		

Tableau 10. Résultats de précision du système

Standard	Principe actif	Impureté X
RSD%	0.943	0.270

Tableau 11. Résultats de la répétabilité

/	% Impureté X
Echantillon chargé 1	0.414
Echantillon chargé 2	0.411
Echantillon chargé 3	0.406
Echantillon chargé 4	0.422
Echantillon chargé 5	0.414
Echantillon chargé 6	0.423
Moyenne	0.415
SD	0.007
%RSD	1.68

Tableau 12. : Résultats de la fidélité intermédiaire

/	% Impureté X (Jour 1/Analyste 1/Instrument1)	% Impureté X (Jour1/Analyste 2/Instrument2)
Echantillon chargé 1	0.414	0.393
Echantillon chargé 2	0.411	0.393
Echantillon chargé 3	0.406	0.395
Echantillon chargé 4	0.422	0.395
Echantillon chargé 5	0.414	0.401
Echantillon chargé 6	0.423	0.427
Moyenne	0.415	0.401
SD	0.007	0.013
RSD %	1.68	3.30
%RSD 1 + %RSD 2	4,98	

Tableau 13. Résultats de la conformité du système de la robustesse

Conditions	Variations	Temps de rétention (min)		Facteur d'asymétrie		Nombre de plateaux Théoriques		Facteur de résolution	
		PA	Imp X	PA	Imp X	PA	Imp X	PA	Imp X
Contrôle	-	34,80	31,15	1,59	1,62	7239	7684	2,38	
Température (°C)	20	35,93	31,82	1,90	1,85	6147	7387	2,48	
	30	32,33	29,04	1,94	1,88	6581	8055	2,27	
Débit (mL/min)	0.5	41,22	36,75	1,95	1,09	6251	7941	2,39	
	0.7	29,46	26,28	1,80	1,11	5832	7652	2,31	
PH	6.7	29,82	26,45	1,22	0,84	5647	14134	2,64	
	6.9	33,83	30,13	1,40	0,74	3879	8548	2,12	
Longueur d'onde (nm)	204	34,53	30,79	1,13	1,15	5997	7324	2,32	
	208	34,39	30,69	1,10	1,11	6115	8226	2,38	

Tableau 14. Résultats des temps de rétention relatif

Conditions	Variations	RRT
Contrôle	-	0,89
Température (°C)	-5	0,88
	+5	0,89
Débit (mL/min)	-0.1	0,89
	+0.1	0,89
pH	-0.1	0,88
	+0.1	0,89
Longueur d'onde (nm)	-2	0,89
	+2	0,89

III.2. Spécificité

L'analyse des chromatogrammes obtenus (figure 3-14), a révélé l'absence de pics chromatographiques aux temps de rétention du PA et de son impureté dans les solutions de blanc, du placebo et de phase mobile, ce qui témoigne d'une bonne spécificité de la méthode. Les solutions standards ont permis d'identifier avec précision ces temps de rétention (Tableau 02). La solution d'identification des pics a également mis en évidence une résolution satisfaisante entre les pics des deux composés.

La pureté des pics correspondant au principe actif et à son impureté a été vérifiée par un indice de pureté de 0,99, confirmant ainsi la spécificité de la méthode analytique.

III.3. Dégradation forcée

Les études de dégradation forcée menées sous les différentes conditions de stress ont indiqué qu'aucune interférence du placebo n'a été observée aux temps de rétention du principe actif et de son impureté X. Tous les pics de dégradation générés, y compris celui de l'impureté, ont été séparés les uns des autres, ainsi que du pic du principe actif (Figure 15- 26).

Les données de pureté des pics (Tableau 03) obtenues dans chaque échantillon soumis aux conditions de stress montre que les pics du PA et son impureté sont homogènes et qu'aucune co-élution n'a été observée, la pureté des pics est donc jugée conforme aussi bien pour le PA et que son impureté dans l'échantillon témoin comme dans ceux soumis aux conditions de stress.

En tenant compte des marges d'erreurs analytiques, le bilan massique a montré des résultats satisfaisants sans perte significative de masse. (Tableau 04)

Ces résultats valident la méthode comme étant à la fois spécifique et indicatrice de stabilité.

III.4. Linéarité

Les courbes de régression linéaire obtenues sur la plage de calibration 10% à 200% montrent une excellente corrélation entre la surface du pic et la concentration du principe actif et de l'impureté avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,99 (Figure 1 et 2).

Les valeurs de %RSD des six injections répétées pour chaque niveau de concentration sont toutes comprises dans les critères établis, confirmant une excellente répétabilité sur la plage étudiée.

Pour le PA (Tableau 05), la linéarité a été évaluée sur une plage de 10% à 200%. Bien que le coefficient de détermination ($R^2 = 0,9997$) et l'ordonnée à l'origine soient acceptables, la concentration à 10% est inférieure au LOQ, ce qui rend ce niveau non fiable pour une quantification précise. Par conséquent, la plage validée s'étend du LOQ à 200%. Le niveau à 10% peut être utilisé pour une évaluation qualitative (détection), mais ne doit pas être considéré pour une analyse quantitative.

Pour l'impureté X (Tableau 06) : La linéarité a été évaluée sur une plage de 10% à 200%. Bien que le coefficient de détermination ($R^2 = 0,9985$) et l'ordonnée à l'origine soient acceptables, les concentrations à 10% et 20% sont inférieures à la LOQ, ce qui rend ces deux niveaux non fiables pour une quantification précise. Ainsi, la plage validée s'étend du LOQ à 200%.

Le % de l'ordonnée à l'origine de la droite de régression obtenue pour le principe actif et son impureté se situe dans la limite acceptable ce qui indique l'absence d'un biais systématique.

Le RRF est déterminé à 1,066 aucune correction n'est alors appliquée lors de la quantification (Tableau 07).

Ces résultats confirment ainsi la linéarité de la méthode pour la quantification du principe actif et de l'impureté.

III.5. Limite de détection et limite de quantification (LOD et LOQ)

Les valeurs de la LOD et la LOQ (Tableau 08) étaient assez basses, avec un %RSD pour LOD inférieur à 33% et pour LOQ inférieur à 15 % pour les six injections, indiquant que la méthode est sensible pour détecter et quantifier les très faibles concentrations, ce qui la rend particulièrement adaptée au dosage de l'impureté.

III.6. Exactitude

Au niveau de la LOQ, les taux de récupération individuels se sont situés entre 70 % et 130 %, avec un %RSD inférieur à 15 %. Pour les niveaux de 50 %, 100 % et 150 %, toutes les récupérations ont été comprises entre 80 % et 120 %, avec des %RSD inférieurs à 10 %. Les moyennes de récupération pour chaque niveau étaient également conformes aux intervalles préétablis (Tableau 09).

Ces résultats confirment que, quel que soit le niveau de concentration, la récupération respecte systématiquement les critères d'acceptation. En conséquence, la méthode HPLC développée pour le dosage de l'impureté X, dans la spécialité pharmaceutique est jugée exacte.

III.7. Fidélité

Les valeurs du %RSD obtenues pour la précision du système ont été inférieures à 2 % pour le PA et à 10 % pour son impureté (Tableau 10), indiquant une bonne précision du système. Le %RSD calculé pour la répétabilité (Tableau 11), ainsi que ceux obtenus individuellement pour la fidélité intermédiaire (Tableau 12) de l'impureté X, sont restés inférieurs à 10 %. Le %RSD combiné, des deux analystes, est également resté en dessous de ce seuil, confirmant ainsi la fidélité de la méthode.

III.8. Robustesse

L'évaluation de la robustesse montre que la méthode analytique conserve ses performances sous les variations contrôlées des paramètres critiques. Les résultats (Tableau 13) indiquent que les temps de rétention du principe actif (PA) et de l'impureté X restent proches des valeurs obtenues en conditions de contrôle sans dérive significative.

Les facteurs d'asymétrie mesurés pour le PA et l'impureté X demeurent dans les limites acceptées, ce qui indique que la symétrie des pics n'est pas altérée. Le nombre de plateaux théoriques présente des fluctuations limitées et reste conforme aux critères d'efficacité établis. Le facteur de résolution entre le PA et l'impureté X se maintient au-delà de la valeur minimale spécifiée pour toutes les conditions évaluées, ce qui confirme une séparation adéquate.

Les données (Tableau 14) montrent que RRT de l'impureté X par rapport au PA se situe entre 0,88 et 0,89, valeur comprise dans la limite d'acceptation de $\pm 0,05$. Cette constance du RRT indique l'absence de modification de la hiérarchie de rétention entre les analytes sous l'effet des variations appliquées.

Par conséquent, la méthode est robuste face à de légères variations de température, débit, pH de la phase mobile, et la longueur d'onde de détection.

IV. CONCLUSION

La validation d'une procédure analytique constitue une étape indispensable dans un système exhaustif d'assurance qualité, notamment dans le domaine de l'industrie pharmaceutique. À cet effet, des textes réglementaires stricts et complexes s'imposent.

Ce travail s'inscrit dans une démarche de renforcement du contrôle qualité des

médicaments, en réponse aux exigences réglementaires actuelles. Il a pour objectif d'étudier la validation d'une méthode chromatographique liquide à haute performance pour la quantification d'une impureté connue, structurellement proche du principe actif, en se basant sur les recommandations de la norme ICH Q2(R2), par chromatographie (HPLC).

Les résultats de la linéarité ont démontré que la méthode est appliquée dans une plage de travail recommandée allant du LOQ à 200 %. Une investigation complémentaire serait toutefois nécessaire pour étendre cette validation à 10 %.

Pour les autres paramètres, les données ont prouvé que la méthode développée, en plus d'être spécifique, fidèle, exacte et robuste, est également indicatrice de stabilité, ce qui en fait un outil analytique fiable. Cela confirme la validité de la méthode (appuyée par les études de stabilité des solutions qui sont en cours) et son aptitude à être utilisée en routine par le laboratoire pour le dosage de l'impureté X.

La présente étude a montré que cette méthode HPLC-DAD surpasse nettement la technique traditionnelle par CCM et représente un progrès significatif en matière de qualité analytique. Elle répond pleinement aux exigences actuelles des autorités réglementaires et s'inscrit dans une démarche d'excellence, au service de la sécurité du patient et de la conformité pharmaceutique.

Recommandations :

Dans une perspective analytique rigoureuse, l'utilisation d'une courbe d'étalonnage, idéalement multipoints, est essentielle pour garantir la précision des résultats et l'évaluation fiable des performances de la méthode, tout en assurant un suivi permettant de détecter toute dérive susceptible d'en compromettre la fiabilité.

La vérification périodique de la linéarité, adaptée à la matrice étudiée et conforme aux recommandations de la SFSTP, permettra de

garantir la fiabilité de la méthode dans des conditions réelles (évaluation de l'effet matrice afin de détecter toute influence susceptible d'altérer la réponse analytique).

Il serait également pertinent d'approfondir l'étude de robustesse en élargissant les facteurs évalués, notamment en analysant les interactions potentielles entre les impuretés, les excipients et les variations instrumentales, afin de renforcer la fiabilité de la méthode dans des conditions de production étendues. L'application de ces recommandations contribuerait à consolider la conformité réglementaire et la performance analytique des méthodes utilisées.

Références Bibliographiques :

1. Vaishnawi R. Bhagwat, Chetan M. Jain, Nitin I. Kochar, Krutika S. Sonar. Review on method development and validation for different pharmaceutical dosage form. GSC Biol Pharm Sci.
2. Alekhacharan S, Raul SK, Padhy GK. Stability Development Strategies and Impurities Profile Consideration in Pharmaceuticals: A Review. Int J Pharm Sci Rev Res..
3. Attjioui H. Étude de stabilité et dosage des produits de dégradation de l'amoxicilline par chromatographie liquide à haute performance dans une forme pharmaceutique orale. 2021.
4. ALLACHE MBAREK CHABANE M, AMINE CHEBALLAH MEHDI. MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DU PIROXICAM DANS DES COMPRIMES DE 20 mg PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE. Université Mouloud MAAMERI de Tizi-Ouzou; 2020.
5. Teja GS, Archana D, Srinu B, Ali SkA, Reddy SSN, Parvez Sk, et al. A Comprehensive Guide for Analytical Method Validation. Int J Pharm Sci Rev Res.
6. Benoufella Mohammed Amine, Kaci Sarah, Kaci Dihia, Mahmoudi Maya. Mise au point et validation d'une méthode de dosage du miconazole dans le gel à 2% par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Université Mouloud MAAMERI de Tizi-Ouzou; 2022.
7. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH M4Q(R2) Guideline on the Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Quality.
8. Parmar I, Rathod H, Shaik S. A Review: Recent Trends in Analytical Techniques for Characterization and Structure Elucidation of Impurities in the Drug Substances. Indian J Pharm Sci.
9. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Impurities in New Drug Products [Internet]. Genève, Suisse; 2006 juin. Report No.: Q3B (R2).
10. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures – ICH Harmonised Guideline Q2(R2).
11. United States Pharmacopeial Convention. <621> Chromatography. In: United States Pharmacopeia 35.
12. Islam R, Mohammad Khan E, Ahmed K, Azeez Z. Development and Validation of RP-HPLC-DAD Stability Indicating Related Substances Method for the Estimation of Impurities of Norethindrone Tablets and their Degradation Products. Pharm Anal Chem Open Access.
13. Papadoyannis IN, Gika HG. Peak Purity Determination with a Diode Array Detector. J Liq Chromatogr Relat Technol..
14. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of New Drug Substances and Products [Internet]. Genève, Suisse; 2003 févr. Report No.: Q1A (R2).
15. Dr Dr Balamurugan K. Achieving and Understanding Mass Balance in Forced Degradation Studies: A Comprehensive Review [Internet]. ResearchGate; 2024.
16. Reynolds, D.W.; Facchine, K.L.; Mullaney, J.F.; Alsante, K.M.; Hatajik, T.D.; Motto, M.G. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies.
17. Purkar S. R, Chikhale H. U., Pund H. V., Sancheti N. S., Tatiya K. A Review on Force

Degradation Studies for Drug Substances. Int J Adv Res Sci Commun Technol.

18. Nussbaum, M.A. ; Jansen, P.J. ; Baertschi, S.W. Role of “Mass Balance” in Pharmaceutical Stress Testing. In: Pharmaceutical Stress Testing: Understanding Drug Degradation. New York: Taylor & Francis Group; 2005. p. 181-204.
19. United States Pharmacopeial Convention. <1225> Validation of Compendial Procedures. In: United States Pharmacopeia.
20. Indian Pharmacopoeia Commission (IPC). Validation of analytical methods [Internet]. Indian Pharmacopoeia Commission, Ministry of Health & Family Welfare, Government of India; 2021.
21. Protocole-SAIDAL- Confidentiel

Figures chromatographiques :

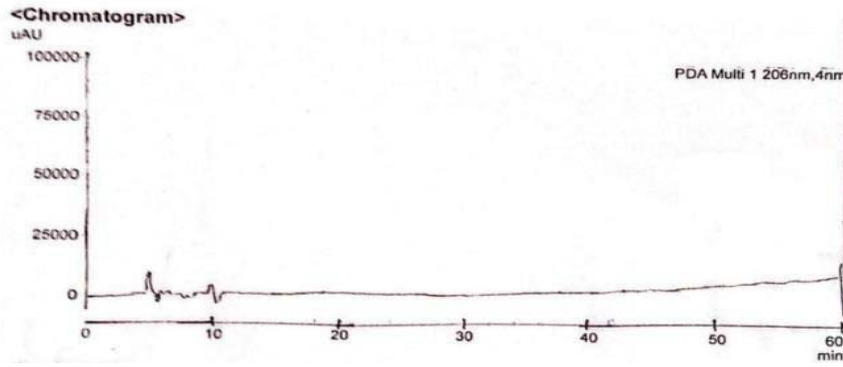


Figure 03. Chromatogramme de la phase mobile

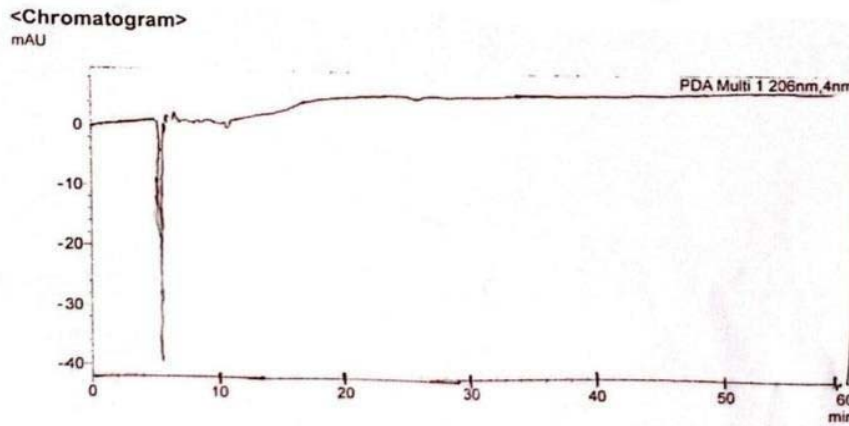


Figure 04. Chromatogramme de la solution placebo

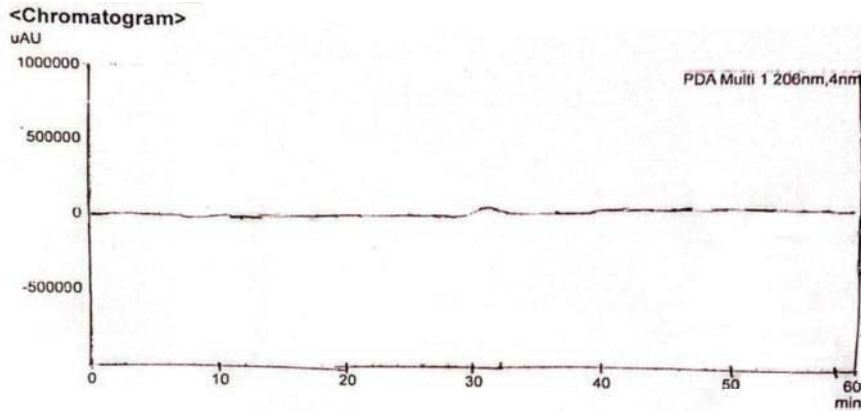


Figure 05. Chromatogramme du blanc

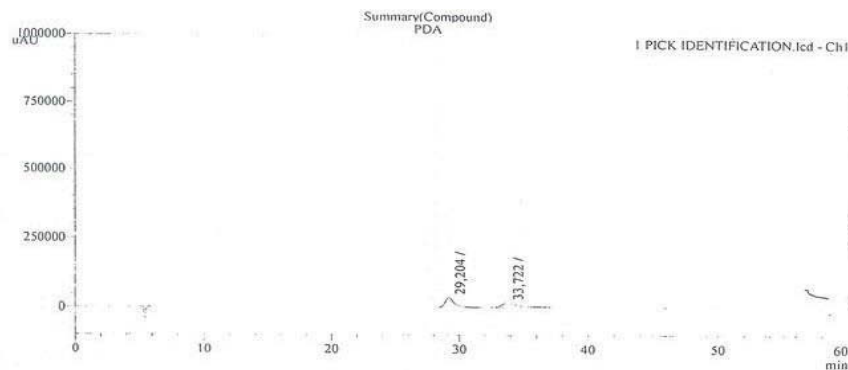


Figure 06. Chromatogramme de la solution d'identification des pics

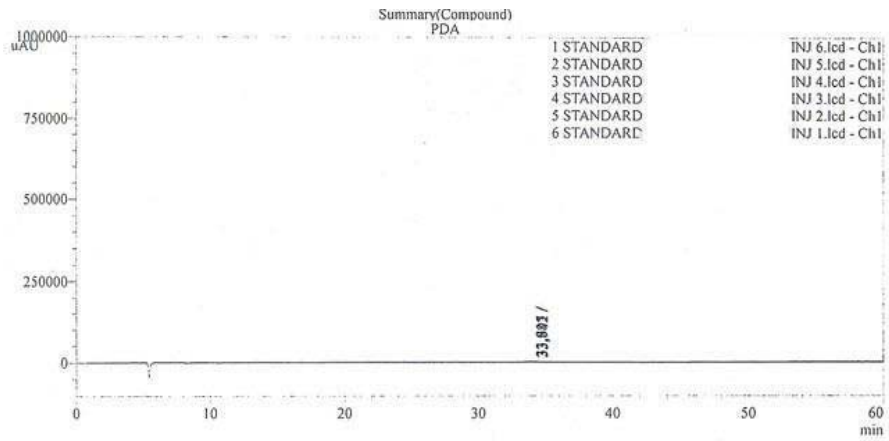


Figure 07. Chromatogramme de la solution standard du principe actif

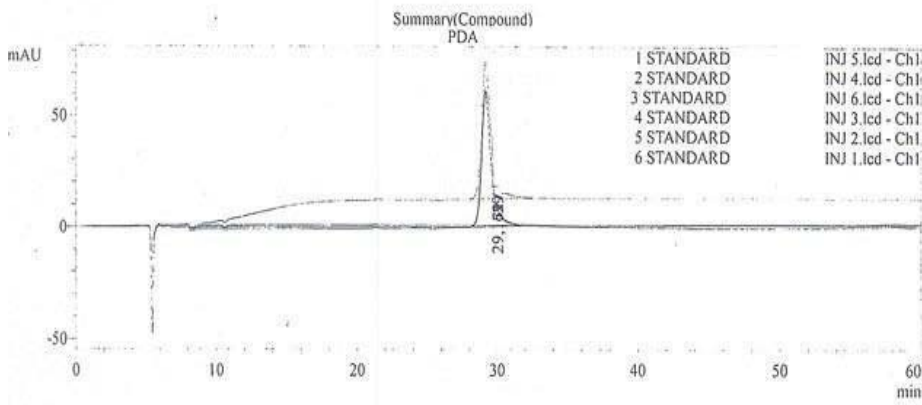


Figure 08. Chromatogramme de la solution standard de l'impurété X

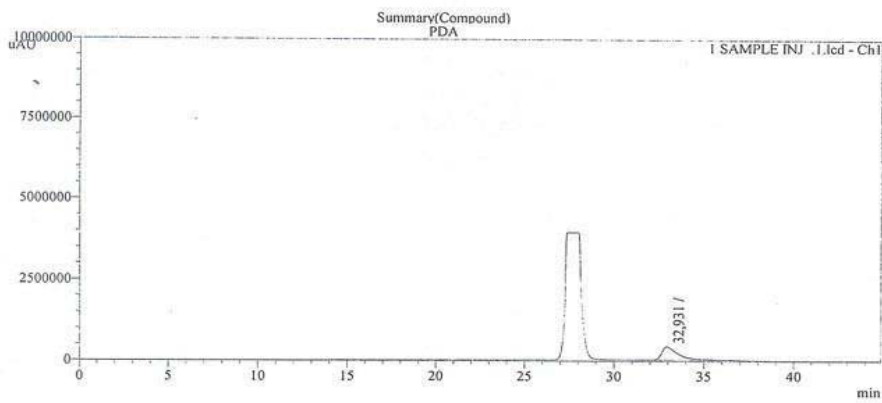


Figure 09. Chromatogramme de l'échantillon injection 1

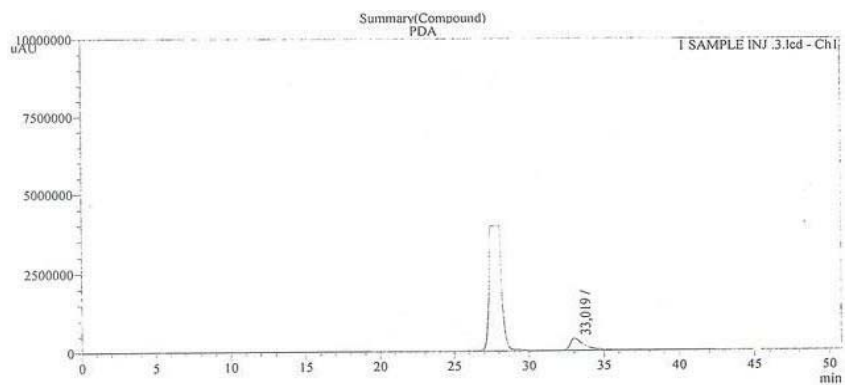


Figure 10. Chromatogramme de l'échantillon injection 2

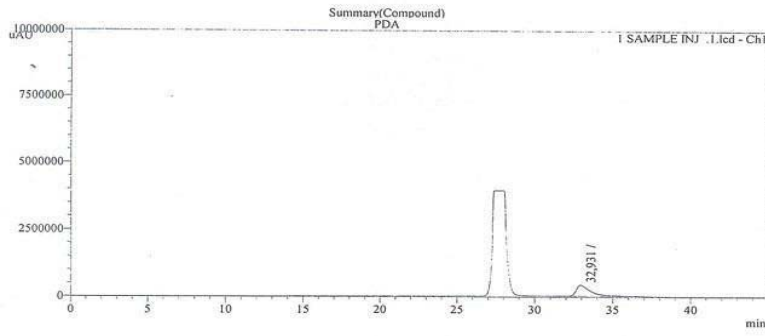


Figure 11. Chromatogramme de l'échantillon injection 3

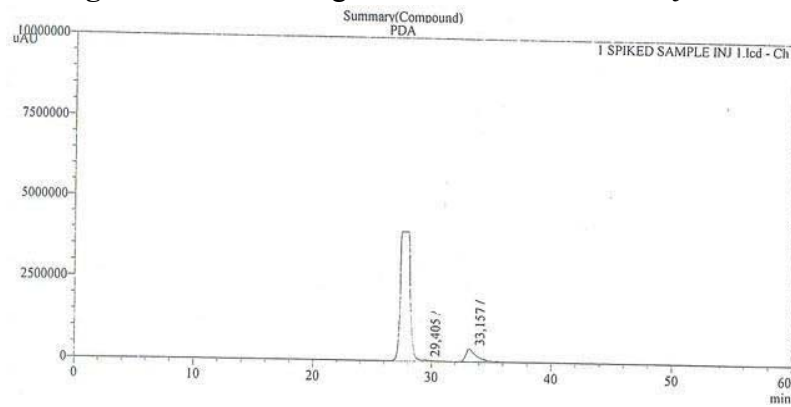


Figure 12. Chromatogramme de l'échantillon chargé injection 1

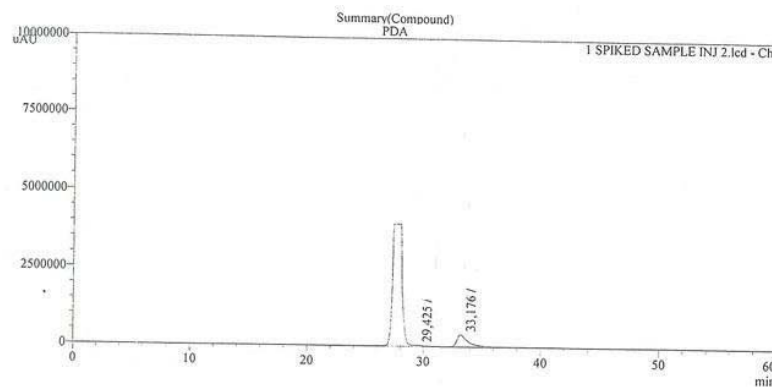


Figure 13. Chromatogramme de l'échantillon chargé injection 2

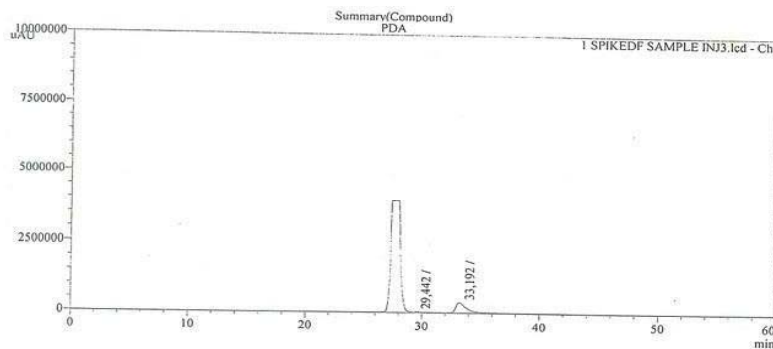


Figure 14. Chromatogramme de l'échantillon chargé injection 3

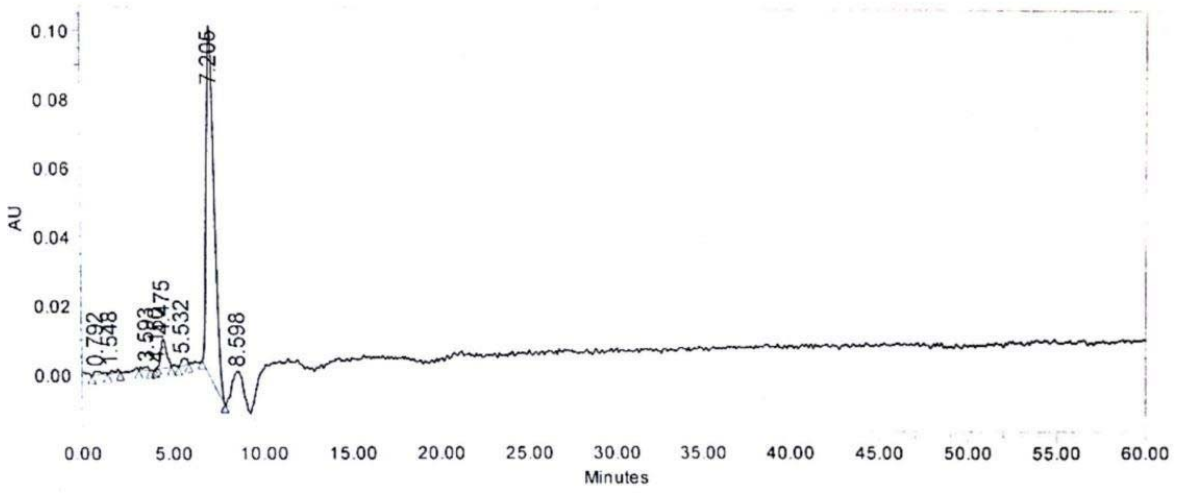


Figure 15. Chromatogramme du placebo HCl

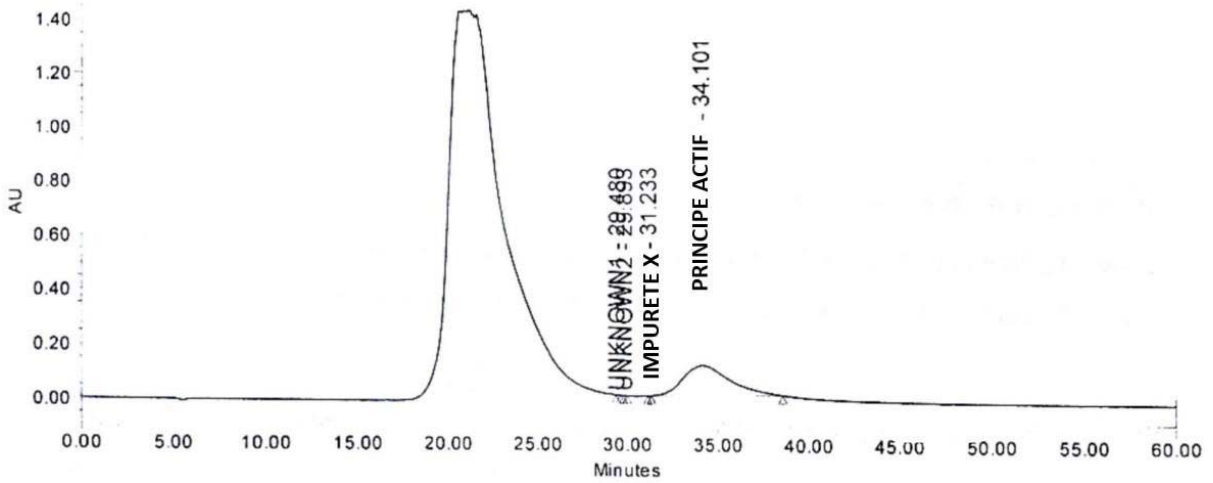


Figure 16. Chromatogramme de l'échantillon dégradé non dilué HCl

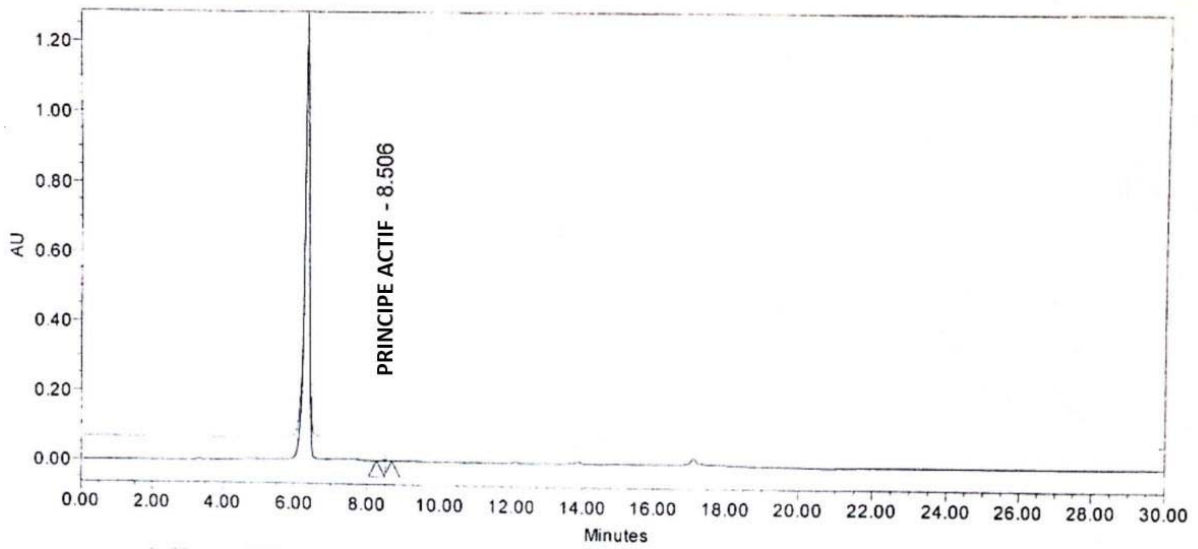


Figure 17. Chromatogramme de l'échantillon dégradé dilué HCl

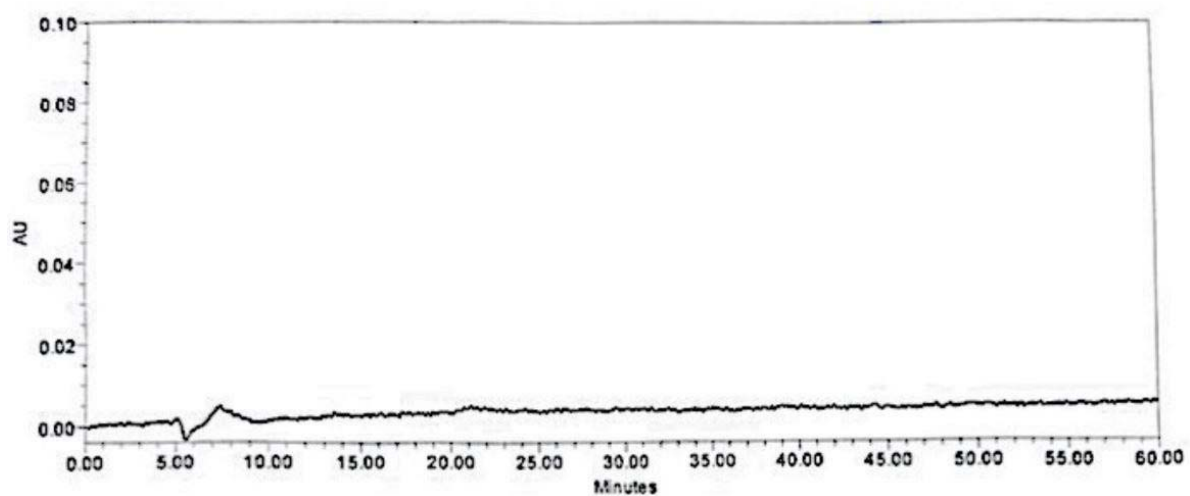


Figure 18. Chromatogramme du placebo NAOH

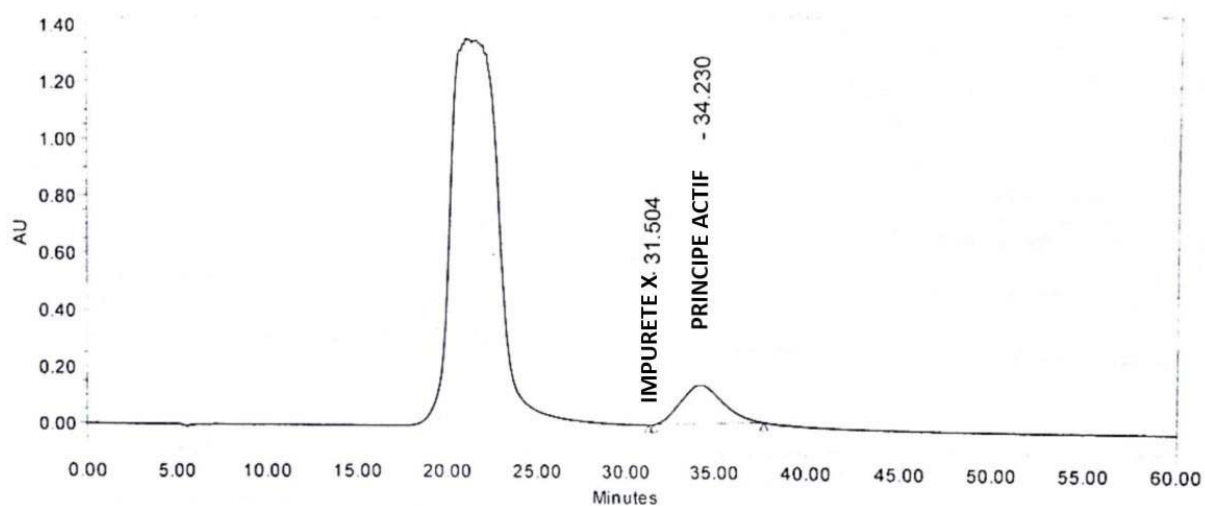


Figure 19. Chromatogramme de l'échantillon dégradé non dilué NAOH

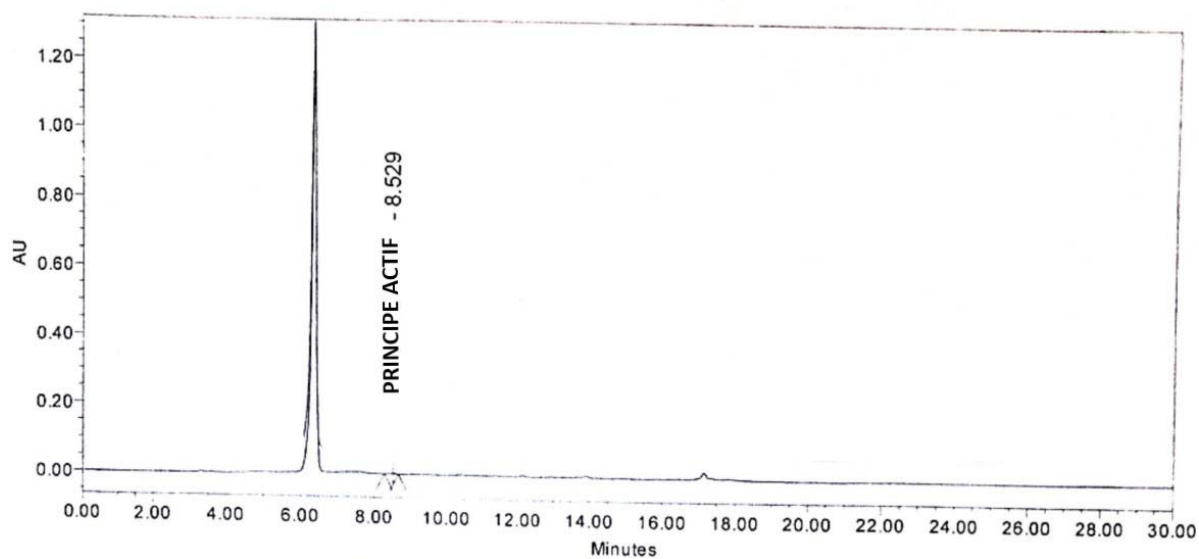


Figure 20. Chromatogramme de l'échantillon dégradé dilué NAOH

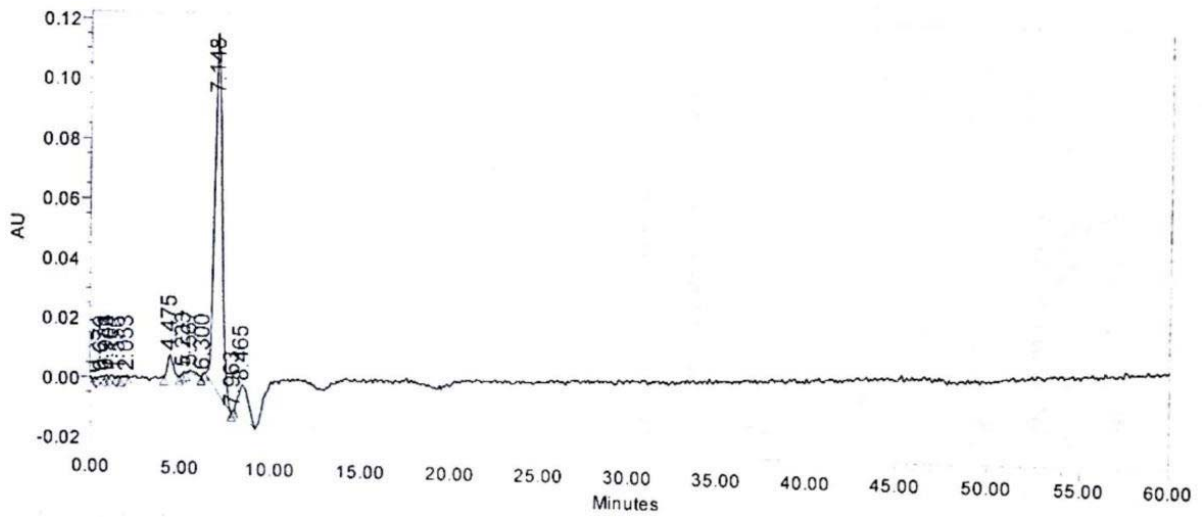


Figure 21. Chromatogramme du placebo H_2O_2

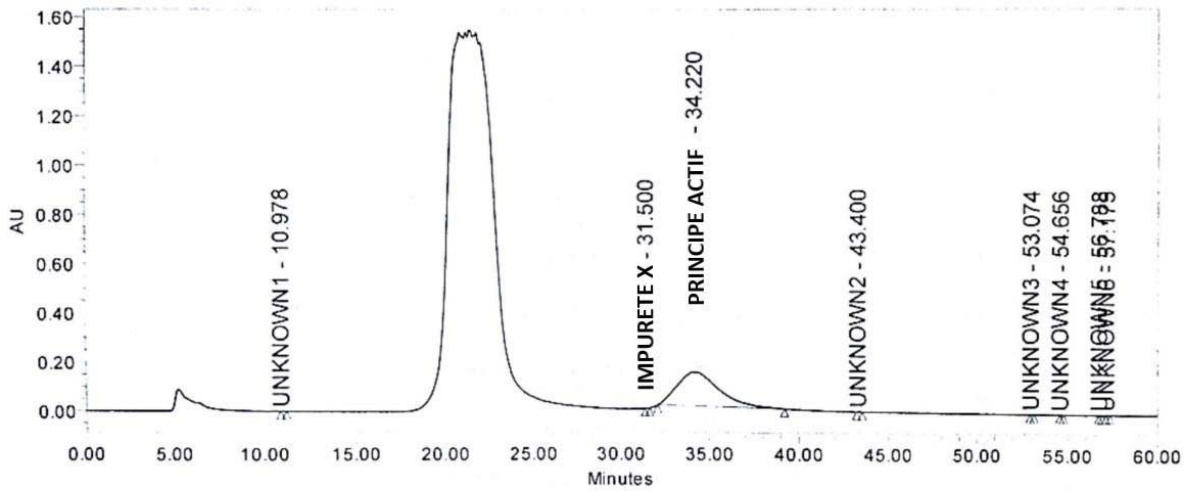


Figure 22. Chromatogramme de l'échantillon dégradé non dilué H_2O_2

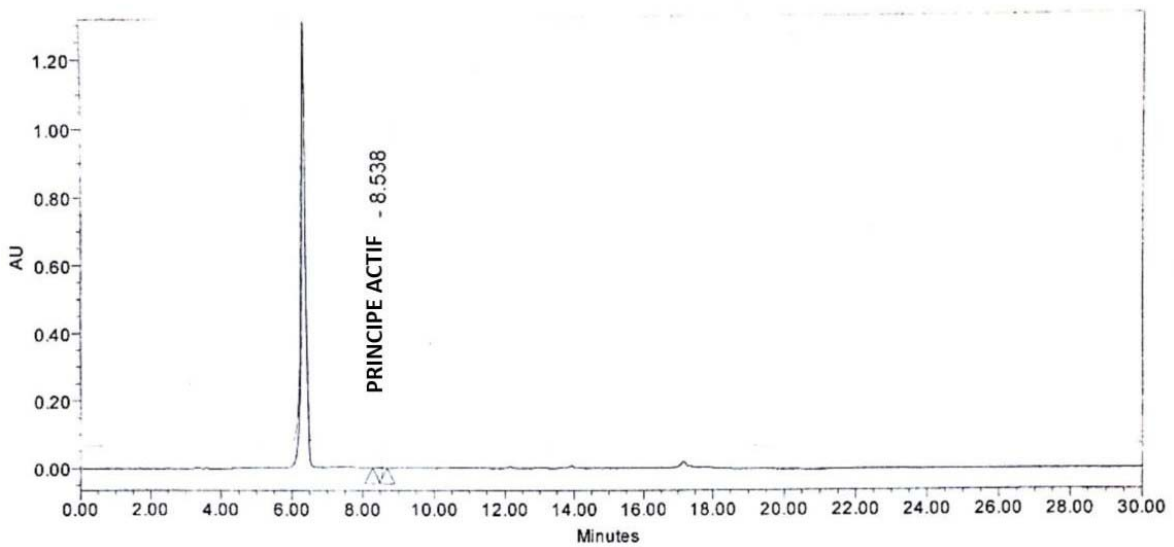


Figure 23. Chromatogramme de l'échantillon dégradé dilué H_2O_2

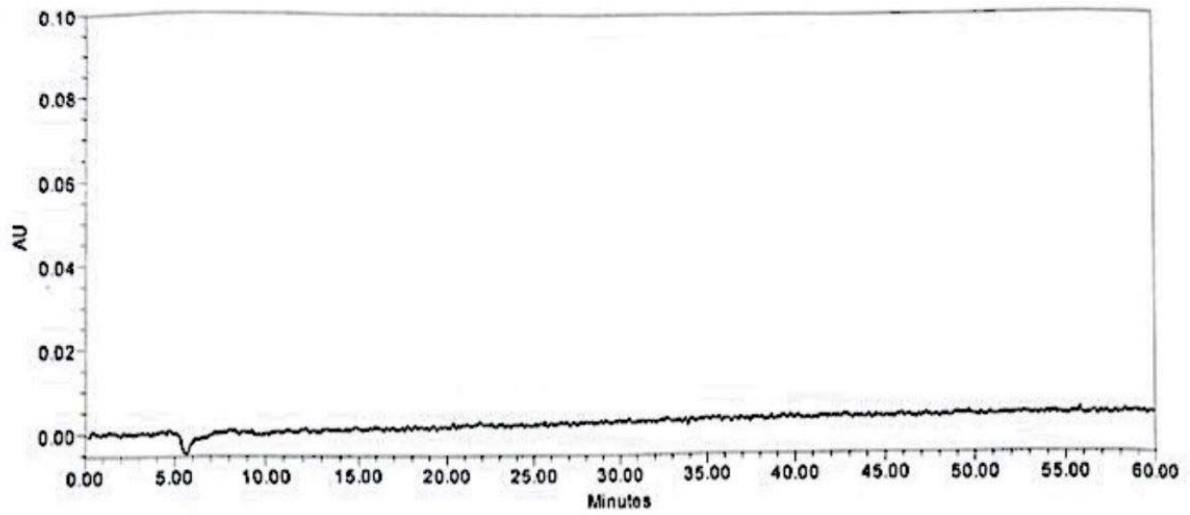


Figure 24. Chromatogramme du placebo T°C

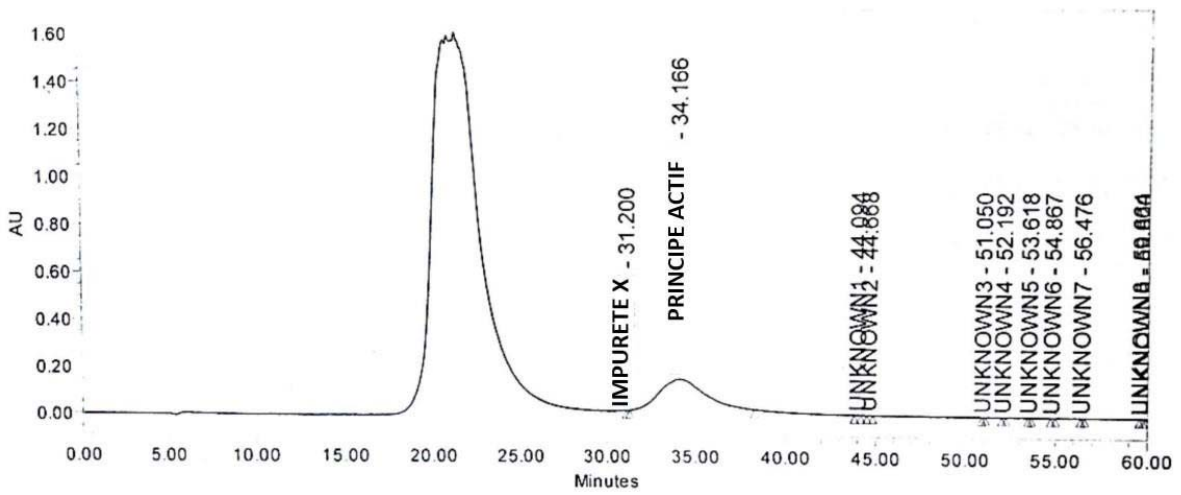


Figure 25. Chromatogramme de l'échantillon dégradé non dilué T°C

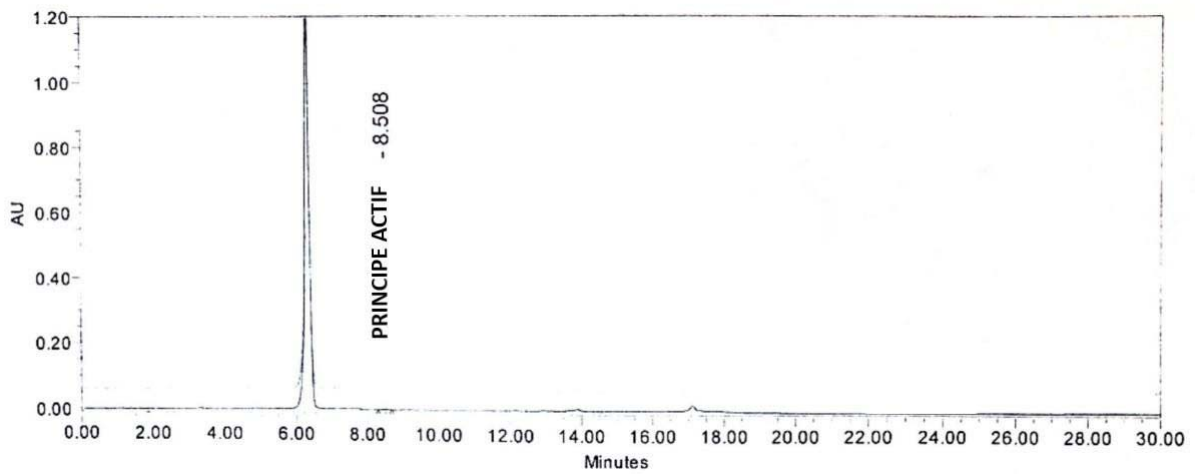


Figure 26. Chromatogramme de l'échantillon dégradé dilué T°C