REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SALAH BOUBNIDER CONSTANTINE 3
FACULTE DE MEDECINE Dr BELKACEM BENSMAIL
DEPARTEMENT DE PHARMACIE



THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN SCIENCES MEDICALES (D.E.S.M)

DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES INDICATIVES DE LA STABILITE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES

SPECIALITE : CHIMIE ANALYTIQUE

PRESENTEE PAR : TITEL Faouzi

JURY :

HADEF Youcef	Professeur ; Faculté de Médecine d'Annaba	**Directeur de thèse**
BOUDIS Abdelhakim	Professeur ; Faculté de Pharmacie d'Alger	**Président de jury**
LALAOUNA Abdel El Djalil	Professeur ; Faculté de Médecine de Constantine	**Membre de jury**
CHERIF Redouane Amin	Professeur ; Faculté de Pharmacie d'Alger	**Membre de jury**
MAMOU Marzouk	Professeur ; Faculté de Médecine de Tizi Ouzou	**Membre de jury**

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2023 - 2024

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le bon Dieu tout puissant, source de tout savoir et de toute connaissance.

Je tiens ensuite à remercier sincèrement mon directeur de thèse, le Professeur HADEF Youcef. Ses conseils avisés, son expertise et sa disponibilité ont été des éléments clés pour la réalisation de ce projet. Sa patience et son soutien constant m'ont permis de surmonter les défis et d'atteindre mes objectifs de recherche.

Je souhaite également exprimer ma gratitude aux membres du jury : Pr BOUDIS Abdelhakim, Pr LALAOUNA Abdel El Djalil, Pr MAMOU Marzouk et Pr CHERIF Redouane Amin, qui ont bien voulu expertiser ce travail. À travers ce modeste travail, je vous adresse mes vifs remerciements ainsi que mon profond respect.

Je remercie les Laboratoires ISOPHARM-Algérie pour le soutien apporté à ce projet. Leur aide a été cruciale pour la réalisation de cette recherche.

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude envers tous les enseignants, chercheurs et professionnels rencontrés au cours de mon parcours académique. Ils ont enrichi mon expérience et m'ont inspiré à poursuivre cette voie.

Merci à tous.

Dédicaces

À mes parents, Baghdadi et Leila, qui ont toujours été mes premiers supporters et mes plus grands exemples. Leur amour inconditionnel, leur soutien sans faille et leur confiance inébranlable en moi m'ont donné la force de persévérer et de réaliser ce rêve.

À ma petite famille, mon épouse Naouel et mes fils : Islem, Nour et Siradj, pour leur patience, leur compréhension et leur amour constant. Votre soutien m'a été inestimable.

À mes frères et sœurs : Amel, Ramzi, Foued, Mohamed et Ibtissem, pour leur amour, leur soutien et leurs encouragements constants. Leur présence réconfortante et leurs mots d'encouragement m'ont souvent redonné l'énergie nécessaire pour avancer.

À mes amis proches et à mes compagnons de parcours de la chambre universitaire G45 de Bab Ezzouar, pour leur soutien moral et leur amitié indéfectible. Les moments de partage, de rire et de réconfort avec vous ont été essentiels pour garder un équilibre tout au long de ce voyage académique.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES I
LISTE DES TABLEAUX VIII
LISTE DES ANNEXES XIII
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ACRONYMES XIV
DEFINITIONS XVII
INTRODUCTION GENERALE 1

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE 1. DEGRADATION DES MEDICAMENTS

I. Impuretés

1. Impuretés dans les substances actives 3
   1.1. Impuretés organiques 3
   1.2. Impuretés inorganiques 4
   1.3. Solvants résiduels 5
   1.4. Polymorphisme 5
   1.5. Pureté énantiomérique 6
2. Impuretés dans les produits finis 7
   2.1. Impuretés inorganiques et solvants résiduels 7
   2.2. Impuretés organiques 7

II. Dégradation forcée

1. Lignes directrices réglementaires 10
2. Objectifs de la dégradation forcée 12
3. Temps de réalisation des études de dégradation forcée 13
4. Stratégies de réalisation des études de dégradation forcée 15
5. Evaluation du risque 15
6. Evolution historique des essais de la dégradation forcée 16
7. Diverses conditions de dégradation 17
   7.1. Dégradation Thermolytique 18
   7.2. Dégradation hydrolytique 19
   7.3. Dégradation oxydative 21
   7.4. Dégradation photolytique 23
8. Approche expérimentale 24
9. Évaluation des résultats 26

III. Bilan massique

1. Mesure et expression du bilan massique 28
2. Investigation des problèmes du bilan massique 29
3. Considérations analytiques 33
3.1. Pureté des pics 34
3.2. Détection et facteurs de réponse Rf 34
3.3. Variabilité Analytique 35

CHAPITRE 2. OPTIMISATION ET VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES

I. Application des plans d'expériences dans l'optimisation

1. Définition 37
2. Vocabulaire employé lors d'une étude par des plans d'expériences 37
2.1. Réponse 37
2.2. Facteur, niveau et domaine de variation d'un facteur 37
2.3. Espace expérimental et domaine d'étude 37
2.4. Matrice d'expérience 38
2.5. Interactions factorielles 39
3. Démarches méthodologiques 39
4. Différents types de plans d'expériences 40
4.1. Plans de criblage 40
4.1.1. Plans factoriels complets 41
4.2.2. Plans factoriels fractionnaires 41
4.2. Plans pour surfaces de réponses 43
4.2.1. Plans composites : 43
4.2.2. Plans de BOX-BEHNKEN : 43
4.3. Plans de mélanges 44
5. Evaluation des Modèles 44
5.1.Analyse de la variance 44
5.2. Adéquation du modèle 44
5.2.1. Ajustement du modèle 44
5.2.2. Précision 45
5.3. Analyse des résidus 45

II. Validation des méthodes analytiques

1. Définition 46
2. Objectif de la validation 46
3. Aspects réglementaires 46
3.1. NORME ISO 17025 46
3.2. NORME ISO 5705 46
3.3. Guideline de la FDA 47
3.4. Normes AFNOR « NF V 03-110 » 47
3.5. Guidelines ICH 47
3.6. Documents des commissions de la SFSTP 48
4. Types de méthodes d'analyses à valider 48
5. Prévalidation 51
5.1. Linéarité de fonction de réponse 51
5.2. Vérification de l'effet de matrice 51
6. Estimation et évaluation des critères de validation 53
6.1. Spécificité-sélectivité 53
6.2. Intervalle 54
6.2.1 Réponse 56
6.2.2. Validation des limites inférieures de l'intervalle 57
6.3. Justesse et Fidélité 58
6.3.1. Justesse ou biais 58
6.3.2. Fidélité 59
6.3.3. Profil d'exactitude 62
6.4. Stabilité 63
6.5. Spécifications et Tests de Conformité du Système 63
7. Analyse statistique et modèles 64
7.1. Statistiques 64
7.2. Modèles 64
8. Revalidation des méthodes analytiques 65

CHAPITRE 3. ETUDES DE STABILITE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES

1. Types d'études de stabilité 66
1.1. Étude formelle de stabilité 66
1.1.1. Test de stabilité accéléré 66
1.1.2. Test sous conditions intermédiaires 67

1.1.3. Test de stabilité de longue durée (en temps réel) 67
1.2. Étude de stabilité post-approbation 69
1.2.1. Programme de suivi de la stabilité 70
1.2.2. Changements post-approbation 70
2. Evaluation des données de stabilité 72
2.1. Estimation des durées de vie 72
2.2. Etablissement des spécifications à libération 75

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE 1. PRESENTATION DU PRODUIT, EQUIPEMENTS, ET REACTIFS

I. Présentation du produit

1. Produit fini 78
2. Substance active 81
2.1. Caractéristiques générales 81
2.2. Schéma de synthèse 83

II. Equipements et réactifs

1. Equipements 85
2. Réactifs 85

CHAPITRE 2. ETUDE DE LA DEGRADATION FORCEE

I. Développement d'une méthode de dosage des impuretés

1. Choix du mode de séparation 89
2. Choix des dimensions de la colonne 90
3. Choix du mode de détection 91
4. Choix du débit 93
5. Choix de la phase mobile 94
5.1. pH de la phase mobile 94
5.2. Concentration en méthanol %B 95
5.3. Amélioration de la forme du pic 97
6. Température 99
7. Choix des concentrations et préparation des échantillons 101
8. Conclusion 105

II. Protocole de la dégradation forcée

1. Introduction 106
2. Matériels et méthodes 107
2.1. Préparation des réactifs 107

2.2. Préparation des solutions de la dégradation forcée 107
2.2.1. Stress thermique 107
2.2.2. Hydrolyse acide 1M 108
2.2.3. Hydrolyse basique 1M 108
2.2.4. Oxydation médiée par le peroxyde d'hydrogène 3% 109
2.2.5. Oxydation médiée par le fer ferrique 5mM 109
2.2.6. Stress photolytique 110
2.3. Méthode analytique 110
3. Résultats et Discussion 111
3.1. Stress thermique 111
3.2. Hydrolyse acide 119
3.3. Hydrolyse basique 127
3.4. Oxydation médiée par peroxyde d'hydrogène 135
3.5. Oxydation catalysée par le fer ferrique 143
3.6. Photo dégradation 151
3.7. Contamination par les métaux 160
4. Conclusion 161

CHAPITRE 3. OPTIMISATION ET VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE DES IMPURETES

I. Optimisation de la méthode de dosage des impuretés

1. Introduction 162
2. Matériels et méthodes 163
2.1. Critères d'optimisation (Réponses) 164
2.2. Choix des facteurs 164
2.3. Domaine expérimental et définition des niveaux des facteurs 165
2.3.1. Facteur pH 165
2.3.2. Facteur $\Delta\phi$ 165
2.3.3. Facteur Tg 165
2.4. Choix du plan expérimental 166
2.5. Matrice d'expériences 167
2.6. Solution préparée pour l'optimisation 167
2.7. Conditions chromatographiques 168
2.8. Validation du modèle d'optimisation 168
2.9. But de l'étude 169

3. Résultats et discussion 170
3.1. Résultats des essais d'optimisation 170
3.2. Plan factoriel complet 178
3.2.1. Etude des facteurs influençant la résolution entre MP et PDO (R-MP-PDO) 178
3.2.2. Etude des facteurs influençant la résolution entre PDO et OXO (R-PDO-OXO) 184
3.2.3. Etude des facteurs influençant la résolution entre OXO et PP (R-OXO-PP) 188
3.2.4. Etude des facteurs influençant le temps de rétention du PP (Tr-PP) 193
3.3. Plan central composite 200
3.3.1. Optimisation de la résolution entre MP et PDO (R-MP-PDO) 200
3.3.2. Optimisation de la résolution entre PDO et OXO (R-PDO-OXO) 204
3.3.3. Optimisation de la résolution entre OXO et PP (R-OXO-PP) 208
3.3.4. Optimisation du temps de rétention du PP (Tr-PP) 212
3.4. Optimisation des réponses 217
3.5. Validation du modèle d'optimisation 219
3.5.1. Valeurs prédites par les modèles 219
3.5.2. Analyse de l'échantillon 219
3.5.3. Comparaison des résultats 220
3.6. Dédoublement des pics chromatographiques (peak splitting) 222
3.7. Amélioration finale de la Méthode 224
4. Conclusion 228
II. Validation de la méthode de dosage des impuretés
1. Introduction 230
2. Matériels et méthodes 230
2.1. Intervalle de mesure (range) 230
2.2. Préparation des solutions 231
2.2.1. Solution tampon pH 6,8 231
2.2.2. Diluant 231
2.2.3. Solution standard stock 232
2.2.4. Solution du Placebo 232
2.2.5. Solutions de la série d'étalonnage 232
2.2.6. Solutions de la série de validation 233
2.3. Conditions Chromatographiques 235
2.4. Mode opératoire 236
2.5. Critères à valider 236

2.5.1. Spécificité-sélectivité 236
2.5.2. Linéarité des Réponses 236
2.5.3. Limite inférieure de l'intervalle 237
2.5.4. Justesse et Fidélité 237
2.5.5. Stabilité des solutions 238
2.5.6. Système de conformité 239
3. Résultats et discussion 240
3.1. Vérification de la conformité du système 240
3.1.1. Répétabilité 240
3.1.2. Facteur de symétrie 240
3.2. Spécificité-sélectivité 241
3.3. Linéarité des Réponses 243
3.3.1. Linéarité des Réponses sur le principe actif seul 243
3.3.2. Linéarité des Réponses sur le placébo chargé 251
3.3.3. Comparaison des droites de régression du principe actif seul et du placébo chargé 260
3.4. Limite inférieure de l'intervalle 262
3.5. Profil d'exactitude 263
3.6. Justesse 266
3.7. Fidélité 271
3.8. Stabilité des solutions 274
3.9. Optimisation des critères de conformité du système 275
3.9.1. Répétabilité 275
3.9.2. Résolution 276
3.9.3. Rapport signal/bruit 277
3.9.4. Facteur de symétrie 277
4. Conclusion 277

CHAPITRE 4. ETUDE DE LA STABILITE POST-APPROBATION

1. Introduction 281
2. Matériels et méthodes 281
2.1. Collecte des échantillons 281
2.2. Préparation des solutions 281
2.3. Analyse des échantillons 282
2.4. Vérification de la conformité du système 282

2.5. Dosage des impuretés 283
2.6. Etablissement des spécifications réglementaires 283
2.7. Etablissement des spécifications de libération 283
3. Résultats et discussion 284
3.1. Résultats brutes 284
3.2. Vérification de la conformité du système 286
3.3. Dosage des impuretés 288
3.4. Etablissement de critère d'acceptation pour le total des impuretés 290
3.5. Etablissement de spécification à libération 292
4. Conclusion 293
CONCLUSION GENERALE 296
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
ANNEXES
Annexe 1. Impuretés dans les substances actives et produits finis USP <1086> i
Annexe 2. Contrôle des impuretés organiques dans les substances actives et produits finis USP <476> vi
Annexe 3. Monographies de produits finis (PF) contenant des substances actives chimiquement définies : principes généraux ix
Annexe 4. Résumé des caractéristiques du produit TOPLEXIL, 0,33 mg/ml, sirop xii
Annexe 5. Monographie de l'Alimemazine hemitartrate Ph Eur 11.0 xxi
Annexe 6. Monographie de la promazine chlorhydrate Ph Eur 11.0 xxiii
Annexe 7. Techniques de séparation chromatographique Ph Eur 2.2.46 xxv

LISTE DES FIGURES

Figure 1	.	Stratégie globale pour la prédiction, l'identification et le contrôle des problèmes liés à la stabilité	**14**
Figure 2	.	Diagramme modifié d'Ishikawa	**29**
Figure 3	.	Définition du domaine d'expérience	**38**
Figure 4	.	Interactions factorielles	**39**
Figure 5	.	Différents types de plans d'expériences	**40**
Figure 6	.	Différents effets de matrice	**52**
Figure 7	.	Les quatre modèles de régression	**73**
Figure 8	.	Arbre de décision pour l'évaluation des données pour l'estimation de la durée de conservation des produits finis	**74**
Figure 9	.	Schéma générale de la synthèse de l'Oxomémazine HCl	**83**
Figure 10	.	Spectre UV de la SA dans l'intervalle 200 nm à 400 nm	**92**
Figure 11	.	Spectre UV de la SA, MP et PP dans l'intervalle 200 nm à 400 nm	**93**
Figure 12	.	Effet du pH sur la rétention de la substance active	**95**
Figure 13	.	Effet du pourcentage du méthanol sur la rétention de la substance active	**97**
Figure 14	.	Effet des silanols libres sur la forme du pic d'OXO	**98**
Figure 15	.	Effet de la triéthylamine TEA sur l'amélioration de la forme du pic d'OXO	**99**
Figure 16	.	Effet de la triéthylamine TEA et la température sur le pic d'OXO	**100**
Figure 17	.	Comparaison des chromatogrammes des solutions standard et échantillon à la même concentration de 0,222 mg/ml.	**102**
Figure 18	.	Comparaison des chromatogrammes de solution échantillon à des concentrations de 0,222 mg/ml et 0,111 mg/ml.	**103**
Figure 19	.	Comparaison des chromatogrammes de solution échantillon à 0,111 mg/ml, utilisant deux phases mobiles avec 50% de méthanol et 40% de méthanol.	**104**
Figure 20a	.	Rapport d'analyse de la substance active sous stress thermique au temps0 (Echantillon TDS0)	**113**

Figure 20b	.	Rapport d'analyse du produit fini sous stress thermique au temps 0 (Echantillon TDP0)	**114**
Figure 20c	.	Rapport d'analyse du placébo sous stress thermique au temps 0 (Echantillon TP0)	**115**
Figure 20d	.	Rapport d'analyse de la substance active sous stress thermique après 21 jours (Echantillon TDS21)	**116**
Figure 20e	.	Rapport d'analyse du produit fini sous stress thermique après 21 jours (Echantillon TDP21)	**117**
Figure 20f	.	Rapport d'analyse du placébo sous stress thermique après 21 jours (Echantillon TP21)	**118**
Figure 21a	.	Rapport d'analyse de la substance active sous hydrolyse acide au temps 0 (Echantillon ADS0)	**121**
Figure 21b	.	Rapport d'analyse du produit fini sous hydrolyse acide au temps 0 (Echantillon ADP0)	**122**
Figure 21c	.	Rapport d'analyse du placébo sous hydrolyse acide au temps 0 (Echantillon AP0)	**123**
Figure 21d	.	Rapport d'analyse de la substance active sous hydrolyse acide après 7 jours (Echantillon ADS7)	**124**
Figure 21e	.	Rapport d'analyse du produit fini sous hydrolyse acide après 7 jours (Echantillon ADP7)	**125**
Figure 21f	.	Rapport d'analyse du placébo sous hydrolyse acide après 7 jours (Echantillon AP7)	**126**
Figure 22a	.	Rapport d'analyse de la substance active sous hydrolyse basique au temps0 (Echantillon BDS0)	**129**
Figure 22b	.	Rapport d'analyse du produit fini sous hydrolyse basique au temps 0 (Echantillon BDP0)	**130**
Figure 22c	.	Rapport d'analyse du placébo sous hydrolyse basique au temps0 (Echantillon BP0)	**131**
Figure 22d	.	Rapport d'analyse de la substance active sous hydrolyse basique après 7 jours (Echantillon BDS7)	**132**
Figure 22e	.	Rapport d'analyse du produit fini sous hydrolyse basique après 7 jours (Echantillon BDP7)	**133**
Figure 22f	.	Rapport d'analyse du placébo sous hydrolyse basique après 7 jours (Echantillon BP7)	**134**

Figure 23a	.	Rapport d'analyse de la substance active sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène au temps0 (Echantillon ODS0)	**137**
Figure 23b	.	Rapport d'analyse du produit fini sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène au temps0 (Echantillon ODP0)	**138**
Figure 23c	.	Rapport d'analyse du placébo sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène au temps0 (Echantillon OP0)	**139**
Figure 23d	.	Rapport d'analyse de la substance active sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène après 7 jours (Echantillon ODS7)	**140**
Figure 23e	.	Rapport d'analyse du produit fini sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène après 7 jours (Echantillon ODP7)	**141**
Figure 23f	.	Rapport d'analyse du placébo sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène après 7 jours (Echantillon ODP7)	**142**
Figure 24a	.	Rapport d'analyse de la substance active sous oxydation catalysée par le fer ferrique au temps0 (Echantillon FDS0)	**145**
Figure 24b	.	Rapport d'analyse du produit fini sous oxydation catalysée par le fer ferrique au temps0 (Echantillon FDP0)	**146**
Figure 24c	.	Rapport d'analyse du placébo sous oxydation catalysée par le fer ferrique au temps0 (Echantillon FP0)	**147**
Figure 24d	.	Rapport d'analyse de la substance active sous oxydation catalysée par le fer ferrique après 7 jours (Echantillon FDS7)	**148**
Figure 24e	.	Rapport d'analyse du produit fini sous oxydation catalysée par le fer ferrique après 7 jours (Echantillon FDP7)	**149**
Figure 24f	.	Rapport d'analyse du placébo sous oxydation catalysée par le fer ferrique après 7 jours (Echantillon FDS7)	**150**
Figure 25a	.	Rapport d'analyse de la substance active sous photo dégradation au temps0 (Echantillon PDS0)	**153**
Figure 25b	.	Rapport d'analyse du produit fini sous photo dégradation au temps0 (Echantillon PDP0)	**154**
Figure 25c	.	Rapport d'analyse du placébo sous photo dégradation au temps0 (Echantillon PP0)	**155**
Figure 25d	.	Rapport d'analyse de la substance active sous photo dégradation après 14 jours (Echantillon PDS14)	**156**
Figure 25e	.	Rapport d'analyse du produit fini sous photo dégradation après 14 jours (Echantillon PDP14)	**157**

Figure 25f	.	Rapport d'analyse du contrôle sous photo dégradation après 14 jours (Echantillon PD14)	**158**
Figure 25g	.	Rapport d'analyse du placébo sous photo dégradation après 14 jours (Echantillon PP14)	**159**
Figure 26	.	Effets de la contamination par les métaux	**160**
Figure 27	.	Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH7	**171**
Figure 27-bis	.	Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH7	**172**
Figure 28	.	Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH 6.	**173**
Figure 28-bis	.	Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH 6.	**174**
Figure 29	.	Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH 6,5.	**175**
Figure 29-bis	.	Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH6,5	**176**
Figure 30	.	Graphique Demi-Normal (R-MP-PDO, Plan factoriel complet)	**180**
Figure 31	.	Diagramme de Pareto (R-MP-PDO, Plan factoriel complet)	**180**
Figure 32	.	Graphique de l'effet du Tg sur la résolution MP-PDO (Plan factoriel complet)	**181**
Figure 33	.	Graphique de l'effet du $\Delta\phi$ sur la résolution MP-PDO (Plan factoriel complet)	**181**
Figure 34	.	Graphique de l'effet du pH sur la résolution MP-PDO (Plan factoriel complet)	**181**
Figure 35	.	Droite d'ajustement (R-MP-PDO, Plan factoriel complet)	**182**
Figure 36	.	Graphique normal des résidus(R-MP-PDO, Plan factoriel complet)	**183**
Figure 37	.	Graphique Demi-Normal(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)	**185**
Figure 38	.	Diagramme de Pareto(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)	**185**
Figure 39	.	Graphique de l'effet du pH sur la résolution PDO-OXO (Plan factoriel complet)	**186**
Figure 40	.	Droite d'ajustement(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)	**186**

Figure 41	.	Graphique normal des résidus(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)	**187**
Figure 42	.	Graphique Demi-Normal(R-OXO-PP, Plan factoriel complet)	**189**
Figure 43	.	Diagramme de Pareto(R-OXO-PP, Plan factoriel complet)	**189**
Figure 44	.	Graphique de l'effet du Tg sur la résolution OXO-PP (Plan factoriel complet)	**190**
Figure 45	.	Graphique de l'effet du $\Delta\phi$ sur la résolution OXO-PP (Plan factoriel complet)	**190**
Figure 46	.	Graphique de l'effet du pH sur la résolution OXO-PP (Plan factoriel complet)	**190**
Figure 47	.	Droite d'ajustement(R-OXO-PP, Plan factoriel complet)	**191**
Figure 48	.	Graphique normal des résidus (R-OXO-PP, Plan factoriel complet)	**192**
Figure 49	.	Graphique Demi-Normal (Tr-PP, Plan factoriel complet)	**194**
Figure 50	.	Diagramme de Pareto (Tr-PP, Plan factoriel complet)	**194**
Figure 51	.	Graphique de l'effet du Tg sur Tr-PP (Plan factoriel complet)	**195**
Figure 52	.	Graphique de l'effet du $\Delta\phi$ sur Tr-PP (Plan factoriel complet)	**195**
Figure 53	.	Graphique de l'effet du pH sur Tr-PP (Plan factoriel complet)	**195**
Figure 54	.	Graphique de l'effet De l'interaction AC sur Tr-PP (Plan factoriel complet)	**196**
Figure 55	.	Graphique de l'effet De l'interaction BC sur Tr-PP (Plan factoriel complet)	**196**
Figure 56	.	Droite d'ajustement (Tr-PP, Plan factoriel complet)	**197**
Figure 57	.	Graphique normal des résidus(Tr-PP, Plan factoriel complet)	**197**
Figure 58	.	Diagramme de Pareto (R-MP-PDO, Plan central composite)	**201**
Figure 59	.	Graphique de contour de la R-MP-PDO en fonction du pH et Tg ($\Delta\phi$(%) = 0,3)	**201**
Figure 60	.	Diagramme de surface de R-MP-PDO en fonction du pH et Tg ($\Delta\phi$(%) = 0,3)	**202**
Figure 61	.	Droite de Henry (R-MP-PDO, Plan central composite)	**203**
Figure 62	.	Diagramme de Pareto (R-PDO-OXO, Plan central composite)	**205**
Figure 63	.	Graphiques de contour de R-PDO-OXO en fonction du pH	**205**

Figure 64	**.**	Diagrammes de surface de la résolution R-MP-PDO en fonction du pH	**206**
Figure 65	**.**	Droite de Henry (R-PDO-OXO, Plan central composite)	**207**
Figure 66	**.**	Diagramme de Pareto (R-OXO-PP, Plan central composite)	**209**
Figure 67	**.**	Graphiques de contour de la résolution R-OXO-PP en fonction du pH	**209**
Figure 68	**.**	Diagrammes de surface de la résolution R-MP-PDO en fonction du pH	**210**
Figure 69	**.**	Droite de Henry (R-OXO-PP, Plan central composite)	**211**
Figure 70	**.**	Diagramme de Pareto (Tr-PP, Plan central composite)	**213**
Figure 71	**.**	Graphiques de contour illustrant la variation du Tr-PP en fonction Tg, $\Delta\phi$ et pH.	**213**
Figure 72	**.**	Diagrammes de surface illustrant la variation du Tr-PP en fonction Tg, $\Delta\phi$ et pH.	**214**
Figure 73	**.**	Droite de Henry (Tr-PP, Plan central composite)	**215**
Figure 74	**.**	Digramme d'optimisation	**218**
Figure 75	**.**	Rapport d'analyse du placébo chargé analysé selon conditions chromatographiques optimales (Tg(min) = 23, $\Delta\phi$(%) = 0,2, et pH=6,8)	**221**
Figure 76	**.**	Dédoublement des pics (peaks splitting)	**222**
Figure 77	**.**	Rapport d'analyses des gradients : 40% à 60% Méthanol (VAR1), 35% à 55% Méthanol (VAR2) et 30% à 50% Méthanol (VAR3)	**226**
Figure 77- bis.	**.**	Rapport d'analyses des gradients: 40% à 60% Méthanol (VAR1), 35% à 55% Méthanol (VAR2) et 30% à 50% Méthanol (VAR3)	**227**
Figure 78	**.**	Chromatogrammes comparatifs : diluant (en bleu), solution de calibration (en noir), solution de validation (en rouge)	**241**
Figure 79	**.**	Pureté des pics OXO, PDO, MP et PP	**242**
Figure 80	**.**	Rapport d'analyse de la série d'étalonnage au jour 1	**244**
Figure 81	**.**	Rapport d'analyse de la série d'étalonnage au jour 2	**245**
Figure 82	**.**	Rapport d'analyse de la série d'étalonnage au jour 3	**246**
Figure 83	**.**	Droite de Henry (séries d'étalonnage)	**248**

Figure 84 . Droite d'ajustement (séries d'étalonnage) **248**

Figure 85 . Rapport d'analyse de la série de validation au jour 1 **252**

Figure 86 . Rapport d'analyse de la série de validation au jour 2 **254**

Figure 87 . Rapport d'analyse de la série de validation au jour 3 **256**

Figure 88 . Droite de Henry (séries de validation) **258**

Figure 89 . Droite d'ajustement (séries de validation) **258**

Figure 90 . Profils d'exactitude en utilisant le modèle $Y = k_{0,2}X$ **265**

Figure 91 . Boîte à moustaches des IR en % et niveau de concentration **268**

Figure 92 . Graphique des intervalles des IR en % et niveau de concentration **269**

Figure 93 . Droite de Henry (réponse : IR en %) **270**

Figure 94 . Boîte à moustaches des IR en % et Jours **272**

Figure 95 . Chromatogrammes des échantillons de stabilité **284**

Figure 96 . Conformité du système des analyses de l'étude de stabilité **287**

Figure 97 . Rapport d'analyse des injections du solvant de dilution **289**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	.	Déclaration, identification et qualification des impuretés organiques dans les substances actives	**4**
Tableau 2	.	Limites pour les Produits de Dégradation dans les Produits finis	**8**
Tableau 3	.	Aperçu des lignes directrices réglementaires sur la dégradation forcée	**10**
Tableau 4	.	Conditions de stress typiques dans les études de stabilité préformulation	**12**
Tableau 5	.	Système de classification pour l'hydrolyse acide ou alcaline.	**16**
Tableau 6	.	Système de classification pour la dégradation par oxydation	**16**
Tableau 7	.	Conditions de stress typiques et les points finaux	**25**
Tableau 8	.	Protocole général pour les études de dégradation forcée (tests de stress) des substances actives et des produits pharmaceutiques	**26**
Tableau 9	.	Influence de la Différences de facteur de réponse Rf sur le bilan massique et solutions potentielles	**30**
Tableau 10	.	Influence de l'incompréhension de la chimie de dégradation sur le bilan massique et solutions potentielles	**30**
Tableau 11	.	Influence d'un recouvrement insuffisant sur le bilan massique et solutions potentielles	**31**
Tableau 12	.	Influence des problèmes chromatographiques (méthode d'impuretés) sur le bilan massique et solutions potentielles	**32**
Tableau 13	.	Influence des problèmes chromatographiques (méthode de dosage SA) sur le bilan massique et solutions potentielles	**33**
Tableau 14	.	Avantages et inconvénients de quelques détecteurs de HPLC	**35**
Tableau 15	.	Matrice d'expérience pour un plan factoriel à trois facteurs	**38**
Tableau 16	.	Comparaison des avantages et des inconvénients entre les deux plans de criblage	**42**
Tableau 17	.	Critères de validation selon ICH	**50**
Tableau 18	.	Exemples des intervalles rapportables pour des utilisations courantes des procédures analytiques	**55**
Tableau 19	.	Fréquence des essais des études de stabilité	**68**

Tableau 20	.	Cas général des conditions d'entreposage	**68**
Tableau 21	.	Conditions d'entreposage des produits médicamenteux devant être entreposés au réfrigérateur	**69**
Tableau 22	.	Conditions d'entreposage des produits médicamenteux devant être entreposés au congélateur	**69**
Tableau 23	.	Caractéristiques générales de l'Oxomémazine HCl	**82**
Tableau 24	.	Caractéristiques générales de l'Oxomémazine base	**84**
Tableau 25	.	Caractéristiques générales de la phénothiazine dioxyde (PDO)	
Tableau 26	.	Effet du pH sur la rétention de la substance active	**94**
Tableau 27	.	Effet du pourcentage du méthanol sur la rétention de la substance active	**96**
Tableau 28	.	Conditions chromatographiques de choix des concentrations	**101**
Tableau 29	.	Conditions chromatographiques finales du développement analytique	**104**
Tableau 30	.	Méthode chromatographique utilisée dans l'étude de dégradation forcée	**105**
Tableau 31	.	Facteurs retenus et domaine expérimental	**166**
Tableau 32	.	Matrice d'expérience du plan composite centré	**167**
Tableau 33	.	Conditions Chromatographiques utilisées dans l'optimisation	**168**
Tableau 34	.	Gradient d'élution de l'essai 5 (Tg=30, $\Delta\phi$= 0,4 et pH=7)	**170**
Tableau 35	.	Résultats du plan d'optimisation	**177**
Tableau 36	.	Résultats du plan factoriel complet	**178**
Tableau 37	.	Analyse de la variance (R-MP-PDO, Plan factoriel complet)	**179**
Tableau 38	.	Tableau des effets(R-MP-PDO, Plan factoriel complet)	**179**
Tableau 39	.	Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle (Plan factoriel complet)	**182**
Tableau 40	.	Analyse de la variance(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)	**184**
Tableau 41	.	Tableau des effets(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)	**184**
Tableau 42	.	Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle (R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)	**186**

Tableau 43	**.**	Analyse de la variance(R-OXO-PP, Plan factoriel complet)	**188**
Tableau 44	**.**	Tableau des effets(R-OXO-PP, Plan factoriel complet)	**188**
Tableau 45	**.**	Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle (R-OXO-PP, Plan factoriel complet)	**191**
Tableau 46	**.**	Analyse de la variance (Tr-PP, Plan factoriel complet)	**193**
Tableau 47	**.**	Tableau des effets (Tr-PP, Plan factoriel complet)	**193**
Tableau 48	**.**	Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle (Tr-PP, Plan factoriel complet)	**196**
Tableau 49	**.**	Analyse de la variance (R-MP-PDO, Plan Central Composite)	**200**
Tableau 50	**.**	Tableau des effets (R-MP-PDO, Plan Central Composite)	**200**
Tableau 51	**.**	Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle (R-MP-PDO, Plan central composite)	**202**
Tableau 52	**.**	Analyse de la variance (R-PDO-OXO, Plan Central Composite)	**204**
Tableau 53	**.**	Tableau des effets (R-PDO-OXO, Plan Central Composite)	**204**
Tableau 54	**.**	Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle (R-PDO-OXO, Plan central composite)	**206**
Tableau 55	**.**	Analyse de la variance (R-OXO-PP, Plan Central Composite)	**208**
Tableau 56	**.**	Tableau des effets (R-OXO-PP, Plan Central Composite)	**208**
Tableau 57	**.**	Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle (R-OXO-PP, Plan central composite)	**210**
Tableau 58	**.**	Analyse de la variance (Tr-PP, Plan Central Composite)	**212**
Tableau 59	**.**	Tableau des effets (Tr-PP, Plan Central Composite)	**212**
Tableau 60	**.**	Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle (Tr-PP, Plan central composite)	**214**
Tableau 61	**.**	Paramètres des réponses	**217**
Tableau 62	**.**	Facteurs optimaux	**217**
Tableau 63	**.**	Résultats de l'étude de désirabilité	**218**
Tableau 64	**.**	Prévisions des réponses avec les facteurs optimaux	**219**
Tableau 65	**.**	Résultats expérimentaux de la validation du modèle d'optimisation	**220**

Tableau 66	**.**	Comparaison entre les valeurs prédites par le modèle d'optimisation et les valeurs expérimentales	**220**
Tableau 67	**.**	Gradient variante 1 de 40% à 60% de méthanol	**225**
Tableau 68	**.**	Gradient variante 2 de 35% à 55% de méthanol	**225**
Tableau 69	**.**	Gradient variante 3 de 30% à 50% de méthanol	**225**
Tableau 70	**.**	Comparaison entre les gradients variante 1 et 2	**228**
Tableau 71	**.**	Méthode optimisée du dosage des impuretés	**229**
Tableau 72	**.**	Préparation de la série de calibration	**233**
Tableau 73	**.**	Préparation de la Série de validation	**234**
Tableau 74	**.**	Conditions chromatographiques utilisées dans la validation	**235**
Tableau 75	**.**	Résultats de la série d'étalonnage (jour 1)	**243**
Tableau 76	**.**	Résultats de la série d'étalonnage (jour 2)	**243**
Tableau 77	**.**	Résultats de la série d'étalonnage (jour 3)	**243**
Tableau 78	**.**	Résultats de la série de validation (Jour 1)	**251**
Tableau 79	**.**	Résultats de la série de validation (Jour 2)	**253**
Tableau 80	**.**	Résultats de la série de validation (Jour 3)	**255**
Tableau 81	**.**	Rapport S/N de la solution SS 0,1%	**262**
Tableau 82	**.**	Réponses alignées	**263**
Tableau 83	**.**	Prédictions inverses en utilisant le modèle $Y = k_{0,2} X$	**263**
Tableau 84	**.**	Critères de validations en utilisant le modèle $Y = k_{0,2}X$	**264**
Tableau 85	**.**	Profils d'exactitude en utilisant le modèle $Y = k_{0,2}X$	**265**
Tableau 86	**.**	Résultats de la justesse	**266**
Tableau 87	**.**	Résultats des IR	**270**
Tableau 88	**.**	Résultats de la fidélité	**271**
Tableau 89	**.**	Stabilité du ST 0,2%, jour 1	**274**
Tableau 90	**.**	Stabilité du ST 0,2%, jour 2	**275**
Tableau 91	**.**	Stabilité du ST 0,2%, jour 3	**275**

Tableau 92	**.**	Résultats de la validation	**278**
Tableau 93	**.**	Méthode validée du dosage des impuretés	**279**
Tableau 93- bis	**.**	Méthode validée du dosage des impuretés	**280**
Tableau 94	**.**	Durées de vie des échantillons de stabilité	**284**
Tableau 95	**.**	Données de rétention et aire des pics des échantillons de stabilité	**285**
Tableau 96	**.**	Répétabilité des injections ST 0,2% des analyses de l'étude de stabilité	**286**
Tableau 97	**.**	Dosage des impuretés dans les échantillons de stabilité	**288**
Tableau 98	**.**	Total des impuretés dans les échantillons de stabilité	**290**
Tableau 99	**.**	Spécification à libération pour chaque impureté non spécifiée	**292**
Tableau 100	**.**	Méthode finale de dosage des impuretés	**295**
Tableau 100-bis	**.**	Méthode finale de dosage des impuretés	**295**

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1.	Impuretés dans les substances actives et produits finis USP <1086>	**i**
Annexe 2.	Contrôle des impuretés organiques dans les substances actives et produits finis USP <476>	**vi**
Annexe 3.	Monographies de produits finis (PF) contenant des substances actives chimiquement définies : principes généraux	**ix**
Annexe 4.	Résumé des caractéristiques du produit TOPLEXIL, 0,33 mg/ml, sirop	**xii**
Annexe 5.	Monographie de l'Alimemazine hemitartrate Ph Eur 11.0	**xxi**
Annexe 6.	Monographie de la promazine chlorhydrate Ph Eur 11.0	**xxiii**
Annexe 7.	Techniques de séparation chromatographique Ph Eur 2.2.46	**xxv**

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ACRONYMES

AAPS	**:**	American Association of Pharmaceutical Scientists
ADP	**:**	Produit fini sous hydrolyse acide
ADS	**:**	Substance active sous hydrolyse acide
AMBD	**:**	Déficit Absolu de Bilan Massique
ANCOVA	**:**	Analyse de covariance
ANOVA	**:**	Analyse de variance
ANSM	**:**	Agence nationale française de sécurité du médicament
AP	**:**	Placébo sous hydrolyse acide
BDP	**:**	Produit fini sous hydrolyse basique
BDS	**:**	Substance active sous hydrolyse basique
BP	**:**	Placébo sous hydrolyse basique
DAD	**:**	Détecteur à barette de diodes
DP	**:**	Produit fini, produit pharmaceutique ou médicament
EDTA	**:**	Ethylènediaminetétraacétique
FDP	**:**	Produit fini sous oxydation catalysée par le fer ferrique
FDS	**:**	Substance active sous oxydation catalysée par le fer ferrique
FP	**:**	Placébo sous oxydation catalysée par le fer ferrique
GC	**:**	Chromatographie en phase gazeuse
h	**:**	Heure
HILIC	**:**	Chromatographie liquide à intéraction hydrophile
HPLC	**:**	Chromatographie liquide haute performance
HPTLC	**:**	Chromatographie sur couche mince à haute performance
HR	**:**	Humidité relative
IC	**:**	Intervalle de confiance
ICH	**:**	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

IMP	**:**	Impureté
IP	**:**	Intervalle de prévision
JP	**:**	Pharmacopée japonaise
LC-MS	**:**	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
Log P	**:**	Coefficient de partition logarithmique eau-octanol
min	**:**	Minute
MP	**:**	Méthyle parabène
Mpa	**:**	Méga pascal
MPUP	**:**	Matière Première à Usage Pharmaceutique
MS	**:**	Spectrométrie de masse
ODP	**:**	Produit fini sous oxydation par peroxyde d'hydrogène
ODS	**:**	Substance active sous oxydation par peroxyde d'hydrogène
OOS	**:**	Résultat hors spécification
OP	**:**	Placébo sous oxydation par peroxyde d'hydrogène
OXO	**:**	Oxomémazine
PDO	**:**	Phénothiazine dioxyde
Ph Eur	**:**	Pharmacopée européenne
PhD	**:**	Produit fini contrôle noir
PhDP	**:**	Produit fini sous photo dégradation
PhDS	**:**	Substance active sous photo dégradation
PhP	**:**	Placébo sous photo dégradation
PP	**:**	Propyle parabène
QbD	**:**	Qualité par conception
R	**:**	Coefficient de corrélation
R^2	**:**	Coefficient de détermination
Rf	**:**	Facteur de réponse
RMBD	**:**	Déficit Relatif de Bilan Massique

R-MP-PDO	**:**	Résolution entre les pics du méthyle parabène et de la phenothiazine dioxyde
R-OXO-PP	**:**	Résolution entre les pics de l'oxomémazine et le propyle parabène
R-PDO-OXO	**:**	Résolution entre les pics de la phenothiazine dioxyde et de l'oxomémazine
RPLC	**:**	Chromatographie liquide en phase inverse
RSD	**:**	Coefficient de variation
RT	**:**	Temps de rétention
SA	**:**	Substance active
SC	**:**	Série de calibration
SFC	**:**	Chromatographie en phase supercritique
SFSTP	**:**	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SIM	**:**	Méthode indicatrice de stabilité
SIM	**:**	Méthode indicative de stabilité
SS	**:**	Echantillon chargé
ST	**:**	Standard
SV	**:**	Série de validation
T	**:**	Température
TDP	**:**	Produit fini sous stress thermique
TDS	**:**	Substance active sous stress thermique
TEA	**:**	Triéthylamine
Tg	**:**	Temps de gradient
TP	**:**	Placébo sous stress thermique
Tr	**:**	Temps de rétention
Tr PP	**:**	Temps de rétention du propyle parabène
USP	**:**	Pharmacopée américaine
UV	**:**	Ultra-violet
$\Delta\phi$	**:**	La variation de la fraction volumique du Méthanol (%B final - %B initial)

DEFINITIONS

Les définitions suivantes sont issues du guideline ICH Q2 (R2) [1]:

- **Procédure analytique** : La procédure analytique fait référence à la manière de réaliser l'analyse. La procédure analytique doit décrire de manière suffisante les étapes nécessaires pour effectuer chaque test analytique. (ICH Q2)
- **Intervalle :** L'intervalle d'une procédure analytique est l'intervalle entre les résultats les plus bas et les plus élevés dans lequel la procédure analytique présente un niveau approprié de précision, d'exactitude et de réponse. (ICH Q2)
    - **Intervalle rapporté :** L'intervalle rapporté d'une procédure analytique comprend toutes les valeurs du résultat rapportable, des plus bas aux plus élevés, pour lesquels il existe un niveau approprié de précision et d'exactitude. Typiquement, l'intervalle rapporté est donné dans la même unité que le critère d'acceptation de spécification. (ICH Q2)
    - **Intervalle de travail :** Un intervalle de travail correspond au plus bas et au plus haut niveau de l'attribut de qualité à mesurer (par exemple, le contenu ou la pureté) tel que présenté à l'instrument analytique et pour lequel la procédure analytique fournit des résultats fiables. (ICH Q2)
- **Robustesse :** La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à respecter les critères de performance attendus lors d'une utilisation normale. La robustesse est testée par des variations délibérées des paramètres de la procédure analytique. (ICH Q14)
- **Test de conformité du système (SST) :** Les tests de conformité du système sont développés et utilisés pour vérifier que le système de mesure et les opérations analytiques associées à la procédure analytique sont adaptés à l'objectif visé et augmentent la détection des performances inacceptables. (ICH Q14)

Les définitions suivantes sont issues du guideline ICH Q3B(R2) [2] :

- **Produit de dégradation :** Une impureté résultant d'un changement chimique dans la substance médicamenteuse survenant lors de la fabrication et/ou du stockage du nouveau produit pharmaceutique sous l'effet, par exemple, de la lumière, de la température, du pH, de l'eau, ou par réaction avec un excipient et/ou le système de conditionnement primaire.

- **Produit de dégradation spécifié :** Un produit de dégradation qui est individuellement répertorié et limité par un critère d'acceptation spécifique dans la spécification du nouveau produit médicamenteux. Un produit de dégradation spécifié peut être identifié ou non identifié.
- **Produit de dégradation non identifié :** Un produit de dégradation pour lequel une caractérisation structurale n'a pas été réalisée et qui est défini uniquement par des propriétés analytiques qualitatives (par exemple, le temps de rétention chromatographique).
- **Produit de dégradation non spécifié :** Un produit de dégradation qui est limité par un critère d'acceptation général, mais qui n'est pas répertorié individuellement avec son propre critère d'acceptation spécifique dans la spécification du nouveau produit médicamenteux.

Les définitions suivantes sont issues du guideline ICH Q1A(R2) [3] :

- **Études de stabilité formelle :** Études à long terme et accélérées (et intermédiaires) menées sur des lots primaires et/ou de référence selon un protocole de stabilité prescrit afin d'établir ou de confirmer la période de retest d'une substance active ou la durée de conservation d'un produit pharmaceutique.

- **Spécification – Libération :** La combinaison de tests physiques, chimiques, biologiques et microbiologiques ainsi que des critères d'acceptation qui déterminent l'adéquation d'un produit fini au moment de sa libération.

- **Spécification - Durée de conservation :** La combinaison de tests physiques, chimiques, biologiques et microbiologiques ainsi que des critères d'acceptation qui déterminent l'adéquation d'une substance active pendant toute sa période de retest, ou que doit respecter un produit fini tout au long de sa durée de conservation.

INTRODUCTION GENERALE

L'information relative à la stabilité intrinsèque des substances et produits pharmaceutiques constitue une composante essentielle d'une approche systématique d'évaluation de la stabilité. Cette démarche se décline en plusieurs étapes cruciales :

- Étude de la dégradation forcée (Stress testing ou essais sous contraintes)
- Développement, optimisation et validation de méthodes analytiques
- Études de stabilité formelle et post-approbation

Les phases précoces du développement pharmaceutique impliquent des tests de dégradation forcée visant à évaluer la stabilité intrinsèque de la substance active. Ces essais soumettent la substance et/ou le produit médicamenteux à des conditions plus rigoureuses que celles utilisées lors des études de stabilité accélérée, explorant des contraintes telles que la température, l'hydrolyse, l'oxydation, et la photodégradation. De nature prédictive, ces essais anticipent les changements potentiels susceptibles de survenir dans des phases ultérieures, notamment les études de stabilité formelle [3].

Les méthodes analytiques séparatives, telles que les méthodes chromatographiques, sont généralement utilisées pour évaluer qualitativement et quantitativement les impuretés générées lors des tests de stress. L'optimisation de ces méthodes repose sur une stratégie de planification d'expériences avec une approche statistique, les plans d'expérience, visant à obtenir des procédures les plus fiables [4], telles qu'une meilleure séparation des impuretés en un minimum de temps d'analyse.

Avant de rendre des résultats, un ensemble d'opérations est nécessaire pour démontrer que la méthode analytique est suffisamment exacte et fiable, processus appelé validation analytique [1]. Une méthode validée, capable de quantifier la substance active sans être impactée par la présence d'autres substances (par exemple, impuretés de synthèse, produits de dégradation, excipients,..), est qualifiée de méthode indicative de stabilité.

Conformément aux directives de la FDA, une Méthode Indicative de Stabilité (SIM) est une procédure analytique quantitative validée capable de détecter les changements dans un ou plusieurs attributs de qualité de la substance active et du produit pharmaceutique pendant toute sa durée de vie. La FDA recommande que toutes les procédures d'essai de stabilité soient indicatives de stabilité [5].

Les études de stabilité formelle et post-approbation visent à fournir des données probantes sur la variation de la qualité d'un nouveau produit pharmaceutique au fil du temps dans des conditions réelles de conservation. Elles utilisent des méthodes indicatives de stabilité pour évaluer les attributs de qualité critiques du produit médicamenteux susceptibles de changer pendant sa durée de vie, influant ainsi sur la qualité, l'innocuité, et/ou l'efficacité. Les profils d'impuretés issus de ces études sont définitifs, soulignant leur importance [3].

Dans l'ensemble, pour évaluer leur pertinence, les résultats de la dégradation forcée devraient être systématiquement comparés à ceux issus d'études de stabilité formelle et post approbation dès qu'ils sont accessibles [6].

L'intérêt de cette étude se justifie à plusieurs égards, notamment pour :

- Approfondir les connaissances scientifiques sur les voies de dégradation du principe actif.
- Assurer la sécurité des produits pharmaceutiques en évaluant les effets secondaires liés aux impuretés.
- Garantir la qualité des médicaments pendant leur durée de conservation.

Les objectifs principaux de cette étude consistent à :

- Optimiser les conditions de stress lors de l'étude de dégradation forcée.
- Développer, optimiser et valider une méthode indicative de stabilité.

Les objectifs secondaires incluent :

- L'identification des impuretés potentielles.
- L'évaluation statistique des données de l'étude de stabilité par des techniques chimiométriques.
- La comparaison des profils d'impuretés entre l'étude de dégradation forcée et celle de stabilité formelle et/ou post-approbation.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE 1.
DEGRADATION DES MEDICAMENTS

I. Impuretés

La gestion des impuretés dans les médicaments est cruciale pour garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité des produits pharmaceutiques. Les autorités réglementaires, telles que l'ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), ont établi des lignes directrices pour définir les limites acceptables des impuretés et les méthodes d'évaluation de leur présence. L'identification, le contrôle et la documentation appropriés des impuretés sont essentiels pour assurer la conformité réglementaire et la protection des patients.

1. Impuretés dans les substances actives

L'une des fonctions essentielles des autorités de santé est d'assurer une pureté adéquate des substances actives, dans l'intérêt de la santé publique.

Une section spécialement dédiée, dans les monographies, a pour objectif principal de limiter les impuretés dans les substances à usage pharmaceutique.

Selon la monographie <1086> de l'USP 46 (Annexe 1), les impuretés peuvent être classées dans les catégories suivantes :

- Impuretés organiques.
- Impuretés inorganiques.
- Solvants résiduels.

1.1. Impuretés organiques

Les impuretés organiques peuvent se manifester pendant la fabrication et/ou la période de conservation de la substance active. Elles englobent :

- Les produits de base, les sous-produits et les intermédiaires.
- Les produits de dégradation.
- Les réactifs, les ligands et les catalyseurs.

Les techniques analytiques utilisées pour détecter ces impuretés sont des techniques séparatives, comprenant notamment :

- La chromatographie sur couche mince.
- La chromatographie liquide.

- La chromatographie en phase gazeuse.
- L'électrophorèse capillaire [7].

Les impuretés organiques sont déclarées, identifiées chaque fois que possible, et qualifiées conformément aux indications du Tableau 1.

Tableau 1. Déclaration, identification et qualification des impuretés organiques dans les substances actives [8]

Utilisation	Dose maximale journalière	Limite d'exclusion	Limite d'identification	Limite de qualification
Usage humain ou usage humain et vétérinaire	≤ 2 g/jour	< 0,05 pour cent	Soit > 0,10 pour cent soit > 1,0 mg par jour, en prenant le plus petit des deux	Soit > 0,15 pour cent soit > 1,0 mg par jour, en prenant le plus petit des deux
Usage humain ou usage humain et vétérinaire	> 2 g/jour	< 0,03 pour cent	> 0,05 pour cent	> 0,05 pour cent
Usage vétérinaire uniquement	Non applicable	< 0,10 pour cent	> 0,20 pour cent	> 0,50 pour cent

Des limites spécifiques peuvent s'appliquer dans le cas d'impuretés connues pour être très actives ou pour avoir des effets toxiques ou pharmacologiques inattendus.

1.2. Impuretés inorganiques

Les impuretés inorganiques dans une substance active proviennent généralement du procédé de synthèse. Ces impuretés sont généralement connues et identifiées et comprennent plusieurs catégories, telles que :

- Les réactifs, les ligands et les catalyseurs utilisés dans le processus de synthèse.
- Les métaux lourds et autres métaux résiduels issus des matières premières ou des équipements.
- Les sels inorganiques formés pendant les réactions chimiques.

Pour évaluer la présence d'impuretés inorganiques, des tests spécifiques sont réalisés, notamment pour les métaux lourds, qui sont considérés comme des impuretés élémentaires.

Ces tests suivent les directives énoncées dans la ligne directrice ICH « GUIDELINE FOR ELEMENTAL IMPURITIES Q3D » [9]. Plusieurs techniques analytiques sont préconisées pour l'identification et la quantification de chaque métal lourd, dont notamment :

- La spectrométrie d'émission atomique.
- La spectrométrie d'absorption atomique.
- La spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif [7].

Ces méthodes permettent de s'assurer que les niveaux d'impuretés inorganiques dans le produit pharmaceutique restent conformes aux normes de sécurité établies.

1.3. Solvants résiduels

Les solvants, qu'ils soient organiques ou inorganiques, jouent un rôle essentiel dans la synthèse des substances médicamenteuses. Lorsqu'ils sont utilisés au cours du processus de production pharmaceutique, ils doivent répondre à des normes de qualité appropriées. De plus, leur toxicité et les taux résiduels sont des paramètres pris en considération afin de garantir la sécurité du produit final.

Dans le cas où des solvants organiques ou inorganiques sont employés, la toxicité de ces solvants, ainsi que leurs concentrations résiduelles, est évaluée minutieusement pour s'assurer qu'ils ne compromettent pas la qualité ni la sécurité du médicament produit.

Pour évaluer et quantifier les solvants résiduels dans les produits pharmaceutiques, des techniques analytiques spécifiques sont mises en œuvre conformément à la directive de l'ICH « IMPURITIES: GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENTS Q3C(R7) » [10]. La chromatographie en phase gazeuse est une technique couramment utilisée pour l'identification et la quantification précise des solvants résiduels, assurant ainsi le respect des normes de sécurité établies.

1.4. Polymorphisme

Certaines matières premières à usage pharmaceutique se présentent sous différentes formes cristallines, chacune avec des propriétés physiques distinctes. En général, les monographies spécifiques ne détaillent pas des formes cristallines ou amorphes spécifiques, mais plutôt toutes les formes d'une substance destinée à un usage pharmaceutique doivent satisfaire aux exigences énoncées dans la monographie de cette substance.

Toutefois, dans les cas où la performance, la biodisponibilité ou la stabilité d'un produit pharmaceutique peuvent être influencées par la forme cristalline, il devient impératif de spécifier la forme appropriée et les autres formes cristallines seront considérées comme des impuretés.

Pour évaluer et caractériser les différentes formes cristallines, plusieurs techniques analytiques sont employées, parmi lesquelles :

- Spectre infrarouge à l'état solide.
- Point de fusion.
- Diffraction de rayons X sur poudre.
- Méthodes thermiques [7].

Ces techniques permettent d'identifier et de déterminer les propriétés physiques des différentes formes cristallines, assurant ainsi la conformité avec les exigences nécessaires à une qualité pharmaceutique optimale. La sélection de la forme cristalline adéquate devient alors cruciale lorsque des considérations spécifiques de performance, biodisponibilité ou stabilité l'exigent.

1.5. Pureté énantiomérique

La pureté énantiomérique des Matières Premières à Usage Pharmaceutique (MPUP) chirales constitue une considération cruciale dans le domaine pharmaceutique. Les MPUP présentant une activité optique peuvent nécessiter des épreuves d'identification ou la réalisation d'un test de chiralité pour garantir leur pureté énantiomérique [11].

Pour évaluer la pureté énantiomérique, diverses techniques analytiques sophistiquées sont utilisées, notamment :

- Le pouvoir rotatoire spécifique ou l'angle de rotation, qui permet de mesurer l'effet de la molécule sur la lumière polarisée.
- La chromatographie chirale, qui sépare les énantiomères en fonction de leurs interactions spécifiques avec un chiraliseur [7].

Ces techniques avancées garantissent une évaluation précise de la pureté énantiomérique des MPUP chirales, assurant ainsi la conformité avec les normes de qualité pharmaceutique les plus rigoureuses. La prise en compte de la chiralité revêt une importance capitale pour garantir l'efficacité et la sécurité des produits pharmaceutiques destinés à un usage humain.

2. Impuretés dans les produits finis

2.1. Impuretés inorganiques et solvants résiduels

Ces impuretés, dans un produit fini, proviennent uniquement des ces constituants initiaux. Généralement, il n'est pas nécessaire de tester les caractéristiques de qualité liées uniquement à la substance médicamenteuse d'un produit pharmaceutique.

2.2. Impuretés organiques

Conformément à la directive ICH Q3B(R2), la formation impuretés organiques peut découler de :

1. La dégradation de la substance active.
2. Les réactions avec des excipients.
3. Les réactions avec le récipient primaire.

Ces impuretés peuvent apparaître :

- Pendant le processus de fabrication du produit pharmaceutique
- Ou pendant sa période de conservation.

Les impuretés résultant du processus de synthèse de la substance active sont généralement contrôlées lors des tests de cette substance et ne figurent donc pas dans les spécifications du produit pharmaceutique.

Cependant, toutes les impuretés doivent faire l'objet d'une évaluation. En fonction de cette évaluation, des limites de teneur en produits de dégradation sont établies (Tableau 2), et elles sont surveillées dans la préparation pharmaceutique.

Tout produit de dégradation dépassant la limite d'exclusion doit être signalé avec les procédures analytiques spécifiées. Les produits de dégradation détectés à des niveaux supérieurs aux seuils d'identification doivent être identifiés, sinon un résumé des efforts infructueux doit être inclus. En revanche, les produits de dégradation en dessous des seuils d'identification ne nécessitent généralement pas d'identification, à moins d'être suspectés d'être potentiellement toxiques.

Les produits de dégradation avec des critères d'acceptation spécifiques sont considérés comme des impuretés spécifiées, qu'elles soient identifiées ou non.

Selon la monographie <476> de l'USP 46 (Annexe 2), la spécification du produit médicamenteux devrait inclure :

- Chaque impureté identifiée spécifiée.
- Chaque impureté non identifiée spécifiée.
- Chaque impureté non spécifié avec un critère d'acceptation de pas plus de (≤) la limite d'identification.
- Le total des impuretés.

Lorsqu'il n'y a pas de préoccupation en matière de sécurité, les critères d'acceptation des produits de dégradation devraient être basés sur les données générées à partir des lots du produit fini fabriqués par le processus commercial proposé, en tenant compte aux variations normales de fabrication et d'analyse ainsi qu'aux caractéristiques de stabilité de ce dernier .

Tableau 2. Limites pour les Produits de Dégradation dans les Produits finis [2]

Limite d'exclusion	
Dose Quotidienne Maximale[1]	Limite (seuil) [2,3]
≤ 1 g	0,10%
> 1 g	0,05%
Limite d'identification	
Dose Quotidienne Maximale[1]	Limite (seuil) [2,3]
< 1 mg	1.0% ou 5 µg TDI [4], selon le plus bas
1 mg - 10 mg	0.5% ou 20 µg TDI, selon le plus bas
> 10 mg - 2 g	0.2% ou 2 mg TDI, selon le plus bas
> 2g	0.10%
Limite de qualification	
Dose Quotidienne Maximale[1]	Limite (seuil) [2,3]
< 10 mg	1.0% ou 50 µg TDI, selon le plus bas
10 mg - 100 mg	0.5% ou 200 µg TDI,selon le plus bas
> 100 mg - 2 g	0.2% ou 3 mg TDI, selon le plus bas
> 2g	0.15%

1 La quantité de substance active administrée par jour
2 Les seuils pour les produits de dégradation sont exprimés soit en pourcentage de la substance active, soit en apport quotidien total (TDI) du produit de dégradation. Des seuils plus bas peuvent être appropriés si le produit de dégradation est exceptionnellement toxique.
3 Des seuils plus élevés doivent être justifiés scientifiquement.
4 Total daily intake (apport quotidien total)

II. Dégradation forcée

La dégradation forcée ou le stress testing, défini comme des essais de stabilité dépassant les conditions des tests de stabilité accélérés, est une composante essentielle des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché soumis aux autorités réglementaires (ICH Q1A[R2]) [12].

Les études de dégradation présentent plusieurs caractéristiques distinctives :

- Elles sont réalisées en solution et/ou à l'état solide.
- Elles impliquent des conditions plus sévères que les tests accélérés.
- Elles sont généralement réalisées sur un seul lot.
- Elles incluent des conditions qui analysent les mécanismes de dégradation thermolytique, hydrolytique, oxydative et photolytique dans la substance médicamenteuse et le produit médicamenteux (selon le cas).
- Elles ne font pas partie de l'étude de stabilité formelle [13].

Les conditions expérimentales appropriées pour ces études ne sont pas correctement spécifiées [14]. Les médicaments, aux susceptibilités variables à la décomposition, présentent des mécanismes de réaction distincts et une grande variabilité dans le taux de dégradation. Afin d'éviter une dégradation non pertinente, les conditions de stress devraient être réalistes, conduisant à une dégradation délibérée qui génère des échantillons représentatifs pour évaluer la stabilité du principe actif et du produit fini. Cela démontre également le pouvoir indicatif de stabilité des procédures analytiques appliquées [12].
Il devient difficile de décider des conditions de stress à utiliser pour un nouveau médicament au moment de l'initiation des études de dégradation forcée. Parmi les dilemmes auxquels sont confrontés les praticiens sont :

- À quelles extrémités de conditions de stress faut-il aller si une condition précédemment testée ne donne pas une dégradation suffisante ?
- Y a-t-il des limites où il faut s'arrêter et ne pas poursuivre d'autres études ?
- Quels types de réactifs ou agents doivent être utilisés pour créer une condition de stress particulière ? [15]

Ces dilemmes soulignent la complexité de décider des conditions de stress appropriées, surtout lorsqu'une dégradation insuffisante survient dans des conditions précédemment testées. Ainsi, le stress testing, bien que prédictif, requiert une approche réfléchie pour déterminer les conditions de dégradation pertinentes pour un médicament particulier.

1. Lignes directrices réglementaires

Un aperçu des guidelines sur la dégradation forcée est résumé dans le tableau 3.

Tableau 3. Aperçu des lignes directrices réglementaires sur la dégradation forcée

Standard	Titre et référence	Date
ICH Q1A(R2) [3]	Stability testing of New drug substances and products	Février 2003
ICH Q1B [16]	Stability testing: photostability testing of new drug substances and products	Novembre 1996
ICH Q2(R2) [1]	Validation of analytical procedures	Adopté le 1 Novembre 2023
ICH Q3A(R2) [8]	Impurities in new drug substances	Octobre 2006
ICH Q3B(R2) [2]	Impurities in new drug products	Juin 2006
WHO Technical Report Series, No. 1010 [17]	Annex 10 : stability testing of active pharmaceutical ingredients and nfinished pharmaceutical products	2018
WHO Technical Report Series, No. 929 [18]	Annex 5 : guidelines for registration of fixed-dose combination medicinal products Appendix 3 : pharmaceutical development (or preformulation) studies	2005

Les lignes directrices de l'ICH Q1A(R2) et de l'ICH Q1B établissent des normes pour les études de stabilité et de photostabilité des substances actives et des produits pharmaceutiques. Ces études, basées sur des tests de stress, visent à identifier les produits de dégradation potentiels, à établir les voies de dégradation et à valider la capacité indicative de stabilité des procédures analytiques.

L'ICH Q1A(R2) souligne l'importance du test de stress de la substance active pour identifier les produits de dégradation potentiels, établir les voies de dégradation et valider la capacité indicative de stabilité des procédures analytiques. Les conditions de stress peuvent inclure la température, l'hydrolyse, l'oxydation et la photolyse. Les résultats de ces études fournissent des informations cruciales pour les autorités réglementaires.

L'ICH Q1B se concentre sur les tests de photostabilité, comprenant des tests de dégradation forcée et des tests de confirmation. Ces tests visent à évaluer la photosensibilité des substances et des produits médicamenteux, avec des conditions d'exposition variables en fonction de la photosensibilité et de l'intensité des sources lumineuses.

L'ICH Q2(R2) traite de la validation des procédures analytiques, soulignant l'importance à valider la capacité indicative de stabilité. Les procédures doivent être capables de détecter les changements dans les attributs de qualité pertinents lors du stockage. La spécificité d'un test indicateur de stabilité est démontrée en incluant des échantillons contenant des produits de dégradation pertinents, issus de diverses conditions de stress.

Les lignes directrices de l'ICH Q3A(R2) et de l'ICH Q3B(R2) abordent la détection d'impuretés dans les substances et les produits pharmaceutiques. Les études de laboratoire doivent résumer les résultats des tests de stress utilisés pour identifier les impuretés potentielles. L'analyse des procédures doit être validée pour détecter et quantifier les produits de dégradation.

En résumé, ces lignes directrices détaillent des approches systématiques pour évaluer la stabilité des substances et des produits pharmaceutiques, en mettant l'accent sur les tests de stress et la validation des procédures analytiques. Ces normes fournissent un cadre complet pour garantir la qualité et la stabilité des produits pharmaceutiques tout au long de leur durée de vie.

La directive de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) sur " Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products " est conforme à la directive ICH Q1A(R2) et comprend des exigences similaires, telles que mentionnées dans la directive ICH Q1A(R2) pour les nouveaux médicaments. Cependant, pour les principes actifs bien établis, l'OMS fournit les informations importantes suivantes : "Pour un principe actif, les approches suivantes peuvent être utilisées : lorsque disponibles, il est acceptable de fournir les données pertinentes publiées dans la littérature scientifique pour étayer les produits de

dégradation identifiés et les voies de dégradation ; et en l'absence de données, des tests de stress doivent être effectués."

La directive de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour l'enregistrement des "Produits pharmaceutiques à dose fixe en association" comprend un tableau répertoriant les conditions de stress typiques pour les études de stabilité préformulation (Tableau 4).

Tableau 4. Conditions de stress typiques dans les études de stabilité préformulation [18]

Facteur de stress	Conditions	Concentration de l'API[a]	Temps
Chaleur	60°C	1:1 avec diluant[b]	1–10 jours
Humidité	75% d'humidité relative	état solide	1–10 jours
Acide	Acide chlorhydrique 0,1 N	2:1 dans HCl 0,1 N	1–10 jours
Base	Hydroxyde de sodium 0,1 N	2:1 dans NaOH 0,1 N	1–10 jours
Oxydation	Peroxyde d'hydrogène à 3%	1:1 dans H_2O_2 3%	1–3 heures
Photolyse	Halogénure métallique, mercure, xénon ou lampe fluorescente à UV-B	1:1 avec diluant	1–10 jours
Ions métalliques	Fe^{2+} ou Cu^{2+} à 0,05 M, (facultatif)	1:1 avec solution d'ions métalliques	1–10 jours

a. Lors de la vérification de la dégradabilité des APIs en combinaison, les APIs doivent être dans le même ratio que dans le Produit pharmaceutique à dose fixe en association.

b. Dans chaque cas, le diluant est soit un excipient ou tous les excipients dans la formulation dans les mêmes proportions que dans la formulation. D'autres ratios de diluant peuvent également être appropriés, par exemple le ratio approximatif dans lequel le médicament et les excipients seront utilisés dans une formulation.

2. Objectifs de la dégradation forcée

Les objectifs des stress testing sont :

a. Élaborer des voies de dégradation des substances actives et des produits pharmaceutiques.
b. Reconnaître les propriétés chimiques des molécules médicamenteuses.
c. Élucider la structure des produits de dégradation.
d. Résoudre les problèmes liés à la stabilité.
e. Établir la stabilité intrinsèque d'une substance active dans la formulation.

f. Mettre en lumière les mécanismes de dégradation de la substance active et du produit pharmaceutique.

g. Distinguer les produits de dégradation liés à la substance active de ceux générés par les excipients utilisés dans la formulation.

h. Etablir la nature indicatrice de stabilité d'une méthode développée.

i. Produire des formulations plus stables. Cela aide également à allonger la date de péremption d'une formulation particulière.

j. Générer un profil de dégradation similaire à ce qui serait observé dans une étude formelle de stabilité dans des conditions ICH [14].

3. Temps de réalisation des études de dégradation forcée

Pour réaliser des études de dégradation forcée durant le développement d'une nouvelle substance et d'un produit médicamenteux, le moment de leur réalisation est très impératif. Selon les directives de la FDA [19], la phase III du processus de soumission réglementaire est le moment prépondérant pour ces études.

La dégradation forcée en phase préclinique ou en phase I d'un essai clinique est encouragée, ce qui offre suffisamment de temps pour identifier les produits de dégradation, élucider la structure et optimiser les conditions de stress. Des améliorations dans le processus de fabrication et la sélection appropriée de procédures analytiques indicatrices de stabilité sont obtenues grâce aux premières études de dégradation forcée

La stratégie pour mener des études de dégradation forcée implique l'utilisation des informations obtenues lors des tests de stress de la substance active afin de guider la formulation du médicament.

Pour évaluer les interactions indésirables avec les excipients, des études de compatibilité SA-excipient peuvent être réalisées, englobant des investigations sur des excipients individuels, des mélanges d'excipients et des formulations d'essai.

Une fois qu'une formulation appropriée est développée, des études de stress peuvent être menées sur cette formulation spécifique, et les produits de dégradation résultants peuvent être comparés à ceux formés lors des tests de stress de la substance active seule.

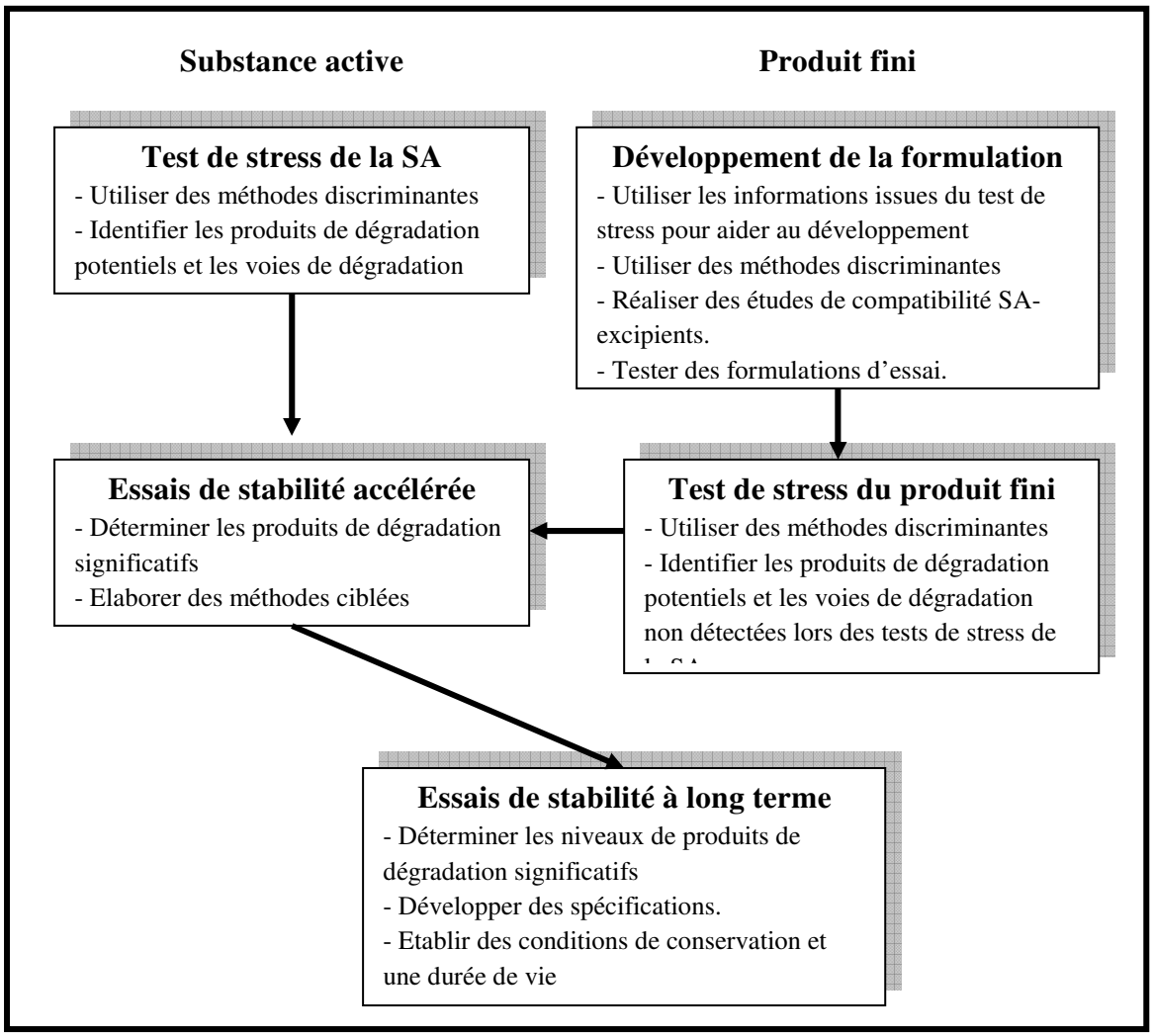


Figure 1. Stratégie globale pour la prédiction, l'identification et le contrôle des problèmes liés à la stabilité [6]

L'évaluation de la dégradation forcée implique une comparaison entre les impuretés générées pendant les études de dégradation forcée et les produits de dégradation réels obtenus à partir des études de stabilité accélérée et à long terme. En d'autres termes, cette évaluation permet de vérifier la pertinence des conditions de stress utilisées pour anticiper les produits de dégradation potentiels et garantir que les résultats obtenus reflètent fidèlement le comportement réel du médicament pendant sa durée de vie (Figure 1).

4. Stratégies de réalisation des études de dégradation forcée

La stratégique des études de dégradation forcée implique diverses approches au sein de l'industrie pharmaceutique. Certains laboratoires ont adopté des procédures opératoires standard (SOP) détaillées, tandis que d'autres préfèrent des approches au cas par cas en fonction de la chimie du composé ou de la forme galénique à étudier [12].

Il a été noté que la douceur d'une condition de stress pour un composé peut conduire à une dégradation significative pour un autre, soulignant la complexité de la génération des produits de dégradation pertinents avec un ensemble fixe de conditions [12]. La diversité structurelle des molécules médicamenteuses rend également difficile l'établissement d'un ensemble générique de conditions pour les études de dégradation forcée [14].

5. Evaluation du risque

L'évaluation des risques lors de la réalisation d'études de dégradation forcée présente des défis, notamment la définition d'objectifs appropriés.

Chaque substance active et son produit fini peuvent subir des taux et des voies de dégradation différents en fonction des conditions de stress. Les propriétés physico-chimiques associées à la structure moléculaire déterminent si certains médicaments seront stables ou réactifs aux conditions de dégradation forcée.

Une sur-exposition, résultant de conditions de stress et de temps inappropriés, accroît le risque de générer des produits de dégradation non pertinents, différents de ceux observés pendant la conservation, la distribution ou l'utilisation du médicament. Cela pourrait conduire à une mécompréhension des voies de dégradation pertinentes, aboutissant à un " over-engineering " des méthodes correspondantes indicatives de la stabilité.

À l'inverse, une sous-exposition à un stress insuffisant pourrait sous-estimer la gamme potentielle de produits de dégradation pouvant se former, détectant ainsi des produits de dégradation dans des études formelles de stabilité qui n'ont pas été observés lors des tests de stress.

6. Evolution historique des essais de la dégradation forcée

Historiquement, une grande diversité de conditions de stress a été utilisée pour déterminer les produits potentiels de dégradation des médicaments.

En 2000, Singh et Bakshi ont documenté cette diversité dans un document d'orientation et ont proposé des conditions spécifiques ainsi que des arbres de décision pour réaliser des études de dégradation forcée hydrolytique, oxydative et photolytique. Pour chacune de ces conditions, il était recommandé d'augmenter progressivement la sévérité du stress appliquée afin d'atteindre un point final pour un niveau de dégradation recommandé entre 20 et 80 %. Sur la base de ces conditions et le point final prédéfini, un système de classification de stabilité basé sur les conditions de stress a été proposé (Tableau 5 et 6).

Tableau 5. Système de classification pour l'hydrolyse acide ou alcaline [15]

Catégorie du médicament	Force de l'acide/base	Temps d'exposition	Température	Étendue de la dégradation
Pratiquement stable	5 N	2 jours	Reflux	Aucune
Très stable	2 N	1 jour	Reflux	Suffisante
Stable	1 N	12 h	Reflux	Suffisante
Labile	0,1 N	8 h	Reflux	Suffisante
Très labile	0,01 N	8 h	40 °C	Suffisante
Extrêmement labile	0,01 N	2 h	25 °C	Suffisante

Tableau 6. Système de classification pour la dégradation par oxydation [15]

Catégorie du médicament	Force du H_2O_2	Temps d'exposition	Température	Étendue de la dégradation
Pratiquement stable	30 %	48 h	T Ambiante	Aucune
Très stable	10 %	24 h	T Ambiante	Suffisante
Stable	3 %	24 h	T Ambiante	Suffisante
Labile	3 %	6 h	T Ambiante	Suffisante
Très labile	1 %	3 h	T Ambiante	Suffisante
Extrêmement labile	1 %	30 min	T Ambiante	Suffisante

Un stress excessif, résultant de conditions (acide/base à 5N et peroxyde d'hydrogène à 30%) et du point final (20 et 80 %) choisis de manière inappropriée, accroît le risque de générer des produits de dégradation qui ne sont pas pertinents, c'est-à-dire différents de ceux qui pourraient être observés lors de la durée de vie du produit. Une telle contrainte pourrait entraîner une incompréhension des voies de dégradation pertinentes de la SA, aboutissant à une "over-engineering" des méthodes indicative la stabilité. Pour ces raisons, Après les années 2000, un changement significatif dans le concept de dégradation forcée a été observé.

En 2002, Pharmaceutical Research Manufacturers Association (PhRMA) a élaboré des lignes directrices pour la réalisation d'études de dégradation forcée [13]. En 2003, Alsante et al. [20] ont publié une étude comparative de 20 entreprises pharmaceutiques. En 2005 et en 2011, Baertschi a publié deux éditions d'un livre dédié au sujet des tests de contrainte pharmaceutiques.

Ces publications scientifiques ont affirmé que l'exposition suffisante (le point final) est atteinte lorsque la substance active a dégradé de 5 % à 20 % de sa quantité initiale, tout en fournissant des recommandations détaillées basées sur un sens scientifique pour le choix de conditions de stress plus raisonnables.

7. Diverses conditions de dégradation

Le stress testing doit inclure des conditions spécifiques pour examiner quatre principaux mécanismes de dégradation pharmaceutiquement pertinents : thermolytique, hydrolytique, oxydatif et photolytique, à la fois dans la substance active et dans le produit fini.

La qualité par la conception (QbD) offre un cadre systématique pour le développement pharmaceutique, mettant l'accent sur la compréhension approfondie du produit et du processus, guidée par une science solide et une gestion des risques liés à la qualité. Cette approche peut être appliquée pour comprendre comment le stress testing contribue à l'élaboration de méthodes analytiques et à la définition de stratégies de contrôle de la stabilité.

Les connaissances acquises grâce au stress testing forment un "espace de connaissance", crucial pour établir la stabilité intrinsèque du médicament. Ce processus doit identifier tous les produits de dégradation potentiellement possibles dans des conditions réalistes, formant ainsi une base solide pour le développement de méthodes analytiques et de stratégies de contrôle.

L'intégrité des espaces de conception et de contrôle dépend de la qualité et de l'exhaustivité de l'espace de connaissance issu des tests de stress. Des études incomplètes, mal conçues ou mal exécutées peuvent entraîner une compréhension lacunaire de la dégradation du médicament, soulignant l'importance d'une approche rigoureuse pour garantir une évaluation complète des voies de dégradation possibles.

7.1. Dégradation Thermolytique

Les voies thermolytiques, qui sont des mécanismes de dégradation favorisés à des températures élevées, englobent divers processus, tels que :

- L'hydrolyse/déshydratation.
- L'isomérisation/épimérisation.
- La décarboxylation.
- Les réarrangements.
- Certains types de réactions de polymérisation.

À la différence de l'oxydation et de la photolyse, ces voies ne sont pas principalement induites par la température.

La relation d'Arrhenius est l'expression la plus couramment utilisée pour évaluer la relation entre les taux de réaction et la température pour un ordre de réaction donné [21,22].

$$k = A \exp\left(-E_a / RT\right)$$

- Ea : Energie d'activation.
- k : Constante de vitesse.
- A : Facteur pré-exponentiel ou facteur de fréquence (c'est-à-dire, la fréquence des collisions entre les réactifs indépendamment de l'énergie).
- R : Constante universelle des gaz.
- T : Température en kelvins.

Il est possible d'estimer l'effet de la température sur le taux de dégradation d'un composé, à condition que l'énergie d'activation (Ea) soit connue. En supposant une Ea conservatrice de 17 kcal/mol, l'énergie thermique équivalente à 6 mois à 40°C correspond à 2 ans à 25°C [6].

Il est important de noter que les informations ci-dessus supposent que la décomposition suit les mêmes voies à toutes les températures. Selon l'expérience, pour les études en état solide ou en solution, les voies de dégradation seront généralement les mêmes jusqu'à environ 70°C [6].

Les réactions en état solide suivent souvent une voie "autocatalytique", ce qui signifie que les cinétiques de réaction en état solide suivront souvent une courbe en S, ou les cinétiques d'Arrhenius ne s'appliqueront pas si la dégradation en état solide est autocatalytique. En fait, les cinétiques d'Arrhenius sont généralement observées dans la dégradation des produits pharmaceutiques solides, vraisemblablement parce que la plupart des études de dégradation en état solide impliquent seulement des quantités modestes de dégradation (par exemple, ~5%) et fonctionnent donc généralement dans la période "d'induction" ou de "latence" de la dégradation en état solide. Si les études de dégradation en état solide sont menées à des niveaux plus élevés de dégradation (par exemple, >10–30% de dégradation), il est probable que la prédiction du taux de dégradation par les cinétiques d'Arrhenius ne serait pas précise.

En supposant une Ea conservatrice de 17 kcal/mol, 17 jours de sollicitation à 70°C dépasseront l'équivalent thermique de 6 mois à 40°C/75% HR [6].

7.2. Dégradation hydrolytique

L'hydrolyse et l'oxydation sont les deux mécanismes de dégradation les plus courants des médicaments.

L'eau est présente à des niveaux significatifs dans de nombreux principes actifs (par exemple, les hydrates), dans de nombreux excipients et même dans des conditions atmosphériques normales. Il n'est donc pas surprenant que l'hydrolyse soit un problème courant de dégradation. L'hydrolyse est influencée par :

- Le pH.
- Les sels tampons.
- La force ionique.
- Le solvant.
- Autres additifs tels que des agents complexants, des tensioactifs et des excipients [23].

Influence du pH

Les réactions d'hydrolyse sont généralement catalysées par des acides ou des bases. Une approche pratique consiste simplement à exposer l'échantillon à des acides comme HCl ou H_2SO_4 (solution de 0,1 à 1 mol/L) [24] et à des base comme NaOH, LiOH et KOH (solution de 0,1 à 1 mol/L) [24].

De plus, la neutralisation de la solution avant l'analyse HPLC n'est pas recommandée en raison de la possibilité de précipitation ou d'artefacts de réaction secondaire [6].

Problèmes de solubilité

De nombreux médicaments à petites molécules ne sont pas solubles dans l'eau aux concentrations généralement utilisées pour l'évaluation analytique (c'est-à-dire 0,1–1 mg/mL) sur l'ensemble de la plage de pH.

Les deux co-solvants les plus couramment utilisés sont l'acétonitrile et le méthanol [20]. Étant donné que le méthanol a le potentiel de participer à la chimie de dégradation (par exemple, agir comme un nucléophile pour réagir avec des sites électrophiles ou des intermédiaires dans les voies de dégradation), il convient de l'utiliser avec prudence (surtout dans des conditions acides) si le composé testé contient un acide carboxylique, un ester ou un amide, car ces groupes peuvent réagir avec le méthanol [20].

L'acétonitrile est généralement considéré comme un solvant inerte [6] et est généralement préférable au méthanol dans les études de test de stress hydrolytique. L'utilisation de solutions blanches stressées (système solvant sans médicament stressé dans les mêmes conditions) permet une identification facile des pics causés par la dégradation du co-solvant.

Effet de la température

L'utilisation d'une température élevée est appropriée pour les études de test de stress en solution aqueuse ; l'utilisation de contrôles thermiques appropriés est recommandée. Comme discuté dans la section "Dégradation thermolytique", des températures élevées jusqu'à 70°C devraient accélérer de manière significative les processus de dégradation hydrolytique. Des températures plus élevées peuvent être utilisées, mais le risque de comportement non Arrhénius augmente considérablement lorsque la température est augmentée davantage.

Durée

La période de stress la plus longue recommandée à la température la plus élevée (70°C) est d'une semaine, bien que des durées plus longues puissent certainement être utilisées si nécessaire [6].

7.3. Dégradation oxydative

Il existe trois principales voies oxydatives importantes à considérer pour la dégradation des médicaments :

(i) Oxydation médiée par les peroxydes.
(ii) Oxydation médiée par des métaux de transition.
(iii) Oxydation initiée par les radicaux (également appelée autoxydation).

Selon les résultats de l'étude comparative menée par Alsante et al. [20] impliquant 20 entreprises pharmaceutiques, les réponses concernant la dégradation oxydative indiquent que :

- Dix-neuf entreprises utilisent des peroxydes comme mesure oxydative.
- Cinq entreprises optent pour un initiateur radicalaire.
- Trois entreprises privilégient l'utilisation d'oxygène sous pression.
- Trois entreprises ont recours à des métaux de transition.
- Seules deux entreprises préfèrent l'oxygène insufflé.

Oxydation médiée par les peroxydes

Le test de stress oxydatif classique consiste à exposer les substances actives aux peroxydes en dissolvant le médicament dans une solution diluée de peroxyde d'hydrogène (par exemple, 0,3–3 % de peroxyde d'hydrogène).

Température : Il convient de noter ici que le stockage à température ambiante est suffisant pour le test au peroxyde d'hydrogène. L'utilisation de températures plus élevées (par exemple, > 40 °C) avec le peroxyde d'hydrogène doit être effectuée avec prudence, car la liaison O–O est une liaison faible qui se rompra à des températures élevées pour former des radicaux hydroxyles, un réactif oxydant beaucoup plus agressif, qui oxydera de manière agressive la plupart des médicaments par des voies irréalistes ou imprédictibles [6].

Durée : L'oxydation médiée par le peroxyde d'hydrogène est recommandée à des concentrations de 0,3 à 3 % de peroxyde d'hydrogène [6], avec une durée maximale de 7 jours [25] et une température limite de 40 °C [6].

Oxydation médiée par des métaux de transition

L'utilisation des métaux de transition pour induire la dégradation oxydative est bien connue depuis longtemps. Les ions de métaux de transition peuvent initier l'autoxydation via des mécanismes différents des initiateurs de radicaux (par exemple, initiation de réactions de transfert d'électrons, réduction des peroxydes fortuits en radicaux, activation de l'oxygène moléculaire par complexation, etc.) [26].

L'utilisation de métaux de transition (le plus souvent, le cuivre(II) et le fer(III) à une concentration de 1–5 mM, pendant 1 à 7 jours) est également recommandée pour l'évaluation de la susceptibilité à l'oxydation [6,26].

Auto-oxydation

L'auto-oxydation est généralement perçue comme un processus initié par des radicaux, et la source d'initiation peut varier en fonction du système (par exemple, induite par la lumière, catalysée par des métaux, rupture homolytique des liaisons des peroxydes, etc.).

Les réactions initiées par des radicaux impliquent une phase d'initiation où des radicaux sont formés (généralement limitant la vitesse), suivie d'une phase de propagation et d'une phase de terminaison. Par conséquent, les cinétiques de réaction peuvent présenter une courbe en S lorsque la dégradation est tracée en fonction du temps [6].

Les conditions recommandées pour le stress auto-oxydatif incluent l'utilisation d'azonitriles tels que l'AIBN (azobisisobutyronitrile) ou l'ACVA (acide 4,4 ′ -azo-bis(4-cyanovalérique)) comme initiateurs, avec une concentration de substance active de 0,1 à 1 mg/mL. La concentration de l'initiateur doit être de 5 à 20 % la concentration molaire de la substance active. Les solvants suggérés sont l'acétonitrile, l'eau et le méthanol. La température recommandée est de 40 à 60 °C, avec un point final de 5 à 20 % de dégradation ou 7 jours maximum. Il est important de noter les spécificités des solvants recommandés pour chaque azonitrile [6].

7.4. Dégradation photolytique

Les tests de photostabilité sont acceptés comme faisant partie intégrante des tests de stress, en particulier lorsque la substance active ou le produit pharmaceutique est photosensible. Il est nécessaire de confirmer que lorsqu'un produit médicamenteux ou une substance est exposé à la lumière, cela ne provoque pas de changement inacceptable. Ce test est généralement réalisé sur un lot unique, conformément aux indications de la directive ICH Q1B.

Pour l'évaluation de la photostabilité, il est recommandé d'appliquer une approche systématique comprenant, selon les cas, les études suivantes :

- Essais portant sur la substance active;
- Essais portant sur le produit fini en dehors de son conditionnement primaire;
- Essais portant sur le produit fini dans son conditionnement primaire et, au besoin;
- Essais portant sur le produit fini dans l'emballage de commercialisation.

Sources lumineuses

Les essais de photostabilité peuvent utiliser différentes sources lumineuses, mais la température doit être contrôlée pour minimiser l'impact des variations de température localisées ou inclure un témoin noir dans le même environnement. Deux options sont présentées, et dans les deux cas, le fabricant du produit pharmaceutique peut se référer aux informations du fabricant de la lampe utilisée.

Option 1 : Utilisation de sources lumineuses émettant un rendement comparable à celui de l'étalon d'émission (D65/ID65), telles qu'une lampe fluorescente simulant la lumière du jour, une lampe au xénon, ou une lampe aux halogénures métalliques. Des filtres peuvent être utilisés pour éliminer les radiations sous 320 nm si nécessaire [16].

Option 2 : Exposition de l'échantillon à une lumière fluorescente blanche froide et dans le proche ultraviolet, comprenant une lampe fluorescente à lumière blanche froide conforme à la norme ISO 10977 (1993) et une lampe ultraviolette avec une distribution spectrale entre 320 nm et 400 nm, émettant une énergie maximale entre 350 nm et 370 nm. Une partie significative des UV doit se situer entre 320-360 nm et 360-400 nm [16].

Procédure

Certaines conditions recommandées pour les tests de confirmation sont décrites dans les directives de l'ICH. Selon les directives de l'ICH Q1B, les échantillons doivent être exposés à la lumière visible, en fournissant :

- Une illumination globale d'au moins 1,2 million de lux-heures
- Une énergie ultraviolette proche intégrée d'au moins 200 watt-heures/mètre carré avec une distribution spectrale de 320 à 400 nm pour permettre des comparaisons directes entre la substance médicamenteuse et le produit pharmaceutique [16].

Les échantillons peuvent être exposés côte à côte avec un système actinométrique chimique validé pour garantir que l'exposition lumineuse spécifiée est obtenue, ou pendant la durée appropriée lorsque les conditions ont été surveillées à l'aide de radiomètres/luxmètres calibrés.

Pour le test dégradation forcée photolytique, l'illumination le plus couramment recommandé selon la littérature est de 2 à 6 fois le test de confirmation [24–26].

8. Approche expérimentale

En général, l'objectif des tests de dégradation forcée est de générer une dégradation d'environ 5 à 20 % [6,24,26–28] de l'échantillon dans n'importe quelle condition donnée (dans des limites raisonnables de stress).

Dans l'enquête préliminaire, la dégradation forcée est réalisée en exposant les échantillons aux extrêmes conditions de stress.

Le stress testing est arrêté lorsqu'il y a une dégradation de la substance active d'environ 5 à 20 % par rapport à sa quantité initiale ou après une exposition aux extrêmes conditions de stress, selon la première éventualité. L'application de cette règle empirique peut entraîner l'absence de dégradation dans certains cas. Le Tableau 7 répertorie les conditions typiques pour le stress testing.

Tableau 7. Conditions de stress typiques et les points finaux

Type de stress	Conditions	Point final
Hydrolyse Acide	- HCl ou H_2SO_4 - 0,1 à 1 mol/L - Co-solvant : Méthanol, Acetonitrile - Température ambiante - 70°C - 1- 7 jours	- Dégradation de 5 à 20 % - Ou 1 mol/L, 70°C, 7 jours
Hydrolyse Basique	- NaOH, LiOH et KOH - 0,1 à 1 mol/L - Co-solvant : Méthanol, Acetonitrile - Température ambiante - 70°C - 1- 7 jours	- Dégradation de 5 à 20 % - Ou 1 mol/L, 70°C, 7 jours
Oxydation médiée par le peroxyde d'hydrogène	- Peroxyde d'hydrogène - 0,3 à 3 % - 2 à 7 jours - Température ambiante (< 40 °C).	- Dégradation de 5 à 20 % - Ou H_2O_2, 3 %, 7 jours et Température ambiante
Oxydation médiée par les métaux lourds	- Cuivre(II) ou le fer(III) -1–5 mM, -1 à 7 jours	- Dégradation de 5 à 20 % - Ou cuivre(II) et le fer(III), 5mM, 7 jours
Thermique	- à 70°C - 3 semaines	- Dégradation de 5 à 20 % - Ou 70°C, 3 semaines
Photolytique	2 à 6 fois le test de confirmation de l'ICH Q1B	- Dégradation de 5 à 20 % - Ou 6 fois l'ICH Q1B

Il est recommandé de réaliser les tests de dégradation forcée décrits dans le Tableau 8 dès que possible au cours du développement de la substance active (SA) et du produit pharmaceutique (DP).

Tableau 8. Protocole général pour les études de dégradation forcée (tests de stress) des substances actives et des produits pharmaceutiques [13]

	Substance active		**Produit fini**	
Condition	Solide	**Solution / suspension**	**Solide (comprimé, géllule,…)**	**Solution (IV, Oral suspension,…)**
Acide/base		×		∗
Oxydative	∗	×	×	×
Photostabilité	×	∗	×	×
Thermique	×		×	×
Thermique/ humidité	×		×	

× : recommandé ∗ : optionnel

Pour les produits pharmaceutiques, il est crucial de différencier les impuretés non liées à la substance active des impuretés liées à la substance active. Ce processus peut être réalisé par une analyse comparative des échantillons soumis à un stress de la substance active seule, de son produit fini, et des excipients seuls (placebo) [13].

9. Évaluation des résultats

L'évaluation de l'étude de dégradation forcée des composés implique deux aspects :

1. **Analyse de la Pureté des Pics**

   - Utilisation de détecteurs tels que DAD et LC-MS pour établir la pureté des pics.

2. **Bilan Massique**

   - Impératif strict de la FDA dans les méthodes de dégradation forcée.
   - L'absence de bilan massique soulève des doutes sur la précision de la quantification des produits de dégradation.
   - L'investigation du bilan massique implique l'addition des valeurs du dosage et des niveaux de produits de dégradation, avec prise en compte des

facteurs de réponse, de la rétention des produits de dégradation et des produits volatils.

- Importance de compenser la masse manquante.

En conclusion, une approche holistique, combinant l'analyse de la pureté des pics et le bilan massique, est essentielle pour interpréter les résultats d'une étude de dégradation forcée.

Il convient de souligner que les tests de stress ont une nature prédictive, anticipant les changements potentiels dans la stabilité [6]. En revanche, les tests de stabilité accélérée et à long terme sont définitifs. Dans l'ensemble, pour évaluer leur pertinence, les résultats des tests de stress devraient être systématiquement comparés à ceux issus d'études de stabilité à long terme et accélérées dès qu'ils sont accessibles [12].

III. Bilan massique

Le bilan massique est défini par la Conférence internationale sur l'harmonisation (ICH Q1A(R2)) comme « le processus d'addition de la valeur du dosage de la substance active et des niveaux des produits de dégradation pour voir dans quelle mesure ces éléments s'additionnent à 100 % de la valeur initiale, en tenant compte de la marge d'erreur analytique » En démontrant que les pertes dégradatives de la substance parente sont en corrélation avec l'augmentation mesurée des produits de dégradation, le bilan massique fournit des preuves qu'il n'existe pas de voies de dégradation significatives non prises en compte [29].
Le bilan massique - l'application pratique de la loi de conservation de la masse à la dégradation forcée - est un concept largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique [30].

Il est pertinent de noter que cette démonstration n'a pas besoin de couvrir chaque fragment de dégradation; il est envisageable qu'une partie de la substance parente (par exemple, une fraction non chromophore) soit perdue au cours de la dégradation sans être détectée du tout. La présence de cette partie peut être déduite grâce à la détection de la "partie restante" de la substance parente, qui conserve la fraction détectable. Ainsi, la voie de dégradation spécifique peut encore être suivie, permettant d'atteindre un bilan massique adéquat [29].

1. Mesure et expression du bilan massique

Deux concepts utiles pour exprimer le bilan massique sont le Déficit Absolu de Bilan Massique (AMBD) et le Déficit Relatif de Bilan Massique (RMBD), qui peuvent tous deux être positifs ou négatifs.

L'AMBD et le RMBD sont tous deux nuls en cas de bilan massique parfait, positifs lorsque l'augmentation mesurée des produits de dégradation est inférieure à la perte de la substance active, et négatifs lorsque l'augmentation mesurée des produits de dégradation dépasse la perte de la substance active.

Le RMBD est particulièrement utile pour évaluer la signification d'un problème de bilan massique, car il est indépendant de l'étendue de la dégradation (contrairement à l'AMBD). Le RMBD, en d'autres termes, exprime l'inexactitude relative de l'augmentation mesurée des produits de dégradation par rapport à l'étendue de la dégradation représentée par la substance active.

$$AMBD = (M_{p,0} - M_{p,x}) - (M_{d,x} - M_{d,0}) \quad [29,30]$$

$$RMBD = \frac{(M_{p,0} - M_{p,x}) - (M_{d,x} - M_{d,0})}{(M_{p,0} - M_{p,x})} \times 100 \quad [29,30]$$

- AMBD : Déficit Absolu de Bilan Massique.
- RMDB : Déficit Relatif de Bilan Massique.
- $M_{p,0}$: Masse initiale de la SA (Substance active).
- $M_{p,x}$: Masse finale de la SA.
- $M_{d,x}$: Masse finale des produits de dégradation.
- $M_{d,0}$: Masse initiale des produits de dégradation.

2. Investigation des problèmes du bilan massique

Les causes principales du déséquilibre massique [29] sont résumées dans un diagramme modifié d'Ishikawa (Figure 2). Ce type de diagramme est couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour soutenir la Qualité par la Conception (QbD) et les efforts de gestion des risques qualité [16,31].

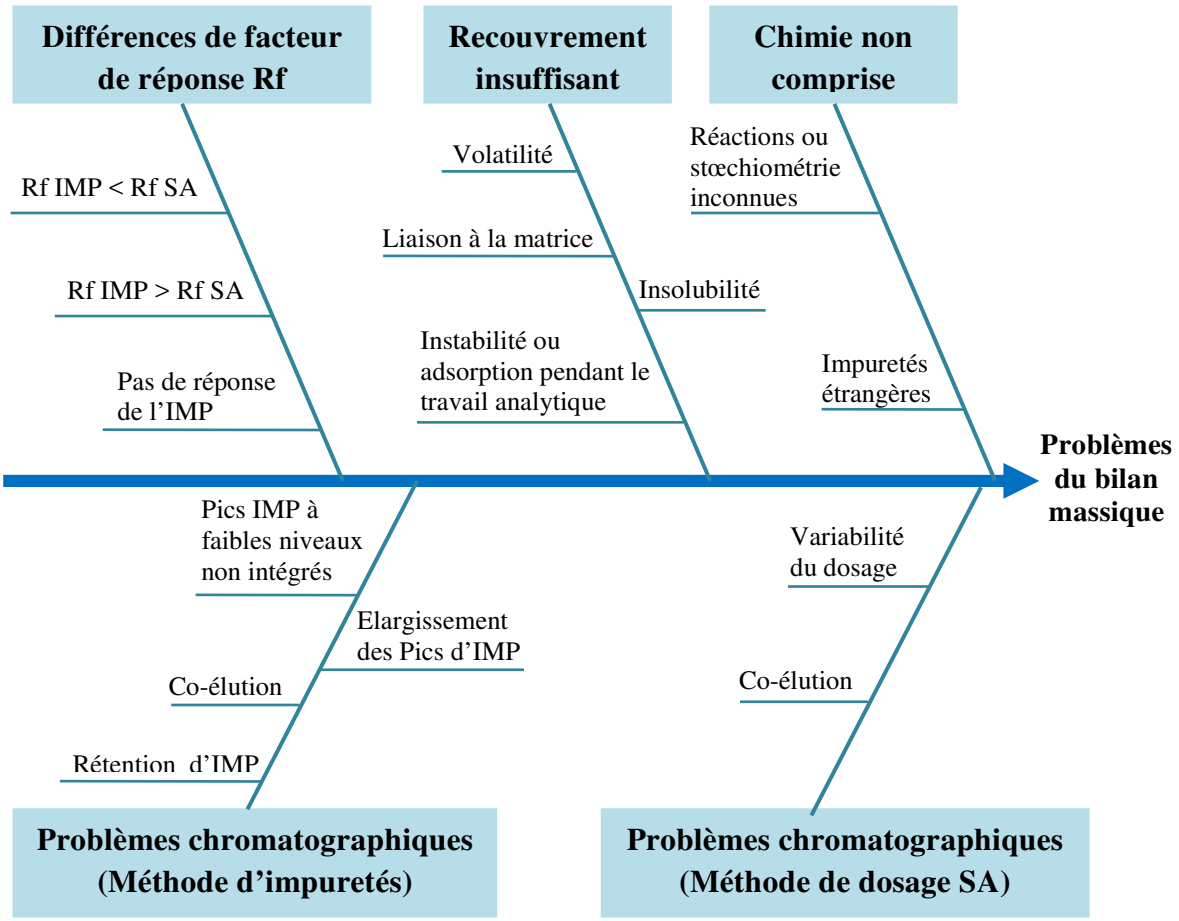


Figure 2. Diagramme modifié d'Ishikawa [30]

Dans les Tableaux de 9 à 13, chaque concept répertorié dans le diagramme d'Ishikawa est développé pour discuter de la manière dont chaque paramètre pourrait influencer le bilan massique, et des stratégies possibles pour résoudre les problèmes sont proposées.

Tableau 9. Influence de la différence des facteurs de réponse Rf sur le bilan massique et solutions potentielles [30]

Scénario	Solution(s) possible(s)/Stratégie d'investigation
Cause 1 : Rf IMP est inférieur au Rf SA	
IMP est sous-estimée	- Déterminer un Rf précis. - Utiliser un détecteur alternatif.
Cause 2 : Rf IMP est supérieur au Rf SA	
IMP est sur-estimée	- Déterminer un Rf précis. - Utiliser un détecteur alternatif.
Cause 3 : Aucune réponse de l'IMP (par exemple, le chromophore détruit par la dégradation)	
IMP n'est pas détectée	- Utiliser un détecteur alternatif. - Déduire la quantité de l'IMP non détectée en fonction de la connaissance de la voie de dégradation.

Tableau 10. Influence de l'incompréhension de la chimie de dégradation sur le bilan massique et solutions potentielles [30]

Scénario	Solution(s) possible(s)/Stratégie d'investigation
Cause 1 : Impuretés étrangères	
IMP est incluse de manière erronée comme dégradant de la SA (par exemple, issues d'un excipient ou de substances relargables du conditionnement primaire).	- Effectuer des études d'extractibles/des relargables pour comprendre les impuretés contribuées par conditionnement primaire. - Examiner les excipients pour détecter les impuretés à faible niveau, car elles ne sont généralement pas prises en compte par les tests monographiques. - Élucider la structure de l'impureté.
Cause 2 : Réactions ou stœchiométrie inconnues	
Des réactions chimiques inconnues se produisent, rendant l'interprétation des données difficile.	- Utiliser des conditions de stress et des techniques de détection hybrides pour comprendre la voie et l'identité du produit de dégradation. En fonction d'une approche guidée par la chimie, déterminer comment contrôler et rapporter.

Tableau 11. Influence d'un recouvrement insuffisant sur le bilan massique et solutions potentielles [30]

Scénario	Solution(s) possible(s)/Stratégie d'investigation
Cause 1 :Volatilité	
IMP n'est pas déetectée ou est sous-estimée en raison de sa volatilité.	- Utiliser la chromatographie en phase gazeuse (GC) en conjonction avec la spectrométrie de masse (MS), la détection par ionisation de flamme (FID) ou la détection par conductivité thermique (TCD).
Cause 2 : Insolubilité	
- SA a une solubilité insuffisante (IMP est sur-estimée). -IMP a une solubilité insuffisante (IMP est sous-estimée)	- Modifier le solvant d'échantillon pour améliorer la solubilité de la SA et l'IMP. - Si cela n'est pas possible, développer une méthode séparée pour quantifier IMP.
Cause 3 : Liaison covalente ou non covalente à la matrice	
- IMP se lie de manière non covalente à la matrice de l'échantillon et n'est pas détectée ou est sous-estimée. - IMP réagit de manière covalente avec la matrice de l'échantillon et n'est pas détectée ou est sous-estimée en raison d'une faible solubilité.	- Utiliser une préparation d'échantillon plus agressive telle que l'homogénéisation ou la sonication pour rompre l'interaction. - Voir la section sur l'insolubilité ci-dessus.
Cause 4 : Instabilité ou adsorption pendant le travail analytique	
- IMP s'adsorbe sur le verre ou le plastique ou est instable pendant la préparation de l'échantillon. - IMP se dégrade entre la préparation et l'analyse.	- En fonction des connaissances acquises à partir des études de dégradation forcée, envisager une protection contre la lumière, la modification du pH ou de la composition du solvant d'échantillon. Évaluer d'autres contenants de préparation d'échantillons si l'adsorption est suspectée. - Réfrigérer l'autosampler pour ralentir le taux de dégradation.

Tableau 12. Influence des problèmes chromatographiques (méthode d'impuretés) sur le bilan massique et solutions potentielles [30]

Scénario	Solution(s) possible(s)/Stratégie d'investigation
Cause 1 : De nombreux pics de IMP à faible niveau échappent à l'intégration.	
IMPs ne sont pas détectées car ils sont indiscernables de la ligne de base; par conséquent, le total des IMP est sous-estimé.	- Augmenter la concentration de l'échantillon. - Diminuer la largeur du pic (par exemple, augmenter la hauteur du pic) en augmentant la pente du gradient et/ou en modifiant la phase mobile ou le modificateur. Utiliser une colonne à particules de taille plus petite et/ou travailler à une pression/débit plus élevée.
Cause 2 : Élargissement des pics	
IMPs ne sont pas intégrées correctement en raison de l'élargissement du pic.	- Veiller à ce que l'HPLC soit correctement raccordé en tenant compte de l'élargissement des bandes hors colonne. - Diminuer la largeur du pic (par exemple, augmenter la hauteur du pic) en augmentant la pente du gradient et/ou en modifiant la phase mobile ou le modificateur. Utiliser une colonne à particules de taille plus petite et/ou travailler à une pression/débit plus élevée. -Utiliser une technique d'injection en flux et une phase mobile forte pour éluer tous les pics en tant que bolus, et comparer la superficie totale intégrée du pic du bolus avec et sans la colonne en place.
Cause 3 : Co-elution	
Deux IMPs co-éluent ; en raison des différences de Rf entre les IMPs, le résultat pourrait être soit sur-estimé, soit sous-estimé.	- Améliorer la résolution entre les pics d'IMP en utilisant des techniques standard de développement de méthode (c'est-à-dire, colonne, phase mobile, température et pH). Une fois séparés, corriger le Rf
IMP co-élue avec le pic de la SA, résultant en une non-détection de l'IMP.	- Utiliser des techniques pour évaluer la pureté du pic (par exemple, collecte de fractions, DAD, MS). Améliorer la résolution entre l'IMP et le pic de la SA en utilisant des techniques standard de développement de méthode (c'est-à-dire, colonne, phase mobile, température et pH).
Cause 4 : Rétention de l'IMP	
IMPs ne sont pas éluées de la colonne	- Inclure un rinçage à solvant fort à la fin de l'analyse afin d'éluer l'IMP. Changer la colonne ou la phase mobile. - Utiliser une technique d'injection en flux et une phase mobile forte pour éluer tous les pics en tant que bolus, et comparer la superficie totale intégrée du pic du bolus avec et sans la colonne en place.

Tableau 13. Influence des problèmes chromatographiques (méthode de dosage SA) sur le bilan massique et solutions potentielles [30]

Scénario	Solution(s) possible(s)/Stratégie d'investigation
Cause 1 : Variabilité du dosage	
- La variabilité dans la méthode de dosage entrave une évaluation adéquate du bilan massique. - Une grande partie de la variabilité du dosage est causée par la variabilité de la teneur en comprimés/gélules.	- S'assurer que le niveau de dégradation est bien au-delà du point où la variabilité du dosage aurait un impact significatif sur l'évaluation. - Améliorer l'uniformité des unités ou augmenter le nombre des unités utilisés pour faire le dosage.
Cause 2 : Co-elution	
IMP co-élue avec le pic de la substance active, ce qui entraîne une surestimation du dosage.	- Utiliser des techniques pour évaluer la pureté du pic (c.-à-d., collecte de fractions, DAD, MS). Améliorer la résolution entre le dégradant et le pic de la substance active en utilisant des techniques standard de développement de méthode (c.-à-d., colonne, phase mobile, température et pH).

3. Considérations analytiques

L'évaluation de la dégradation des produits pharmaceutiques nécessite des méthodes analytiques sélectives capables de quantifier précisément la substance active (SA) et tout produit de dégradation formé (c'est-à-dire des méthodes indicatrices de stabilité, SIM).

Les directives de l'ICH [3,32–34] exigent des SIMs pour tester les attributs susceptibles de changer pendant la conservation et ceux susceptibles d'impact sur la qualité, la sécurité et/ou l'efficacité des produits pharmaceutiques. La directive de stabilité ICH Q1A R2 précise clairement que les tests de stress doivent être utilisés pour "valider le pouvoir indicateur de stabilité des procédures analytiques". Ce qui n'est pas clair dans les directives réglementaires, ce sont les étapes pratiques, le timing, les critères et les meilleures pratiques pour développer et valider le "pouvoir indicateur de stabilité" d'une méthode analytique.

Se concentrer sur trois aspects critiques du développement des SIM qui sont pertinents pour la discussion sur le bilan massique mais parfois négligés.

3.1. Pureté des pics

L'évaluation de la pureté des pics est cruciale pour démontrer la spécificité d'une méthode indicatrice de stabilité (SIM), comme le mentionne le guide ICH Q2R2. L'utilisation de détecteurs à barette de photodiodes DAD et de spectrométrie de masse (MS) est recommandée pour évaluer la pureté des pics, bien que des limitations soient présentes.

Si un détecteur DAD est disponible, les analystes peuvent utiliser des calculs de pureté des pics pour détecter un deuxième pic potentiel. Cependant, les calculs de pureté des pics peuvent être complexes en raison de problèmes tels que la similarité des spectres, le faible rapport signal/bruit, et les irrégularités de la ligne de base [35].

La MS est une alternative puissante mais peut être incompatible avec la phase mobile LC. Plusieurs problèmes, tels que la compatibilité avec le tampon phosphate, peuvent limiter son utilisation [35].

Une technique complémentaire consiste à collecter et réinjecter une fraction de la queue d'un pic majeur, modifiant ainsi les concentrations relatives des pics et permettant la détection du pic mineur. Cette approche peut aider à confirmer la pureté des pics [35].

D'autres méthodes, telles que la recherche de pics d'impuretés avec des techniques de séparation orthogonales (électrophorèse capillaire, chromatographie en phase normale, HPTLC, HILIC, GC, SFC), peuvent également être explorées [30].

En résumé, bien que les détecteurs DAD et MS soient utiles pour évaluer la pureté des pics, des limitations subsistent, et des approches complémentaires peuvent être nécessaires pour surmonter ces défis.

3.2. Détection et facteurs de réponse Rf

Souvent, surtout aux premières phases du développement, les produits de dégradation sont inconnus ou ne sont pas caractérisés structurellement. Dans de tels cas, il est beaucoup plus difficile de démontrer le bilan massique. Les caractéristiques du détecteur utilisé doivent être bien comprises, et des classes spécifiques de détecteurs peuvent être nécessaires pour assurer la détection de tous les produits de dégradation et fournir des informations sur les différences potentielles dans les valeurs du facteur de réponse (Rf).

Les différences dans les facteurs de réponse (Rf) sont (peut-être) la contribution la plus courante au déséquilibre du bilan massique.

Le Tableau 14 résume les points forts et faibles de plusieurs détecteurs en ce qui concerne les facteurs de réponse (Rf).

Tableau 14. Avantages et inconvénients de quelques détecteurs de HPLC

Détecteur	Avantages	Inconvénients
Résonance magnétique nucléaire (RMN) [36,37]	Presque universel et quantitatif sur une base molaire.	Nécessite souvent des impuretés isolées ou enrichies, car la sensibilité de la RMN en chromatographie liquide à haute performance (HPLC RMN) peut ne pas être adéquate.
Spectrométrie de masse (SM) [30]	Sensible à la masse. Quasiment universelle.	L'efficacité d'ionisation (et donc les facteurs de réponse) peut varier considérablement pour des composés structurellement similaires.
Détecteur de diffusion de lumière évaporative (ELSD) [38]	Répond aux composés sans chromophore, sensible à la masse.	Les composés volatils et semi-volatils peuvent ne pas être détectés, la réponse n'est pas linéaire sur une large plage et dépend de la formation de particules et de la composition de la phase mobile.
Détecteur UV à barette de diode (DAD) [30]	Réponse basée sur le chromophore ; dépend de la concentration. Grande linéarité, plage dynamique élevée et précision.	Les Rfs dépendent fortement de la structure du chromophore et de la longueur d'onde sélectionnée.

3.3. Variabilité Analytique

La définition du bilan massique de l'ICH inclut une "considération appropriée de la marge d'erreur analytique". Étant donné que les échantillons de stabilité typiques sont analysés à différents moments, une telle "considération appropriée" devrait tenir compte de la variance totale de la mesure analytique, approximativement indiquée dans l'Équation [30] suivante :

$$\sigma_{total} = \sqrt{\sigma^2_{dosage\ initial} + \sigma^2_{dosage\ final}}$$

- σ_{tolal} : Ecart type total.
- $\sigma^2_{dosage\ initial}$: Variance dosage initial.
- $\sigma^2_{dosage\ final}$: Variance dosage final.

Par exemple, si la RSD (Coefficient de variation) du dosage est de 2,0 %, et que les échantillons sont analysés à différents moments avec des instrumentales différentes, les mesures du dosage seraient indépendantes les unes des autres, et donc leurs variances sont additives. Avec une RSD de 2,0 %, la contribution totale de la variabilité du dosage à l'évaluation du bilan massique serait de 2,83 %.

Bien que cela ne fasse pas partie de la variabilité analytique, il convient de tenir compte des contributions de la variabilité de la fabrication (par exemple, l'uniformité de la teneur), ce qui peut compliquer davantage les évaluations de l'équilibre massique.

Pour ces raisons, certaines sources [39,40] suggèrent qu'une plage acceptable de la variabilité analytique, dans l'évaluation du bilan massique, est de 97 % à 103 %.

Le bilan massique est un concept simple, mais le mesurer peut être assez complexe. L'analyste doit prendre en compte de nombreuses considérations lors de l'évaluation du bilan massique, notamment la présence d'espèces réactives autres que le principe actif, la chimie et la stœchiométrie de la ou les réactions de dégradation, ainsi que la sensibilité du détecteur aux espèces réactives et aux produits de dégradation présents.

CHAPITRE 2.
OPTIMISATION ET VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES

I. Application des plans d'expériences dans l'optimisation

1. Définition

Un plan d'expérience constitue une stratégie de planification d'expériences avec une approche statistique dont le but est d'obtenir des résultats fiables qui reflètent la variation réelle du phénomène étudié en fonction de ses diverses caractéristiques de façon efficaces et économique, ainsi permettant de maîtriser un problème à plusieurs effecteurs [30]. Ces plans d'expériences permettent d'arranger au mieux les essais qui suivent une recherche scientifique ou des études industrielles [4].

2. Vocabulaire employé lors d'une étude par des plans d'expériences

2.1. Réponse

La réponse est l'ampleur observée pour chaque expérience réalisée. C'est le résultat calculé d'une étude. Sa valeur ne peut être modifiée que de manière indirecte en faisant varier les facteurs. La sélection de la ou des réponses est une étape fondamentale, toute l'analyse et toutes les conclusions sont influencées par ce choix [41].

2.2. Facteur, niveau et domaine de variation d'un facteur

Les facteurs sont les paramètres d'entrée qui interviennent sur le système ou le procédé. Ce sont toute variable obligatoirement contrôlable pouvant influer sur les variations des réponses. Ils peuvent être quantitatifs ou qualitatifs, continues ou discrets [4].

La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Lorsque l'influence d'un facteur est étudiée, en général, ses variations sont limitées entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas -1 et La borne supérieure est le niveau haut +1. L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur [42].

2.3. Espace expérimental et domaine d'étude

L'espace expérimental est présenté en utilisant un espace à deux dimensions, ce qui facilitera les représentations graphiques. Il sera ensuite aisé d'étendre les notions présentées à des espaces multidimensionnels. L'expérimentateur sélectionne une partie de l'espace expérimental pour réaliser son étude. Cette zone particulière est le domaine d'étude (figure 3).

Ce domaine est défini par les niveaux hauts et les niveaux bas de tous les facteurs et éventuellement par des contraintes entre les facteurs, les résultats expérimentaux seront valables seulement dans ce domaine [4].

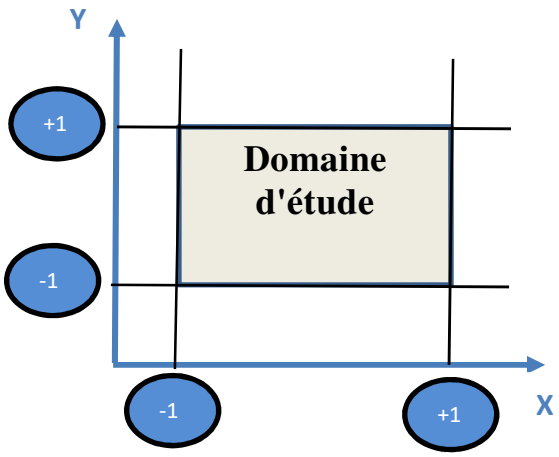


Figure 3. Définition du domaine d'expérience

2.4. Matrice d'expérience

Une matrice d'expérience est un outil mathématique qui rassemble la totalité des expériences à effectuer dans un tableau. Elle est composée de N lignes correspondantes au nombre d'expériences et de K colonnes correspondantes au nombre de variables. Un exemple d'une matrice à trois facteurs est présenté dans le tableau 15.

Tableau 15. Matrice d'expérience pour un plan factoriel à trois facteurs

Expérience	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

2.5. Interactions factorielles

Il existe une interaction entre deux facteurs A et B, quand l'effet d'un facteur A dépend de la valeur du facteur B ou inversement, on appelle interaction d'ordre m une interaction entre m facteurs. Cette interaction se traduit sur la figure 4 par le fait que les deux droites ne sont pas parallèles. Plus les droites s'écartent de la parallèle, plus le degré d'interaction est élevé [43].

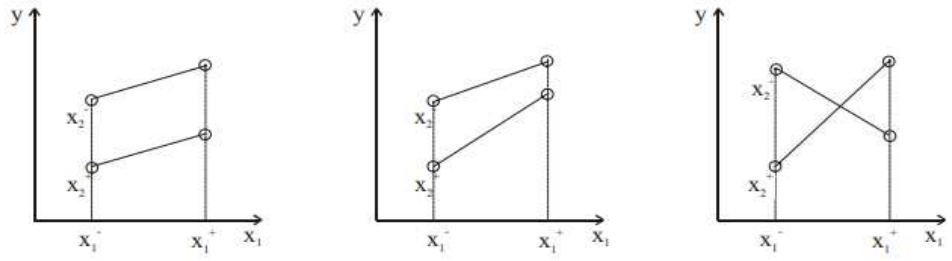


Figure 4. Interactions factorielles

3. Démarches méthodologiques

Malgré la diversité des plans, les étapes de la démarche se déroulent dans un ordre commun [44].

- Définitions des objectifs de l'étude.
- Choix des réponses.
- Définition des facteurs étudiés.
- Choix du domaine de variation des facteurs.
- Choix et construction du plan.
- Réalisation des essais.
- Analyse des résultats : il existe deux analyses qui sont complémentaires
    - L'analyse graphique : elle donne une représentation simple des résultats. Elle permet de visualiser l'influence des paramètres et de leurs interactions.
    - L'analyse statistique : elle permet de discerner les sources de la variation globale de la réponse, elle complète l'analyse graphique et donne un taux de confiance statistique aux résultats.
- Conclusion de l'étude : faire la synthèse des résultats obtenus et décider les solutions à entreprendre (réglage, correction, ou reconception).
- L'essai de confirmation doit permettre la décision à entreprendre, soit :

- Accepter le niveau de qualité obtenu après réglage.
- Mettre un nouveau plan pour améliorer le résultat.
- Changer de stratégie d'analyse ou de conception du procédé.

4. Différents types de plans d'expériences

Les trois grandes familles des plans d'expériences sont illustrées dans la figure 5 [45].

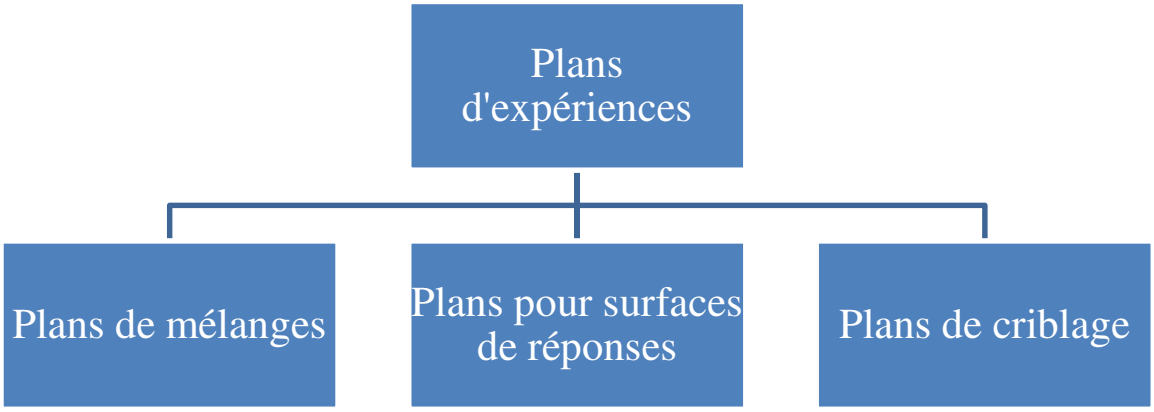


Figure 5. Différents types de plans d'expériences

4.1. Plans de criblage

Les plans de criblage sont les plus employés car ils permettent de déterminer parmi un ensemble initial de facteurs, les éléments qui ont une influence statiquement non négligeable sur les variations de la réponse. Il s'agit donc d'un procédé de sélection ou de criblage. Aucune relation entre les variations des facteurs et celle de la réponse n'est établie. Mais elle permet de déterminer le poids des facteurs sur les réponses d'un système à partir d'un modèle [46].

Parmi les plans de criblage à deux niveaux proposés, il y a les plans factoriels complets et les plans factoriels fractionnaires.

4.1.1. Plans factoriels complets

A. Définition

Ces plans possèdent un nombre de niveau limité à deux pour chaque facteur, il y aura donc 2^k essais au totale (K étant le nombre de facteurs), Chaque facteur est fixé à deux niveaux, un niveau bas noté par le signe moins (-), un niveau haut noté par le signe plus (+).

Ils permettent de mieux comprendre le principe de la méthode, et ils sont les plus simples et les plus rapides à mettre en œuvre, ils estiment non seulement les effets des facteurs mais également toutes leurs interactions [47].

B. Construction des plans factoriels complets

Elle se présente selon une disposition particulière et d'une manière simple, la colonne de signes du facteur 1 est - + - + - + - +, c'est-à-dire une suite des signes - et + alternés en commençant par un signe -, la colonne de deuxième facteur est constituée de deux signes - suivis de deux signes +.

Pour le troisième facteur est une suite de quatre signes -, suivis de quatre signes +, enfin pour les autres facteurs P c'est une suite de 2^(p-1) de signe - suivis de 2^(p-1) signe +.

Dans ce type des plans, pour chaque facteur on trouve autant de signes (+) que de signes (-) par colonne. C'est-à-dire qu'il contient toutes les combinaisons possibles des niveaux [47].

4.2.2. Plans factoriels fractionnaires

A. Définition

Ces plans sont utilisés pour réduire la charge expérimentale en focalisant l'attention sur les effets les plus intéressants, ils possèdent des facteurs ayant chacun deux niveaux. Mais on ne réalise pas toutes les combinaisons de niveau. On sélectionne une fraction des essais d'un plan complet pour construire un plan fractionnaire. Il s'agit donc d'un plan 2^(k-p)(p entier) dont le plan complet a été divisé par 2p, et cette sélection est basée sur des considérations mathématiques, et leurs interprétation nécessite de connaître la théorie des aliases et l'application des hypothèses d'interprétations [4].

B. Construction des plans factoriels fractionnaires

Elle se fait à partir d'un plan factoriel complet dont la matrice de calcul est rédigée en omettant la colonne de signe plus (+). Cette nouvelle matrice est nommée plan de base. Dans ce plan de base, il faut choisir une colonne de signes correspondant à une interaction et lui attribuer un facteur supplémentaire. La colonne choisie peut-être soit elle-même avec ses

signes, soit la colonne avec les signes opposés. Puis le générateur d'aliases est déduit grâce au calcul de Box [4].

Une comparaison des avantages et des inconvénients entre les deux plans est présentée dans le tableau 16 [47].

Tableau 16. Comparaison des avantages et des inconvénients entre les deux plans de criblage

Plans de Criblage	Avantages	Inconvénients
Plans factoriels complets	- Les essais sont faciles à contrôler et les risques d'erreurs sont minimisés. - Les plans factoriels complets sont des plans d'expériences optimaux qui étudient toutes les combinaisons possibles des niveaux des facteurs traités et qui nous garantissent les meilleurs résultats [48]. - La modélisation mathématique est immédiate. - L'interprétation des résultats est à la portée de tout le monde sans avoir des connaissances approfondies en statistiques.	-Faire beaucoup d'essais, donc le cout croit rapidement.
Plans factoriels fractionnaires	- Plus économiques en nombre d'essais et plus rapides. - Les modèles mathématiques utilisés sont donc, eux aussi, beaucoup plus simples. - Pouvoir mener les expériences séquentiellement [49].	- Impossibilité de calculer toutes les interactions entre tous les facteurs [50]. -Les effets sont alaisés cela signifie qu'ils ne traduisent pas directement l'effet des facteurs considérés individuellement mais l'ensemble de facteurs et d'interactions [49]. -Parfois, il est impossible de conclure de façon concrète sur l'effet d'un facteur, puisque dans un contraste, chaque terme peut se révéler influent.

4.2. Plans pour surfaces de réponses

Ces plans sont utilisés pour trouver la relation mathématique du second degré qui lie les réponses mesurées aux facteurs. Ils permettent de faciliter le développement séquentiel d'une étude en identifiant rapidement les facteurs les plus influents parce qu'ils possèdent des propriétés statistiques optimales [51].

4.2.1. Plans composites :

A. Définition

Ils sont utilisés pour compléter les plans d'expériences factoriels (complets ou fractionnés) de manière à pouvoir ajuster un modèle pour surface de réponse.

Le plan composite présente 3 parties :

1- Le plan factoriel.

2- Le plan en étoile.

3-Les points au centre du domaine d'étude.

B. Avantages

Les plans composites présentent deux avantages : ils ne sont pas trop coûteux en essais et peuvent être exécutés de façon séquentielle [52].

C. Inconvénients

Ils nécessitent qu'on puisse fixer les facteurs à cinq niveaux différents, ce qui est parfois difficile à réaliser [52].

4.2.2. Plans de BOX-BEHNKEN :

A. Définition

BOX et BEHNKEN ont proposé en 1960 ces plans qui permettent d'établir directement des méthodes du 2^{nd} degré. Tous les facteurs ont trois niveaux : -1 ; 0 ; et +1.

On peut entreprendre l'étude des « p » 1^{er} facteurs en se réservant la possibilité d'en ajouter de nouveaux sans perdre les résultats des essais déjà effectués [53].

B. Avantages

1-Ils ne nécessitent que des facteurs variés sur trois niveaux ce qui peut permettre de faire une expérimentation moins coûteuse [54].

2-Ils exigent, généralement, moins d'essais que les plans composites [54].

C. Inconvénient

L'inconvénient du plan BOX-BEHNKEN en comparaison avec le plan composite est qu'il ne peut pas être construit en deux étapes en commençant par le plan 2^p [54].

4.3. Plans de mélanges

Ce sont des plans particuliers dont les facteurs d'étude sont les proportions des constituants du mélange et non les quantités de mélange utilisées. La somme de ces proportions est toujours égale à 100 %. Le pourcentage du dernier constituant est imposé par la somme des pourcentages des premiers composés du mélange. Dans cette situation les facteurs ne sont pas indépendants et cela entraîne des problèmes particuliers [55].

5. Evaluation des Modèles

5.1. Analyse de la variance

L'analyse de la variance est appelée « Analysis of Variance » dans la littérature Anglo-Saxonne ; son appellation est couramment abrégée en ANOVA.

C'est un outil essentiel dans la détermination de la signification d'un effet ou d'un modèle mathématique par le pouvoir de tester, d'une manière absolue, l'influence des facteurs sur les variations d'une réponse donnée [56].

5.2. Adéquation du modèle

5.2.1. Ajustement du modèle

C'est une recherche globale de l'ajustement du modèle, dans laquelle on cherche à savoir si le modèle explique bien l'ensemble des résultats. Pour évaluer ce degré d'explication du modèle par rapport aux réponses mesurées, on établit le coefficient de détermination (R^2, R^2ajusté) qui est un indice statistique qui mesure la qualité du modèle en utilisant les résultats de l'analyse des variances [56].

Le R^2 prend des valeurs comprises entre 0 et 1. S'il est égal à zéro, le modèle n'explique rien. S'il est proche de 1, le modèle explique toutes les réponses mesurées.

En présence de plusieurs variables explicatives, le R^2 augmente naturellement. Il est donc usuel de recourir à l'utilisation du R^2 ajusté [57].

5.2.2. Précision

C'est la mesure de signal bruit du modèle qui est le rapport entre les valeurs prédites et l'erreur expérimentale. Elle doit être supérieure à 4.

5.3. Analyse des résidus

Le résidu est la différence entre la valeur mesurée, donnée par l'appareillage, et la valeur théorique de l'échantillon. Cette valeur théorique, également appelée valeur prédite, est calculée et non mesurée. Il s'agit donc de la somme des deux écarts : manque d'ajustement et erreur expérimentale.

Une fois le modèle obtenu, une analyse des résidus pourra être effectuée par une représentation graphique ; les valeurs des réponses prédites seront portées en abscisses et les résidus correspondants seront portés en ordonnées.

En fonction de l'allure des graphes obtenus, il sera possible d'observer si les résidus sont répartis aléatoirement ou non. Il faudrait obtenir des graphes qui ne laissent apparaitre aucune relation entre les grandeurs étudiées [57].

II. Validation des méthodes analytiques

1. Définition

La validation des méthodes analytiques correspond à l'ensemble des opérations nécessaire pour prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé [58].

2. Objectif de la validation

L'objectif de la validation est de donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la vraie valeur inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable cela pour minimiser les risques. Elle démontre l'aptitude et la fiabilité d'une méthode vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur [59].

La validation des méthodes analytiques a pour objectif de s'assurer que la méthode analytique donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse.

3. Aspects réglementaires

Diverses publications fournissent des directives concernant la validation des méthodes analytiques.

3.1. NORME ISO 17025

C'est une référence de fonctionnement pour les laboratoires, dans le but de fournir une preuve de la compétence de leurs techniques en essais et étalonnages, et d'améliorer leurs organisations et leurs techniques.

3.2. NORME ISO 5705

La série ISO 5725 décrit le profil d'exactitude total, en mesurant la fidélité et la justesse des résultats des méthodes de calcul.

3.3. Guideline de la FDA

La FDA [5] a publié en 2015 un guideline intitulé “Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics”. Ce document fournit des recommandations sur la manière selon laquelle doivent être présentées les données de validation des procédures et des méthodes pour supporter la documentation de l’identité, la qualité, la pureté et l’activité des substances actives ou des produits pharmaceutiques.

3.4. Normes AFNOR « NF V 03-110 »

Elles présentent les différents caractères de la validation des procédures analytiques (AFNOR 1994) ainsi que le protocole de caractérisation concernant la validation d'une méthode d'analyse quantitative en établissant le profil d'exactitude et les intervalles d’application de la validation.

3.5. Guidelines ICH

Quatre guidelines ICH ont été publiés :

-ICHQ 2A : Validation of analyticals method « definitions and terminology » 1994 : textes qui rassemblent les définitions et la terminologie qui doivent être considérées lors de la validation des méthodes analytiques.

-**ICHQ 2B** : Validation of analyticals method «Methodology» 1996 : son objectif est de fournir des conseils et recommandations sur la façon d’appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. Autrement dit, le document procure une indication sur les données qui devraient être exposées dans un dossier d’enregistrement.

-ICH Q2(R1) [58]: Validation of analyticals method « Text and methodology » 2005 : une révision du ICHQ 2A et ICHQ 2B. Son but est de regrouper les textes de la terminologie et les définitions avec la méthodologie.

- ICH Q2(R2) [1] : « VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES » November 2023, la dernière révision de l'ICH Q2(R1), introduit de nouveaux concepts tels que la linéarisation des réponses non linéaires, l'étalonnage multivarié et la notion de profil d'exactitude. Ce guide de l'ICH est une exigence réglementaire. Toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) doit satisfaire à ces exigences.

3.6. Documents des commissions de la SFSTP

Contrairement à l'ICH, ces publications ne constituent pas des exigences réglementaires. Néanmoins, ils citent les recommandations réglementaires habituellement acceptées et exécutées dans l'industrie pharmaceutique internationale et une mise en œuvre statistique pour la validation d'une procédure analytique

- SFSTP « Guide de validation, rapport d'une commission SFSTP » ;
    - Méthodologie (1992).
    - Exemples d'application (1992).
    - SFSTP «Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP» (1997).
- SFSTP « validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches » ;
    - Généralités, paru dans STP Pharma Pratique en 2003 [59].
    - Statistiques, paru dans STP Pharma Pratique en 2006 [60].
    - Exemples d'application, paru dans STP Pharma Pratique en 2006 [61].
    - Exemples d'application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008.

4. Types de méthodes d'analyses à valider

L'ICH propose une classification des types de méthodes en 4 catégories

Les épreuves d'identification : qui ont pour objet de confirmer l'identité et les caractéristiques d'une substance à analyser contenue dans un échantillon ;

Dosage quantitatif des impuretés ;

Vérification des teneurs limites des impuretés ;

Dosage d'un composé majeur : c'est la détermination quantitative de la partie active ou d'une ou de plusieurs autres composants de la substance médicamenteuse ou du produit fini [1].

L'objectif de la procédure analytique doit être clairement compris, car cela déterminera les caractéristiques de validation qui doivent être évaluées. Les caractéristiques de validation typiques qui doivent être prises en compte sont énumérées ci-dessous :

Spécificité / sélectivité.

Intervalle.

- Réponse.
- Limites inférieures de l'intervalle.

Justesse.

Fidélité.

- Répétabilité.
- Fidélité intermédiaire.

Profil d'exactitude [58].

De plus, d'autres critères plus spécifiques peuvent être requis ; par exemple : la stabilité des solutions, Spécifications et Tests de Conformité du Système [62],…

Tableau 17. Critères de validation selon ICH [1]

Caractéristiques de performance à démontrer de la procédure analytique (2)	Type d'analyse			
	Identification	Impuretés		Dosage Autres mesuresQuantitatives (1)
		Test quantitatif	Test Limite	
Spécificité / sélectivité (3)	+	+	+	+
Intervalle				
Réponse	-	+	-	+
Limite inférieure de l'intervalle	-	LQ	LD	-
Justesse (4)	-	+	-	+
Fidélité (4)				
Répétabilité	-	+	-	+
Fidélité intermédiaire	-	+(5)	-	+(5)

- critère qui n'est normalement pas évalué
+ critère normalement évalué
LD : limite de détection, LQ : limite de quantification
(1) d'autres mesures quantitatives peuvent suivre le schéma pour les impuretés, si la limite du intervalle est proche de la limite de détection/limite de quantification ; d'autres mesures quantitatives peuvent suivre le schéma pour le dosage, si la limite du intervalle n'est pas proche de la limite de détection/limite de quantification
(2) certaines caractéristiques de performance peuvent être remplacées par une justification inhérente à la technologie dans le cas de certaines procédures analytiques pour des propriétés physico-chimiques
(3) le manque de spécificité d'une procédure analytique doit être compensé par une ou plusieurs autres procédures analytiques de soutien, sauf justification appropriée
(4) en alternative, une approche combinée (profil d'exactitude) peut être utilisée pour évaluer la justesse et la fidélité
(5) lorsque la reproductibilité a été réalisée et que la fidélité intermédiaire peut être déduite à partir de l'ensemble de données de reproductibilité, une étude indépendante pour la fidélité intermédiaire n'est pas nécessaire

5. Prévalidation

La validation a comme préalable une étape de prévalidation, parmi les paramètres qui peuvent être réalisés, des essais de vérification de la linéarité de la fonction de réponse et l'absence de l'effet de matrice.

5.1. Linéarité de fonction de réponse

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (Absorbance, aire, volume, poids…) et la concentration (Concentration ou quantité) en substance à examiner dans l'échantillon.

La fonction de réponse monotone (strictement croissante ou décroissante) est la plus simple qui exprime cette relation, elle est appelée « courbe d'étalonnage ».

Il existe deux familles de fonctions, les fonctions dites linéaires (droite) en leurs paramètres et les fonctions non-linéaires liées notamment à certains systèmes de détection ou à l'étendu de l'intervalle de dosage, comme dans le cas des fonctions logistique.

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode, le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bio analytique, immuno-dosage, etc.) [60].

5.2. Vérification de l'effet de matrice

Pour pouvoir préparer les échantillons de gamme et de validation, il est nécessaire d'avoir une idée sur l'interférence de la matrice et de l'effet de matrice.

En général, l'effet de matrice est l'influence du milieu analysé sur l'élément dosé. Cet effet peut conduire à des fortes erreurs par une surestimation ou par un défaut, dans les deux cas ils occasionnent un biais de justesse qui influencera la validation de la méthode [60].

Une représentation graphiquement de l'effet du manque de spécificité en considérant la droite de justesse est proposée. La figure 6 illustre cette droite de justesse selon quatre situations hypothétiques :

- Une parfaite spécificité (pas d'interférence), lorsque la droite est confondue avec la première bissectrice.

- Un effet additif, lorsqu'il y a un décalage systématique des concentrations retrouvées.
- Un effet multiplicatif, lorsque le biais est proportionnel à la concentration.
- Une combinaison des effets.

À savoir X la valeur de référence et Z la concentration retrouvée par étalonnage inverse, ces quatre droites correspondent aux équations suivantes :

- Absence d'effet :$\boldsymbol{Z = X}$
- Effet multiplicatif : $\boldsymbol{Z = b_1 X}$
- Effet additif :$\boldsymbol{Z = b_0 + X}$
- Combinaison des effets :$\boldsymbol{Z = b_0 + b1X}$

Lorsque l'évaluation de l'influence de chaque constituant de la matrice est irréalisable, la méthode des ajouts dosés représente une technique globale de mise en évidence des interférences [60].

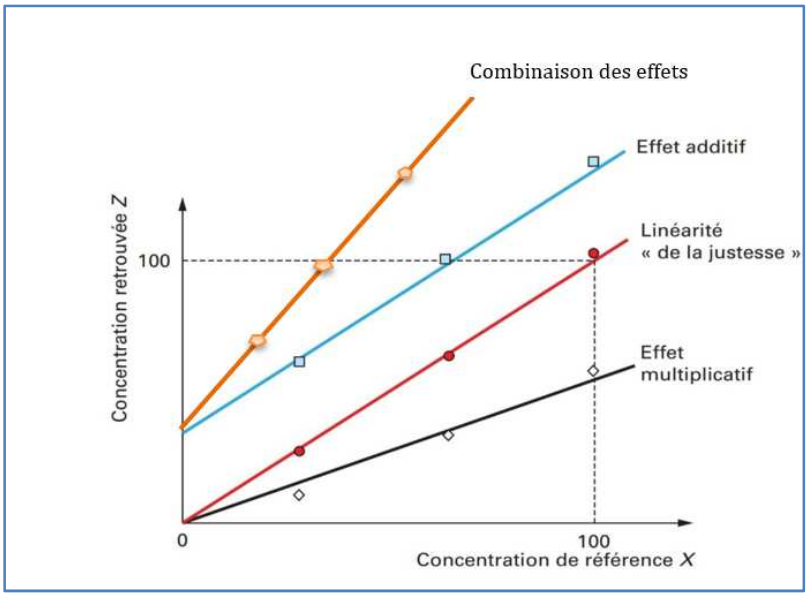


Figure 6. Différents effets de matrice

6. Estimation et évaluation des critères de validation

6.1. Spécificité-sélectivité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à garantir que la réponse provient seulement de la substance à analyser sans interférence, ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substances dans l'échantillon en présence d'autres composants. Elle peut être déterminée en comparant les résultats obtenus avec l'analyte seul et avec l'analyte additionné de substances soupçonnées de provoquer des interférences [63].

Dans le cas particulier des techniques séparatives (HPLC, CPG…), on parle plutôt de sélectivité parce qu'il n'y a pas un seul signal spécifique mais plutôt plusieurs signaux bien séparés [59].

La spécificité peut être démontrée par :

Absence d'interférence

La spécificité/sélectivité peut être démontrée en montrant que l'identification et/ou la quantification d'un analyte ne sont pas impactées par la présence d'autres substances (par exemple, impuretés, produits de dégradation, substances apparentées, matrices ou autres composants susceptibles d'être présents) [1].

Comparaison par une méthode orthogonale

La spécificité/sélectivité peut être vérifiée en démontrant que le résultat mesuré d'un analyte est comparable au résultat mesuré d'une deuxième procédure analytique bien caractérisée qui applique idéalement un principe de mesure différent [1].

Justification inhérente à la technologie

Dans certains cas où la spécificité de la technologie analytique peut être assurée et prédite par des paramètres techniques (par exemple, résolution des isotopes en spectrométrie de masse, déplacements chimiques en spectroscopie RMN, identification par spectrométrie IR) [1].

Pour le(s) test(s) d'impureté par des techniques séparatives, une discrimination appropriée devrait être étudiée à un niveau adapté (par exemple, pour des séparations critiques en chromatographie, la spécificité peut être démontrée par la résolution des deux composants qui éluent le plus près l'un de l'autre). En alternative, les spectres de différents composants pourraient être comparés pour évaluer la possibilité d'interférence [1].

Pour un test de pureté ou d'impureté, la discrimination peut être établie en soumettant le produit à des stress tests ou en l'enrichissant en impuretés ou substances apparentées à des niveaux appropriés, puis en démontrant l'absence d'interférence [1].

Lorsqu'une procédure analytique ne fournit pas une discrimination suffisante, il est recommandé d'utiliser une combinaison de deux procédures ou plus pour obtenir la spécificité/sélectivité nécessaire [1].

6.2. Intervalle

L'intervalle d'une procédure analytique est l'intervalle entre les résultats les plus bas et les plus élevés dans lequel la procédure analytique présente un niveau de réponse, de fidélité et de justesse approprié. Le intervalle peut être validée par l'évaluation directe des résultats déclarables (pour générer un intervalle déclarable) à l'aide d'un modèle d'étalonnage approprié (c'est-à-dire linéaire, non linéaire, multivarié) [1].

L'intervalle déclarable requis est généralement dérivé des spécifications et dépend de l'utilisation prévue de la procédure. Le Tableau 18 illustre les intervalles déclarables recommandés pour des utilisations courantes des procédures analytiques.

Tableau 18. Exemples des intervalles rapportables pour des utilisations courantes des procédures analytiques

Utilisation de la procédure analytique	Limite inférieure de l'intervalle rapportable	Limite supérieure de l'intervalle rapportable
Dosage d'un produit (1)	80 % de la teneur déclarée ou 80 % du critère d'acceptation de spécification inférieure	120 % de la teneur déclarée ou 120 % du critère d'acceptation de spécification supérieure
Puissance	Critère d'acceptation de la spécification le plus bas - 20 %	Critère d'acceptation de la spécification le plus haut + 20 %
Uniformité de la teneur	70 % de la teneur déclarée	130 % de la teneur déclarée
Dissolution : Libération immédiate • un point de spécification • spécification à points multiples Libération modifiée	 Q - 45 % de la plus faible force Limite inférieure de l'intervalle rapportable (comme justifié par la spécification) ou LQ, selon le cas Limite inférieure de l'intervalle rapportable (comme justifié par la spécification) ou LQ, selon le cas	 130 % de la teneur déclarée
Impureté (1)	Limite d'exclusion	120 % du critère d'acceptation de spécification
Pureté (en % d'aire)	80 % du critère d'acceptation de spécification inférieure	Critère d'acceptation de spécification supérieure ou 100 %

- (1) Lorsque le dosage et l'impureté sont effectués en tant que seul test et qu'un seul étalon est utilisé, la linéarité doit être démontrée à la fois pour le niveau de déclaration des impuretés et jusqu'à 120 % du critère d'acceptation de spécification pour le dosage.

6.2.1 Réponse

A. Réponse linéaire

Une relation linéaire entre la concentration de l'analyte et la réponse doit être évaluée sur l'ensemble de l'intervalle de la procédure analytique afin de confirmer la pertinence de la procédure pour l'objectif prévu [1].

Pour évaluer la linéarité lors de la validation, un minimum de cinq concentrations réparties de manière appropriée sur l'ensemble de l'intervalle est recommandé [1].

Les données dérivées de la ligne de régression peuvent contribuer à fournir des estimations mathématiques de la linéarité. Ils doivent être fournis les résultats suivants :

Le graphique des données.

Le coefficient de corrélation ou le coefficient de détermination.

L'ordonnée à l'origine.

La pente de la ligne de régression.

Une analyse de l'écart entre les points de données réels et la ligne de (par exemple, pour une réponse linéaire, l'impact de tout modèle non aléatoire dans le graphique des résidus de l'analyse de régression doit être évalué) [1].

B. Réponse non linéaire

Certaines procédures analytiques peuvent présenter des réponses non linéaires, nécessitant l'utilisation d'un modèle ou d'une fonction pour décrire la relation entre l'activité/concentration et la réponse. La pertinence du modèle doit être évaluée par une analyse de régression non linéaire.

Par exemple, les dosages immunologiques peuvent afficher une réponse en forme de S, modélisée par des fonctions logistiques.

Dans ces cas, la performance de la procédure est évaluée sur les valeurs obtenues et calculées dans le intervalle donnée, assurant ainsi une proportionnalité avec les valeurs réelles de l'échantillon [1].

C. Calibration multivariée

Elle peut utiliser des algorithmes linéaires ou non linéaires, en fonction de la pertinence du modèle pour établir la relation entre le signal et l'attribut de qualité.

La précision dépend de facteurs tels que la distribution des échantillons de calibration et l'erreur de la procédure analytique de référence. Les données mesurées en analyse multivariée sont souvent prétraitées.

L'évaluation de la linéarité doit inclure la variation des résidus de la procédure analytique sur tout l'intervalle de calibration, pouvant être visualisée à l'aide de graphiques.

6.2.2. Validation des limites inférieures de l'intervalle

La Limite de détection (LD) correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte [58].

La Limite de quantification (LQ) correspond à la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie [58].

Si l'attribut de qualité à mesurer nécessite que le intervalle d'une procédure analytique soit proche des limites inférieures de la procédure, la limite de détection (DL) et la limite de quantification (QL) peuvent être estimées en utilisant les approches suivantes :

- Basé sur l'Évaluation Visuelle.
- Basé sur le Rapport Signal/Bruit.
- Basé sur l'Écart-Type d'une Réponse Linéaire et d'une Pente.
- Basé sur la Précision et l'Exactitude aux Limites Inférieures de l'Intervalle.

L'approche basée sur le Rapport Signal/Bruit est pertinente pour les procédures analytiques présentant du bruit de fond (HPLC, GC,…). La détermination du rapport signal/bruit est effectuée en comparant les signaux mesurés à partir d'échantillons avec des concentrations connues d'analyte à ceux des blancs [64]. Alternativement, les signaux dans une région de fond appropriée peuvent être utilisés à la place des blancs.

LD (limite de détection) ou LQ (limite de quantification) sont les concentrations minimales à partir desquelles l'analyte peut être détecté ou quantifié de manière fiable, respectivement.

Un rapport signal/bruit de 3:1 est généralement considéré comme acceptable pour estimer la LD.

Pour la LQ, un rapport d'au moins 10:1 est considéré comme acceptable.

Le rapport signal/bruit doit être déterminé dans une région définie et, si possible, situé de manière égale autour de l'endroit où le pic d'intérêt serait trouvé.

Pour les tests d'impuretés, la limite de quantification (LQ) de la procédure analytique doit être égale ou inférieure à la limite d'exclusion.

6.3. Justesse et Fidélité

La Justesse et la Fidélité peuvent être évaluées de manière indépendante, chacune avec un critère d'acceptation prédéfini. Alternativement, la Justesse et la Fidélité peuvent être évaluées en combinaison (profile d'exactitude) [1].

6.3.1. Justesse ou biais

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée [59].

La justesse doit être établie sur l'ensemble du intervalle rapportable d'une procédure analytique [1].

La justesse dans une procédure analytique peut être évaluée de plusieurs manières. La comparaison avec un matériau de référence, une étude d'enrichissement et la comparaison avec une procédure orthogonale sont des approches couramment utilisées. Ces méthodes impliquent l'application de la procédure analytique à des échantillons de référence, à des échantillons enrichis ou à une procédure alternative. Les résultats obtenus sont ensuite comparés aux valeurs théoriques ou aux résultats d'une procédure orthogonale pour évaluer la justesse de la méthode analytique [1].

La justesse doit être démontrée dans des conditions d'essai régulières de la procédure analytique (par exemple, en présence de la matrice d'échantillon et en utilisant les étapes de préparation d'échantillon décrites).

La justesse doit être évaluée en utilisant un nombre approprié de déterminations et de niveaux de concentration couvrant le intervalle déclaré (par exemple, 3 concentrations/3 réplicats pour l'ensemble de la procédure analytique) [1].

La justesse (ou le biais) est obtenue en calculant la différence entre la moyenne des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites:

$\mathbf{biais_j} = \hat{\mu}_j - \bar{x}_{.j.}$	$\mathbf{biais}\ (\%)_j = 100 . \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_{.j.}}{\bar{x}_{.j.}}$	$\mathbf{Recouvrement}\ (\%)_j = 100 . \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_{.j.}}$

$\hat{\mu}_j$ **:** La moyenne des concentrations calculées.

$\bar{x}_{.j.}$ **:** La concentration de référence.

6.3.2. Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) et la reproductibilité (inter-laboratoire) [59].

La fidélité doit être étudiée en utilisant des échantillons homogènes authentiques ou, en leur absence, des échantillons préparés artificiellement (par exemple, des mélanges matriciels dopés ou des échantillons enrichis avec des quantités pertinentes de l'analyte en question).

A. Répétabilité

La répétabilité doit être évaluée en utilisant :

- un minimum de 9 déterminations couvrant l'intervalle rapportable de la procédure (par exemple, 3 concentrations/3 répétitions chacune)
- un minimum de 6 déterminations à 100 % de la concentration d'essai [1].

B. Fidélité intermédiaire

L'étendue à laquelle la précision intermédiaire doit être établie dépend des circonstances dans lesquelles la procédure est destinée à être utilisée. Les effets des événements aléatoires sur la précision de la procédure analytique doivent être établis.

Les variations typiques à étudier comprennent différents jours, conditions environnementales, analystes et équipements [1].

C. Reproductibilité

La reproductibilité est évaluée au moyen d'un essai inter-laboratoires. Une investigation de la reproductibilité n'est généralement pas nécessaire pour une soumission réglementaire, mais elle devrait être envisagée dans le cas de la normalisation d'une procédure analytique, par exemple, pour l'inclusion de procédures dans les pharmacopées et dans les cas où les procédures analytiques sont réalisées sur plusieurs sites [1].

La fidélité d'une procédure analytique est exprimée par la variance, l'écart-type et l'écart-type relatif RSD (coefficient de variation).

Les composantes de la variance les paramètres $\sigma^2_{B,j}$ (variances inter-jour) et $\sigma^2_{W,j}$(variances intra-jour) à chaque niveau de concentration j sont estimées par La méthode du maximum de vraisemblance restreint [60] comme suit :

$$\mathbf{MSM_j} = \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{p-1}}\sum_{\mathbf{i=1}}^{\mathbf{p}} \mathbf{n_{ij}}\left(\bar{\mathbf{x}}_{\mathbf{ij.,calc}} - \bar{\mathbf{x}}_{\mathbf{j.,calc}}\right)^{\mathbf{2}}$$

$$\mathbf{MSE_j} = \frac{\mathbf{1}}{\sum_{\mathbf{i=1}}^{\mathbf{p}} \mathbf{n_{ij}} - \mathbf{p}}\sum_{\mathbf{i=1}}^{\mathbf{p}}\sum_{\mathbf{k=1}}^{\mathbf{n_{ij}}}\left(\mathbf{x_{ijk,calc}} - \bar{\mathbf{x}}_{\mathbf{ij.,calc}}\right)^{\mathbf{2}}$$

Si $MSE_j < MSM_j$, alors [60]:

$$\widehat{\sigma}^2_{w,j} = \mathbf{MSE_j} \quad \text{et} \quad \widehat{\sigma}^2_{B,j} = \frac{\mathbf{MSM_j - MSE_j}}{\mathbf{n}}$$

Sinon :

$$\widehat{\sigma}^2_{w,j} = \frac{1}{pn-1}\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{k}\left(x_{ijk,calc} - \bar{x}_{.j.,calc}\right)^2 \quad \text{et} \quad \widehat{\sigma}^2_{B,j} = 0$$

$$\widehat{\sigma}^2_{Re,j} = \widehat{\sigma}^2_{W,j}$$

Variance de répétabilité :

Variance de fidélité intermédiaire : $\widehat{\sigma}^2_{F.I.,j} = \widehat{\sigma}^2_{W,j} + \widehat{\sigma}^2_{B,j}$

- i : Indice représentant la série.
- j : Indice représentant le niveau de la concentration.
- k : Indice représentant le nombre des niveaux de concentration.
- calc : Indice représentant les concentrations calculées.
- n : Nombre de répétition dans chaque série.
- p : Nombre de séries.
- MSM (mean square model) : Somme des carrés du modèle.
- MSE (mean square error) : Somme des carrés de l'erreur résiduelle. C'est la variation attribuée à l'erreur.

6.3.3. Profil d'exactitude

Une alternative à l'évaluation séparée de la justesse et de la fidélité consiste à considérer leur impact total en les évaluant par rapport à un critère de performance combiné [1].

La justesse et la fidélité combinées peuvent être évaluées à l'aide d'un intervalle de prédiction, d'un intervalle de tolérance ou d'un intervalle de confiance [1].

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les limites inférieures Lj entre elles et d'autre part les limites supérieures Uj entre elles. Les limites sont calculées comme suit :

Les limites inférieures [60]:

$$\mathbf{L_j = biais(\%)_j - Q_t\left(\nu\,;\,\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{p\,n\,B_j^2}}\,CV_{F.I.,j}}$$

Les limites supérieures [60]:

$$\mathbf{U_j = biais(\%)_j + Q_t\left(\nu\,;\,\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{p\,n\,B_j^2}}\,CV_{F.I.,j}}$$

$$\mathbf{R_j = \frac{\widehat{\sigma}^2_{B,j}}{\widehat{\sigma}^2_{W,j}}}$$

$$\mathbf{\nu = \frac{(R+1)^2}{\frac{\left(R+\frac{1}{n}\right)^2}{p-1}+\frac{1-\frac{1}{n}}{p\,n}}}$$

$$\mathbf{B_j = \sqrt{\frac{R_j+1}{n\,R_j+1}}}$$

Q_t : est le quantile β de la distribution t de Student à ν degrés de liberté.

$$\mathbf{Q_t\left(\nu\,;\,\frac{1+\beta}{2}\right)}$$

Le profil d'exactitude est un outil visuel permettant d'évaluer la procédure analytique. La méthode peut être considérée comme exacte au niveau de chance β pour un niveau de concentration donné, si l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites d'acceptation (-λ%, + λ%) [65].

La limite d'acceptation (λ) peut être variable selon l'objectif de la procédure d'analyse, laquelle est liée aux exigences communément admises par la pratique professionnelle (par exemple : 1 ou 2% sur des matières premières, 5% sur des spécialités pharmaceutiques, 15% en bioanalyse, environnement, etc.) [61].

6.4. Stabilité

La stabilité de la substance à analyser doit être testée pendant la phase de développement et confirmée au terme de la validation de la procédure de dosage puisqu'elle conditionne la validité des autres critères [59].

Stabilité de la solution de la substance d'intérêt après préparation conformément à la méthode d'essai doit être évaluée selon ladite méthode. La plupart des laboratoires utilisent des échantillonneurs automatiques avec des cycles de nuit, et l'échantillon restera en solution pendant plusieurs heures dans l'environnement du laboratoire avant que la procédure d'essai ne soit terminée. Cela est particulièrement préoccupant pour les médicaments susceptibles de subir une dégradation par hydrolyse, photolyse ou adhérence aux verreries [62].

6.5. Spécifications et Tests de Conformité du Système

L'exactitude et la précision des données HPLC collectées dépendent d'un système chromatographique bien maîtrisé. Les spécifications et les tests de conformité du système sont des paramètres essentiels pour atteindre cet objectif [62].

Les tests de conformité du système sont cruciaux pour garantir la performance de qualité du système chromatographique. La quantité de tests requise dépend de l'objectif de la méthode d'essai. Généralement, Le système de conformité inclut le ou les tests suivants :

- Répétabilité des injections.
- Résolution.
- Facteur de symétrie.
- Sensibilité de la détection.

En pratique, chaque méthode soumise à la validation devrait inclure un nombre approprié des tests de conformité du système définissant les caractéristiques nécessaires de ce dernier.

7. Analyse statistique et modèles

7.1. Statistiques

L'analyse statistique des données de validation peut être utilisée pour évaluer les caractéristiques de validation par rapport à des critères d'acceptation prédéterminés. Toutes les procédures statistiques et paramètres utilisés dans l'analyse des données doivent être basés sur des principes solides et appropriés pour l'évaluation prévue. Plusieurs méthodes statistiques sont utiles pour évaluer les caractéristiques de validation, par exemple, une analyse de variance (ANOVA) pour évaluer la régression R (coefficient de corrélation) et R au carré (coefficient de détermination) ou une régression linéaire pour mesurer la linéarité. De nombreuses méthodes statistiques utilisées pour évaluer les caractéristiques de validation reposent sur la normalité de la population, et il est important de déterminer s'il faut rejeter ou non cette hypothèse. Il existe de nombreuses techniques, telles que les histogrammes, les tests de normalité et les diagrammes de probabilité, qui peuvent être utilisées pour évaluer la distribution observée. Il peut être approprié de transformer les données pour mieux ajuster la distribution normale ou d'appliquer des approches sans distribution (non paramétriques) lorsque les données observées ne suivent pas une distribution normale. Il convient de consulter la littérature ou des ouvrages spécialisés pour obtenir des informations sur les procédures statistiques à utiliser lors du développement de nouvelles méthodes d'essai, de l'évaluation de méthodes d'essai existantes ou de l'évaluation de la performance du système de mesure, ainsi que d'autres informations générales sur l'interprétation et le traitement des données analytiques. L'analyse des données doit être assurée soit en utilisant un logiciel dûment validé, soit par une vérification indépendante de la correction [5].

7.2. Modèles

Certaines méthodes analytiques peuvent utiliser des modèles chimiométriques et/ou multivariés. Lors du développement de ces modèles, le nombre d'échantillons pour fournir une puissance statistique adéquate et une plage pour le développement et la validation du modèle devrait être pris en compte. Un logiciel approprié devrait être utilisé pour l'analyse des données. Les paramètres du modèle devraient être délibérément variés pour tester la robustesse du modèle [5].

8. Revalidation des méthodes analytiques

Au cours de l'utilisation en routine de la méthode analytique, certains essais documentés doivent être effectués lorsque des changements sont apportés au matériel ou aux conditions d'analyse, ou lorsque le produit pharmaceutique ou la substance à analyser sont modifiés.

Toute modification de réglage (changement de colonne, modification de la phase mobile…etc.) est considérée comme mineure, tandis qu'une modification affectant le principe de la méthode (remplacement d'un détecteur UV-visible, changement qualitatif du type de phase mobile…etc.) est considérée comme majeure. Dans ce dernier cas, une procédure de validation complète devra de nouveau être appliquée [66].

CHAPITRE 3.
ETUDES DE STABILITE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES

La stabilité joue un rôle crucial dans le processus de développement de médicaments. Elle explique plusieurs facteurs qui influent sur la date de péremption des produits pharmaceutiques, notamment la stabilité chimique et physique pendant les étapes de formulation préclinique, le développement du processus de fabrication, le développement du conditionnement et la durée de vie après la commercialisation.

La stabilité pharmaceutique peut être appliquée de plusieurs manières ; par conséquent, la performance d'un médicament sera évaluée en fonction de la substance active, de la formulation, du produit médicamenteux ou du produit conditionné.

1. Types d'études de stabilité

Les études de stabilité sont utilisées pour fournir des données en soutien aux essais cliniques, aux soumissions d'enregistrement ou à la commercialisation. Il existe différents types d'études de stabilité pendant le processus de développement de médicaments [67].

1.1. Étude formelle de stabilité

Dans l'ensemble, les tests de stabilité formelle revêtent une importance cruciale pour déterminer la durée de conservation et les conditions de stockage d'un nouveau produit pharmaceutique. Ils assurent également la vérification qu'aucun changement susceptible d'affecter la stabilité du produit n'a été introduit dans la formulation ou le processus de fabrication.

Ces tests sont une obligation légale, nécessitant la fourniture de données spécifiques aux organismes de réglementation avant l'approbation d'un nouveau produit.

Les types de tests de stabilité sont regroupés en trois catégories distinctes :

1.1.1. Test de stabilité accéléré

Ces tests, menés sur une période généralement courte de six mois, sont réalisés dans des conditions de stockage exagérées, avec une température de 40°C ± 2 et une humidité relative de 75% ± 5. Les données obtenues dans cette étude permettent d'extrapoler une durée de conservation prévue dans des conditions d'entreposage sur le marché.

1.1.2. Test sous conditions intermédiaires

Ces études interviennent en cas de changements significatifs observés lors des études accélérées et lorsque les études en temps réel sont menées à 25°C ± 2 ; 60%HR ± 5. Ces tests, menés sur une période généralement courte de six mois, sont réalisés dans des conditions de stockage modérément exagérées, avec une température de 30°C ± 2 et une humidité relative de 65% ± 5.Elles visent à augmenter modérément la vitesse de dégradation chimique ou d'altération physique d'un produit médicamenteux destiné à être entreposé pendant une longue période sous 25°C.

1.1.3. Test de stabilité de longue durée (en temps réel)

Les tests de stabilité en temps réel sont habituellement effectués sur une durée plus longue et dans des conditions de stockage moins rigoureuses (température et humidité légèrement élevées), évaluant ainsi la stabilité du produit dans les conditions recommandées de stockage.

Le protocole d'étude de stabilité comprend plusieurs étapes cruciales :

Sélection des lots

Les études de stabilité sont réalisées sur au minimum 3 lots primaires.

Les lots primaires doivent être de la même formulation et présentés dans un emballage identique à celui proposé pour la commercialisation. Le procédé de fabrication des lots primaires doit simuler celui qui sera employé pour les lots de production à grand échelle. Le procédé doit fournir un produit qui est de même qualité et qui répond aux mêmes spécifications que les lots de commercialisation.

Deux des trois lots doivent être au moins à l'échelle pilote. Le troisième lot peut être plus petit (à l'échelle laboratoire), dans certaines circonstances.

Dispositif de conditionnement

Les études de stabilité doivent être réalisées sur la substance active présentée dans un conditionnement identique ou similaire à celui proposé pour le stockage et la distribution.

Spécifications

Les spécifications, qui sont une liste de tests, de références à des procédures analytiques et de critères d'acceptation appropriés qui sont des limites numériques, des gammes ou d'autres

critères pour les tests décrits. Elle établit l'ensemble des critères auxquels une nouvelle substance active ou un nouveau produit pharmaceutique doit se conformer pour être considéré comme acceptable pour son utilisation prévue.

Les études de stabilité doivent comprendre l'évaluation des caractéristiques du produit médicamenteux susceptibles de changer pendant l'entreposage et d'influer sur la qualité, l'innocuité et/ou l'efficacité. Les études doivent porter, selon le cas, sur les caractéristiques physiques, chimiques, et microbiologiques. On doit utiliser des méthodes d'évaluation de la stabilité qui sont validées.

Fréquence des essais

Tableau 19. Fréquence des essais des études de stabilité

Étude	**La fréquence des essais**	
Longue durée	**La première année**	Trimestriellement (chaque 3 mois)
	La deuxième année	Semestriellement (chaque 6 mois)
	Au-delà	Annuellement (chaque année)
Intermédiaire	0,3 et 6 mois	
Accélérée	0,3 et 6 mois	

Conditions d'entreposage

Tableau 20. Cas général des conditions d'entreposage

Etude	**Condition de stockage**	**Période minimale avant enregistrement**
Longue durée*	25°C ± 2°C et 60 ± 5% HR ou 30 T° ± 2°C et 65 ± 5% HR	12 mois
Intermédiaire**	30° ± 2°C et 65 ± 5% HR	06 mois
Accélérée	40° ± 2°C et 75 ± 5% HR	06 mois

* Il incombe au demandeur de décider si les études de stabilité à long terme sont effectuées à 25 /C ± 2 /C/60 % HR ± 5 % HR ou 30 /C ± 2 /C/65 % HR ± 5 % HR.
** Si les conditions de longue durée sont de 30 /C ± 2 /C/65 % HR ± 5 % HR, il n'y a pas de conditions intermédiaires

Tableau 21. Conditions d'entreposage des produits médicamenteux devant être entreposés au réfrigérateur

Etude	Condition de stockage	Période minimale avant enregistrement
Longue durée*	5 °C ± 3 °C	12 mois
Accélérée	25 °C ± 2 °C/60 % HR ± 5 % HR	06 mois

Tableau 22. Conditions d'entreposage des produits médicamenteux devant être entreposés au congélateur

Etude	Condition de stockage	Période minimale avant enregistrement
Longue durée*	-20°C ± 5°C	12 mois

Recommandation et étiquetage

La recommandation relative aux températures d'entreposage devant figurer sur l'étiquette doit être rédigée conformément aux exigences nationales et régionales pertinentes. Elle doit reposer sur l'évaluation de la stabilité du produit médicamenteux. Dans certains cas, par exemple lorsqu'il s'agit de produits médicamenteux qui ne résistent pas à la congélation, il faut présenter les exigences spécifiques. L'emploi de termes comme « conditions ambiantes » ou « température de la pièce » doit être évité [17].

1.2. Étude de stabilité post-approbation

Après l'approbation du produit médicamenteux, des études de stabilité sont poursuivies pour soutenir la commercialisation du produit. Des lots représentatifs sont placés en station de stabilité pour le programme de suivi de la stabilité (Ongoing stability).

De plus, des études post-approbation seraient également nécessaires en cas de changement du processus de fabrication ou de conditionnement du produit médicamenteux (Post-approval changes).

1.2.1. Programme de suivi de la stabilité

Selon le Chapitre 6 des Bonnes Pratiques de Fabrication de l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM), une surveillance continue de la stabilité des médicaments est nécessaire après leur commercialisation.

Ce programme de suivi vise à détecter tout problème de stabilité, tel qu'un changement dans le taux des impuretés ou dans le profil de dissolution, lié à la formulation finale du produit. L'objectif est de surveiller le produit tout au long de sa durée de validité et de déterminer s'il reste conforme aux spécifications définies dans les conditions de stockage indiquées sur l'étiquetage.

La procédure du programme de surveillance de la stabilité peut différer de celle de l'étude de stabilité formelle à long terme déposée dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché, par exemple, cela peut concerner la fréquence des contrôles.

Il est essentiel que le nombre de lots et la fréquence des contrôles soient suffisants pour fournir des données en quantité adéquate afin de permettre une analyse de tendance.

Le programme d'études de stabilité doit inclure au moins un lot par an pour chaque produit fabriqué, chaque dosage et chaque type de conditionnement primaire pertinent, sauf justification d'une exception.

Dans certains cas, des lots supplémentaires doivent être inclus, notamment après tout changement significatif du procédé de fabrication ou du conditionnement, ainsi qu'après tout retraitement ou opération de récupération de produit [68].

Les résultats hors spécifications ou les tendances anormales significatives doivent faire l'objet d'une enquête. Tout résultat hors spécification confirmé ou toute dérive significative affectant les lots de produits libérés sur le marché doit être rapporté à l'autorité compétente. L'impact éventuel sur les lots mis sur le marché doit être examiné en consultation avec les autorités compétentes [68].

1.2.2. Changements post-approbation

Il existe de nombreuses raisons de procéder à des changements sur les produits pharmaceutiques après l'obtention de l'approbation réglementaire initiale. Certaines de ces modifications peuvent être importantes, nécessitant une quantité substantielle de données de

stabilité, tandis que d'autres sont mineures et peuvent seulement nécessiter un engagement en matière de stabilité. Les procédures de contrôle des changements de l'entreprise devraient détailler la façon dont les modifications sont évaluées et mises en œuvre, ainsi que l'impact sur la stabilité et les données nécessaires pour soutenir le changement [3].

Dans le cadre de ce travail, seul le scénario des modifications des spécifications et des méthodes analytiques sera abordé.

Modifications des spécifications et des méthodes analytiques

Les avancées dans la technologie analytique rendent les tests plus précis et sensibles, permettant de détecter des niveaux encore plus bas d'impuretés et de produits de dégradation. Les avancées dans les technologies des équipements utilisés pour l'analyse contribuent à des méthodes plus efficaces et à la détection de nouvelles impuretés ou produits de dégradation, pouvant nécessiter des spécifications ou des mesures quantitatives spécifiques.

Il existe de nombreuses raisons de proposer une modification des spécifications d'un produit ou d'un principe actif (limite) et/ou d'une méthode analytique. En ce qui concerne ces modifications, des exemples comprennent l'ajout d'une limite pour un produit de dégradation nouvellement découvert, une augmentation de la limite pour un produit de dégradation spécifié, une modification d'une ou de plusieurs limites de dissolution (plages) pour un produit à libération prolongée, et une augmentation de la plage de pH pour un produit liquide.

En cas de modification de la méthode analytique, l'impact sur les études de stabilité devra être évalué. Il sera probablement nécessaire d'obtenir des résultats de recoupement, et une décision quant à la méthode à utiliser pour les programmes de suivie de la stabilité devra être prise. Cette décision dépendra de la nature de la modification et de la stratégie de mise en œuvre. Si la modification représente une amélioration significative de la qualité, la mise en œuvre devrait être immédiate une fois que la validation appropriée et la corrélation entre les méthodes sont complètes. Cependant, la modification devra être soumise aux autorités réglementaires et en fonction du type de soumission, l'ancienne et la nouvelle méthode pourraient devoir être utilisées jusqu'à l'approbation de la nouvelle méthode [69].

2. Evaluation des données de stabilité

2.1. Estimation des durées de vie

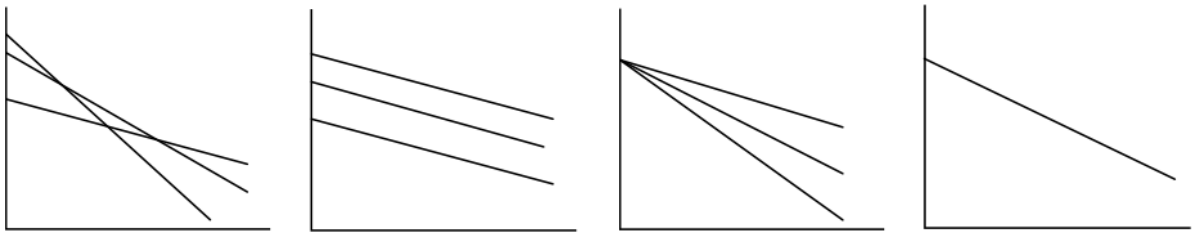
Dans le cas des produits ou substances actives devant être stockés à la température ambiante, l'évaluation de chaque caractéristique doit être réalisée de manière séquentielle. Il est nécessaire de commencer par évaluer tout changement significatif observé dans des conditions accélérées (de 6 mois) et, le cas échéant, dans des conditions intermédiaires. Ensuite, il convient de se concentrer sur les tendances et la variabilité des données à long terme (de 12 mois). Il est ensuite possible de déterminer les circonstances dans lesquelles une extrapolation de la durée de conservation au-delà de la période couverte par les données à long terme peut être approprié (Figure 8).

Un «**changement significatif** » se définit comme :

- Baisse de 5% de la teneur en principe actif par rapport à la valeur initiale.
- Présence de tout produit de dégradation spécifié en quantité supérieure aux spécifications.
- PH en dehors des limites spécifiées.
- Vitesse de dissolution de 12 comprimés ou gélules inférieure aux limites spécifiées.
- Spécifications relatives à l'apparence et aux propriétés physiques (ex : couleur, séparation des phases, prise en masse, dureté, etc.) non respectées.

L'ICH Q1E [34] propose des directives visant à évaluer la stabilité des substances et produits pharmaceutiques, mettant particulièrement l'accent sur l'utilisation de méthodes statistiques telles que l'ANCOVA et la régression linéaire.

L'objectif principal est d'établir des principes pour déterminer la durée de conservation des produits. L'ANCOVA, technique statistique, permet d'analyser l'impact des covariables, comme le lot, sur les paramètres de stabilité, offrant ainsi une évaluation précise. Cette approche offre une évaluation précise en testant la mise en commun des données provenant des trois lots soumis à l'étude de stabilité, avec plusieurs scénarios possibles (Figure 7). La régression linéaire modélise la dégradation au fil du temps et prédit la stabilité dans diverses conditions.



Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3	Modèle 4
Intercepts différents	Intercepts différents	Intercept commun	Intercept commun
Pentes différentes	Pente commune	Pentes différentes	Pente commune

Figure 7. Les quatre modèles de régression [70]

Ces méthodes aident à évaluer les tendances, à identifier les modèles de dégradation et à faire des prédictions. La prise en compte des covariables, notamment le lot, est essentiel pour ajuster les données de stabilité.

L'ICH Q1E souligne l'importance d'une évaluation complète des risques, et les outils statistiques contribuent à comprendre et à atténuer les risques liés à la stabilité. Les résultats obtenus par ces analyses guident les prises de décision éclairées sur la durée de conservation et les conditions de stockage. En assurant la conformité aux attentes réglementaires, l'implémentation de méthodes statistiques appropriées soutient les soumissions aux autorités sanitaires [34,70,71].

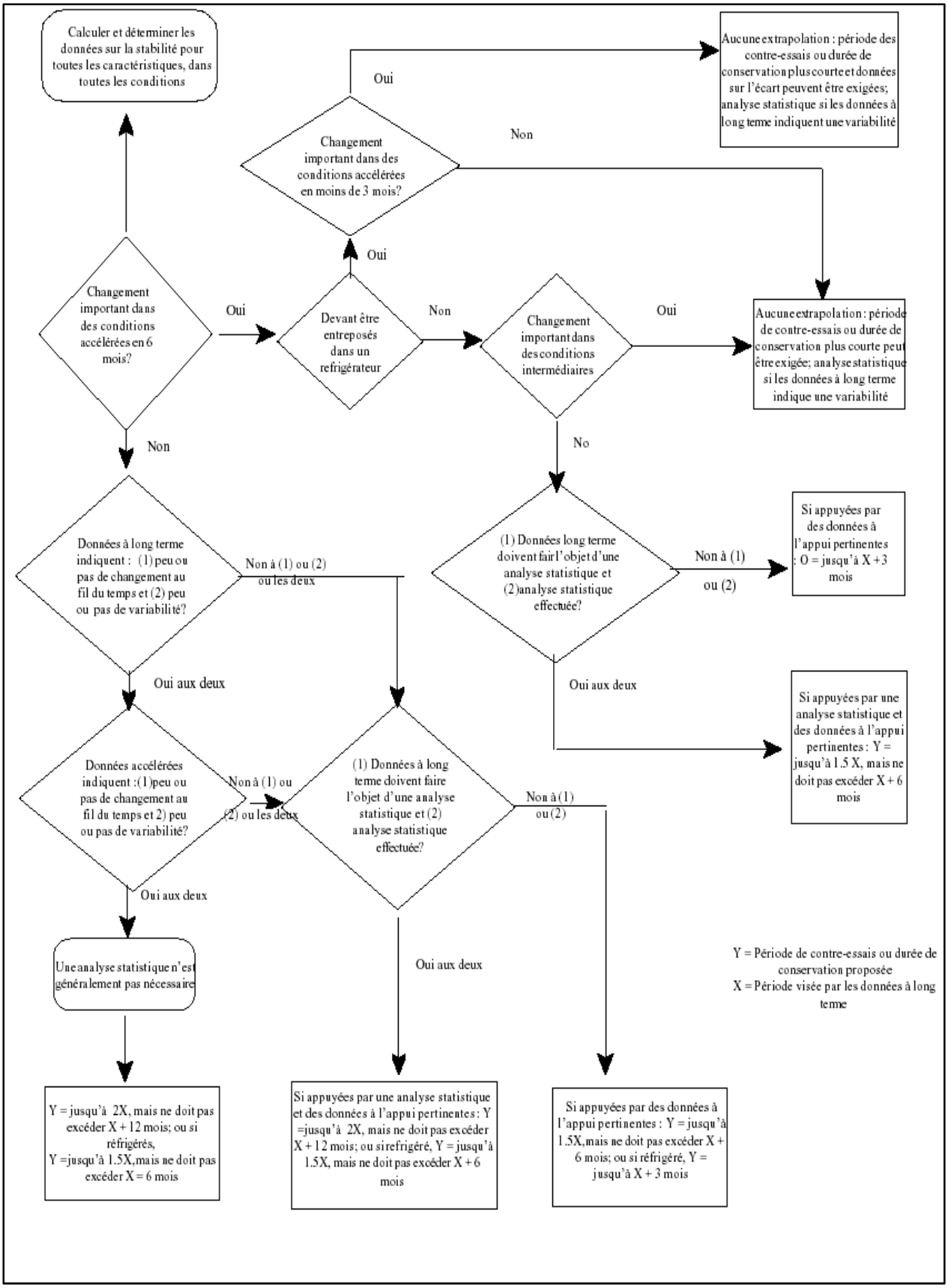


Figure 8. Arbre de décision pour l'évaluation des données pour l'estimation de la durée de conservation des produits finis [34]

2.2. Etablissement des spécifications à libération

La fabrication pharmaceutique requiert une expertise diversifiée. Formuler un médicament assurant qualité, efficacité et sécurité tout au long de sa durée de conservation est essentiel.

Pour les attributs qui sont censés changer pendant la durée de conservation, l'établissement de limites plus strictes que les spécifications réglementaires, appelées spécifications à libération, devient nécessaire dans le cadre d'une stratégie globale d'assurance qualité [72].

Ces limites à libération sont recommandées même pour les attributs stables, car la variabilité de la méthode analytique pourrait entraîner un résultat hors spécification (OOS) ultérieur, si le résultat de libération est proche de la spécification [72].

Selon American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Open (2017) « Limite à libération représente une plage de norme à l'intérieur de laquelle un lot individuel peut être autorisé à la commercialisation, assurant qu'il demeurera conforme aux spécifications enregistrées pendant toute sa durée de conservation» [73].

Les spécifications contenues dans les monographies des produit fini des pharmacopées sont applicables pendant toute la durée de conservation (spécifications à péremption).

L'établissement des spécifications à libération est la responsabilité du fabricant.

Contexte réglementaire

L'harmonisation des spécifications de libération et de péremption, un élément clé de l'ICH Q6A, présente des divergences significatives entre les pratiques réglementaires de différents pays.

Au Japon et aux États-Unis, ce concept peut uniquement s'appliquer aux critères internes et non aux spécifications réglementaires. Ainsi, dans ces régions, les critères d'acceptation réglementaires demeurent les mêmes de la libération jusqu'à la fin de la durée de conservation. Cependant, un demandeur peut choisir d'avoir des limites internes plus strictes au moment de la libération pour offrir une assurance accrue au fabricant que le produit restera conforme au critère d'acceptation réglementaire tout au long de sa durée de conservation. Dans l'Union européenne (Annexe 3), il existe une exigence réglementaire pour des spécifications distinctes à la libération et à péremption lorsque celles-ci diffèrent [32].

Évaluation des risques

L'établissement des spécifications de libération dans l'industrie pharmaceutique est une étape critique du processus de mise sur le marché des produits. Ces spécifications définissent les critères et les limites qui doivent être respectés pour qu'un lot de produit puisse être libéré sur le marché. Cependant, cette étape comporte des risques qu'il est essentiel de prendre en compte.

D'une part, des spécifications de libération trop strictes peuvent entraîner une augmentation du nombre de lots rejetés lors de la libération. Cela pose un risque important pour le producteur, car le rejet de lots signifie des coûts supplémentaires, des retards potentiels dans la mise sur le marché et une pression accrue sur la production. Ces conséquences peuvent affecter la rentabilité globale de l'entreprise pharmaceutique [74].

D'autre part, des spécifications de libération excessivement permissives présentent un risque significatif pour le consommateur. Si les critères de libération ne sont pas suffisamment rigoureux, cela peut conduire à la mise sur le marché de produits qui ne répondent pas aux normes de qualité requises surtout vers la fin de leur durée de vie. Cela peut avoir des conséquences graves sur la sécurité des patients et la réputation de l'entreprise [74].

Calcul spécifications à libération

Plusieurs considérations doivent être prises en compte pour définir des limites à libération appropriées :

- La variabilité de la valeur estimée de l'attribut par la méthode analytique (précision de la méthode) [75].
- Le taux de changement de l’attribut et l'incertitude liée à son estimation (l’étude de stabilité réglementaire) [75].

La spécification à libération d’un dosage d’une impureté dans un produit fini, qui augmente au fil du temps, est calculée par la formule suivante [72,74] :

$$URL = USL - bT - t_{(0{,}95\,,df)}\sqrt{(SE(b).T)^2 + \frac{S^2}{n}}$$

La spécification à libération d'un dosage d'une impureté dans un produit fini, qui ne change pas au fil du temps, est calculée par la formule suivante [72,74] :

$$URL = USL - t_{(0,95\ ,df)}\sqrt{\frac{S^2}{n}}$$

- USL : Spécification réglementaire supérieur.
- URL : Spécification à libration supérieur.
- T : Durée de conservation.
- bT : Augmentation totale due à l'impureté pendant la durée de conservation.
- SE(b).T : Erreur-type associée à l'augmentation totale due à l'impureté bT.
- S^2 : Variance de la précision de la méthode analytique utilisée pour estimer l'attribut.
- n : Nombre d'échantillons testés lors de la libération.
- $t_{(0.95,df)}$: 95% quantile d'une distribution t avec df degrés de liberté.

En conclusion, l'application des spécifications à libération au moment de la libération est nécessaire pour assurer à un niveau de confiance élevé que les résultats moyens des essais obtenus à tout moment ultérieur au cours de la durée de conservation resteront dans les spécifications réglementaires.

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE 1. PRESENTATION DU PRODUIT, EQUIPEMENTS, ET REACTIFS

I. Présentation du produit

1. Produit fini

L'information médicale présentée dans cette section est issue du résumé des caractéristiques du produit, TOPLEXIL, 0,33 mg/ml, sirop (Annexe 4).

DENOMINATION DU MEDICAMENT

OXOMEMAZINE 0,33 mg/ml, sirop

2. Substance active

2.1. Caractéristiques générales

Les principales caractéristiques de l'OXOMEMAZINE HCL et l'OXOMEMAZINE BASE sont présentées dans les tableaux 23 et 24 respectivement.

Tableau 23. Caractéristiques générales de l'Oxomémazine HCl

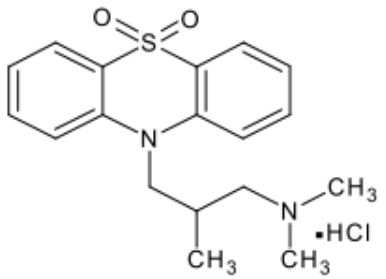
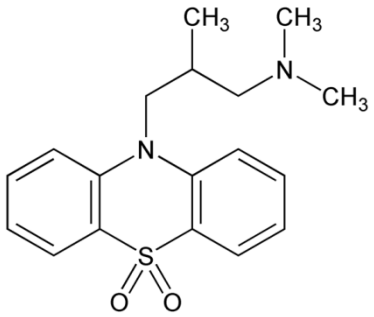
DCI	OXOMEMAZINE HCL
Structure	
Nom chimique	3-(5,5-Dioxido-10H-phenothiazin-10-yl)-N,N,2- trimethylpropan-1-amine hydrochloride [76]
Formule empirique	$C_{18}H_{23}ClN_2O_2S$ [76]
Masse moléculaire	366.9 g/mol [76]
Numéro C.A.S	4784-40-1 [76]
Description	Poudre blanche
Solubilité	Soluble dans l'eau [76]
Point de fusion	250°C à 255°C

Tableau 24. Caractéristiques générales de l'Oxomémazine base

DCI	OXOMEMAZINE BASE
Structure	 [77]
Nom chimique	10-[3-(dimethylamino)-2-methylpropyl]-10H-5lambda6-phenothiazine-5,5-dione [78]
Formule empirique	$C_{18}H_{22}N_2O_2S$ [77,78]
Masse moléculaire	330.45 g/mol [77,78]
Numéro C.A.S	3689-50-7 [78]
Solubilité	0.0856 mg/mL (dans l'eau) [78]
logP	2.81 (ALOGPS) [78]
logP	3.18 (Chemaxon) [78]
pKa	8.02 (Chemaxon) [78]

2.2. Schéma de synthèse

II. Equipements et réactifs

1. Equipements

- Chromatographe liquide Nexera lite de Shimadzu :
  - Dégazeur en ligne sous vide
  - Pompe avec dispositif de gradient à basse pression
  - Injecteur automatique
  - Four ajustable jusqu'à 85 °C
  - Détecteur à barette de photodiode (DAD) couvrant la plage spectrale de 190 à 900 nm
  - Système piloté par le logiciel Labsolution
- Spectrophotomètre UV-Visible : GENESYS 10S UV-Vis Thermo Scientific TM avec une cuve en Quartz, de 1cm
- Bain à ultra-son
- Rampe à filtration.
- pH mètre HANNA Instruments PH 209
- Etuve de marque Memert réglée à 70°C.
- Dispositif luminaire émet une lumière similaire à celle du jour, avec une puissance de 1800×4 Lumen
- Ultra-purificateur d'eau Simplicity-UV
- Balance analytique KERN-ACJ 220-4M

2. Réactifs

Oxomémazine chlorhydrate (OXO)

- M_r 366,91
- Solubilité : soluble dans l'eau
- Perte à la dessiccation : 0,19 %
- Teneur par rapport à la substance desséchée : 100,4 %

Phénothiazine dioxyde (PDO)

- M_r 231,27
- Pureté : 99,9%

Parahydroxybenzoate de méthyle (MP)

- Aspect : poudre blanche
- Teneur : 99,61 %

Parahydroxybenzoate de propyle (PP)

- Aspect : poudre blanche
- Teneur : 99,52 %

Acide chlorhydrique

- Fournisseur : Honeywell Fluka
- Numéro de lot : N0760
- Date recommandée de retest : 28.Aout.2026

Hydroxyde de sodium

- Fournisseur : Sigma-Aldrich
- Numéro de lot : STBH5068
- Date recommandée de retest : DEC 2023

Eau purifiée

- M_r 18,02
- Conductivité < 4,3µs·cm^{-1} à 20°C
- Carbone organique total : < 0,5 mg/l

Eau Ultra-pure

- M_r 18,02
- Conductivité < 0,5 µs·cm^{-1} à 20°C

Solution de peroxyde d'hydrogène à 30 pour cent

- Fournisseur : CLCM-labs
- Numéro de lot : CM3401.30.D0223
- Date de péremption : Fév-26

Chlorure ferrique ($FeCl_3$, $6H_2O$)

- Fournisseur : Acros Organics
- Numéro de lot : A0429763
- Date de retest : 05/11/2024

Potassium dihydrogénophosphate KH_2PO_4

- Fournisseur : CLCM-labs
- Numéro de lot : CM13609.S0423
- Date de péremption : Dec-26

Hydroxyde de potassium

- Fournisseur : ThermoFisher
- Numéro de lot : 225063
- Date de Retest : Nov/2025

Acide Ortho-Phosphorique 85%

- Fournisseur : CLCM-labs
- Numéro de lot : CM0799.D85.1222
- Date de péremption : 02/2026

Triéthylamine. $C_6H_{15}N$.

- Fournisseur : Merck
- Numéro de lot : S6048652
- Date de péremption :30/04/2026.

Méthanol

- Fournisseur : Honeywell Riedel-de Haën
- Grade : pour HPLC
- Numéro de lot : M0800
- Date de péremption : 27.Aug.2026

Acétonitrile

- Fournisseur : Research Chemicals - Riedel-de Haën
- Grade : pour HPLC
- Numéro de lot : EB072
- Date de péremption : 2-Mar-2024

CHAPITRE 2.
ETUDE DE LA DEGRADATION FORCEE

I. Développement d'une méthode de dosage des impuretés

Le développement de méthodes analytiques pour le dosage des impuretés revêt une importance cruciale dans le domaine de l'analyse pharmaceutique, avec pour objectif principal de garantir la pureté des produits pharmaceutique. Ce processus complexe nécessite une approche méticuleuse, intégrant divers paramètres essentiels tels que la rétention optimale des composants, la résolution adéquate entre eux et la sensibilité de la détection, le tout dans des délais d'analyse raisonnables.

La réalisation d'une séparation efficace des impuretés dépend en grande partie de l'obtention d'une rétention optimale des analytes. Notamment, le facteur de capacité devrait idéalement entre les valeurs de 5 à 10, ce qui doit être atteint préférentiellement en utilisant une force élutive moyenne de la phase mobile. Cette approche permet à la fois d'augmenter la rétention pour améliorer la séparation des composés mal résolus et de la diminuer pour optimiser les temps d'analyse.

La sensibilité du détecteur joue un rôle déterminant dans la réussite du développement de la méthode. Un détecteur sensible est impératif pour détecter les faibles concentrations d'impuretés, garantissant ainsi une analyse quantitative précise conforme aux normes de qualité pharmaceutique.

Enfin, le choix entre le mode isocratique et le mode gradient présente des implications significatives. L'adoption d'un mode isocratique, caractérisé par une composition constante de la phase mobile, offre des avantages pratiques en termes de simplicité, de reproductibilité et de facilité de transfert analytique. Cette approche permet de maintenir une stabilité des conditions chromatographiques, assurant ainsi une robustesse accrue de la méthode analytique.

Les contraintes liées au développement d'une méthode analytique pour le dosage des substances apparentées dans ce médicament, sirop d'oxomémazine, sont les suivantes :

1. **Absence de Monographie dans les Pharmacopées :**

   Aucune monographie relative à la substance active ou au produit fini n'est répertoriée dans la Pharmacopée Européenne (Ph Eur 11), la Pharmacopée Américaine (USP 46) et la Pharmacopée Japonaise (JP18).

2. **Absence d'articles et travaux scientifiques publiés :**

   Malgré une recherche approfondie sur Google Scholar avec les mots-clés suivants ("oxomemazine chromatography impurities") à la date du 21/12/2023 à 09h48, aucun article pertinent n'a été identifié en ce qui concerne les impuretés de ce produit. Ceci souligne le défi d'accéder à des informations existantes sur le sujet.

3. **Complexité de la Forme Pharmaceutique :**

   La forme pharmaceutique en sirop présente des défis supplémentaires par rapport aux formes sèches, en raison de la présence potentielle d'interférences telles que des conservateurs, des édulcorants, des colorants, et d'autres composés.

4. **Faible Concentration Initiale et Détection des Impuretés :**

   La faible concentration initiale du sirop (0,37 mg/ml) pose un défi particulier lors de la détection des impuretés à un niveau de 0,1% (0,37 µg/ml).

   La nécessité de détecter des impuretés à des niveaux aussi bas nécessite une sensibilité élevée de l'instrumentation analytique, tout en tenant compte aussi de la dilution nécessaire à réaliser.

Le développement d'une méthode HPLC a impliqué plusieurs étapes cruciales ayant assuré une séparation optimale des composés cibles. Voici la méthodologie qui a été suivie pour ce processus :

1. Choix du mode de séparation

La phase stationnaire C18 est généralement le premier choix lors de la mise au point d'une nouvelle méthode. Dans notre cas, l'OXO présente principalement des caractéristiques hydrophobes avec une valeur positive de log P (coefficient de partition logarithmique eau-octanol) (Tableau 26), l'utilisation d'une colonne en phase inverse est recommandée [79].

De plus, l'analyse des substances apparentées des substances actives : l'Alimémazine et la Prométhazine, toutes deux dérivées de la phénothiazine comme l'OXO, est réalisée sur une colonne C18 (Annexe 5 et 6).

Cependant, si une colonne C18 ne permet pas d'atteindre la séparation souhaitée, ou si l'échantillon est difficile à retenir ou à séparer sur une colonne C18, il est recommandé de considérer un changement de mode chromatographique. L'exploration de la chromatographie HILIC, de la chromatographie de paire d'ions, et de la chromatographie ionique est alors à envisager dans ce cas.

2. Choix des dimensions de la colonne

La colonne initialement sélectionnée pour le développement est la colonne Symmetry C18, 3,5 µm, 100 x 4,6 mm, présentant les caractéristiques suivantes [80]:

- Catégorie de phase stationnaire : C18, octadécylsilane (L1)
- Type de ligand : C18
- Particule : 3,5 µm, sphérique
- Taille des pores : 100 Å
- Charge en carbone : 19%
- End-Cap : oui
- Plage de pH : 2 à 8
- Température maximale : 80 °C

Ce choix est justifié par les raisons analytiques fondamentales suivantes:

- La granulométrie des particules dans la colonne chromatographique est fixée à 3,5 µm pour améliorer l'efficacité de la colonne sachant que la détection d'impuretés à des niveaux aussi bas requiert une efficacité élevée.

- La phase stationnaire est post-greffée (end-capped) afin de réduire l'interaction des silanols libres avec notre substance active OXO, qui est de nature basique.

- La taille des pores des particules est choisie à 100 Å, une dimension adaptée pour les petites molécules.

- Le diamètre interne de la colonne est de 4,6 mm, une dimension standard en HPLC.

- Une longueur de colonne de 10 cm est également judicieuse, car des longueurs supérieures avec de diamètre des particules à l'ordre de 3,5 µm pourraient dépasser la pression maximale en HPLC, qui est de l'ordre de 40 MPa

3. Choix du mode de détection

Le détecteur initialement testé est généralement le détecteur standard UV/Vis, étant le détecteur le plus répandu et le plus simple. Dans le cadre des études de stress, la vérification de la pureté des pics est une pratique courante visant à éliminer tout doute de co-élution. À cette fin, l'utilisation d'un détecteur UV à barrette de diodes (DAD) est impérative.

Si la réponse de l'OXO dans le domaine spectral de l'UV-Visible n'est pas suffisante, l'utilisation d'autres options de détection, telles que la spectroscopie de masse, ou d'autres méthodes spécifiques à la nature des composés à analyser, devient nécessaire.

Matériels et méthodes

Une solution d'OXO a été préparée à une concentration de 0,037 mg/ml, équivalant à une dilution de 1/10ème de la concentration du sirop OXO, dans un diluant composé de 50% de méthanol et 50% d'eau. Un spectre UV a été enregistré dans la plage de 200 à 400 nm, contre un blanc constitué du diluant 50% méthanol / 50% eau.

Afin d'explorer toute interférence spectrale potentielle des excipients, deux solutions ont été préparées, l'une contenant du méthyle parabène MP et l'autre du propyle parabène PP, dans le même diluant. Les deux spectres UV de ces solutions ont été enregistrés de la même manière que celui de la solution d'OXO.

Résultats et discussion

Le spectre UV de l'OXO, observé dans la plage de 200 nm à 400 nm, révèle plusieurs pics d'absorption, notamment à 224 nm, 269 nm, 295 nm et 333 nm. (Figure 10).

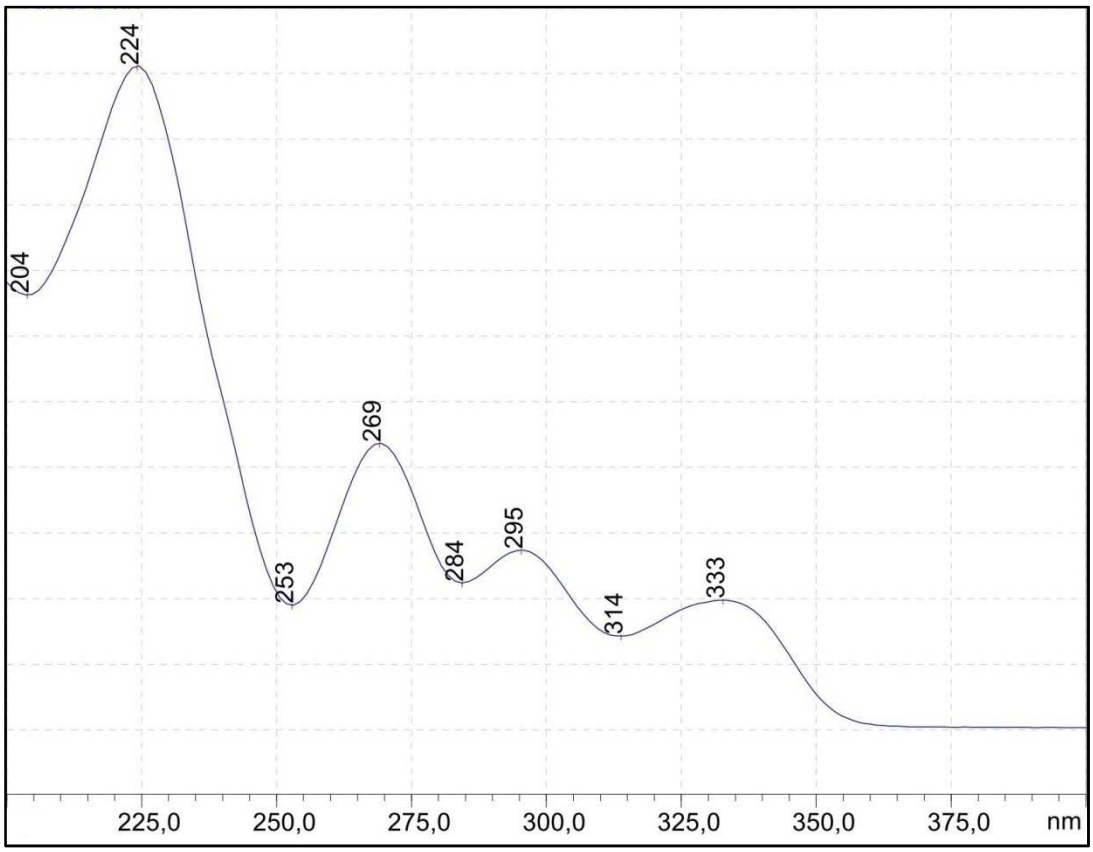


Figure 10. Spectre UV de la SA dans l'intervalle 200 nm à 400 nm

Pour optimiser la quantification, la préférence a été accordée à la sélection de la longueur d'onde de 224 nm en raison de son coefficient d'absorption plus élevé, ce qui contribue à accroître la sensibilité du détecteur.

Cette décision est renforcée par le fait que la longueur d'onde de 224 nm correspond à un minimum d'absorption pour les deux parabènes MP et PP, réduisant ainsi le risque d'interférence potentielle de ces composés. (Figure 11).

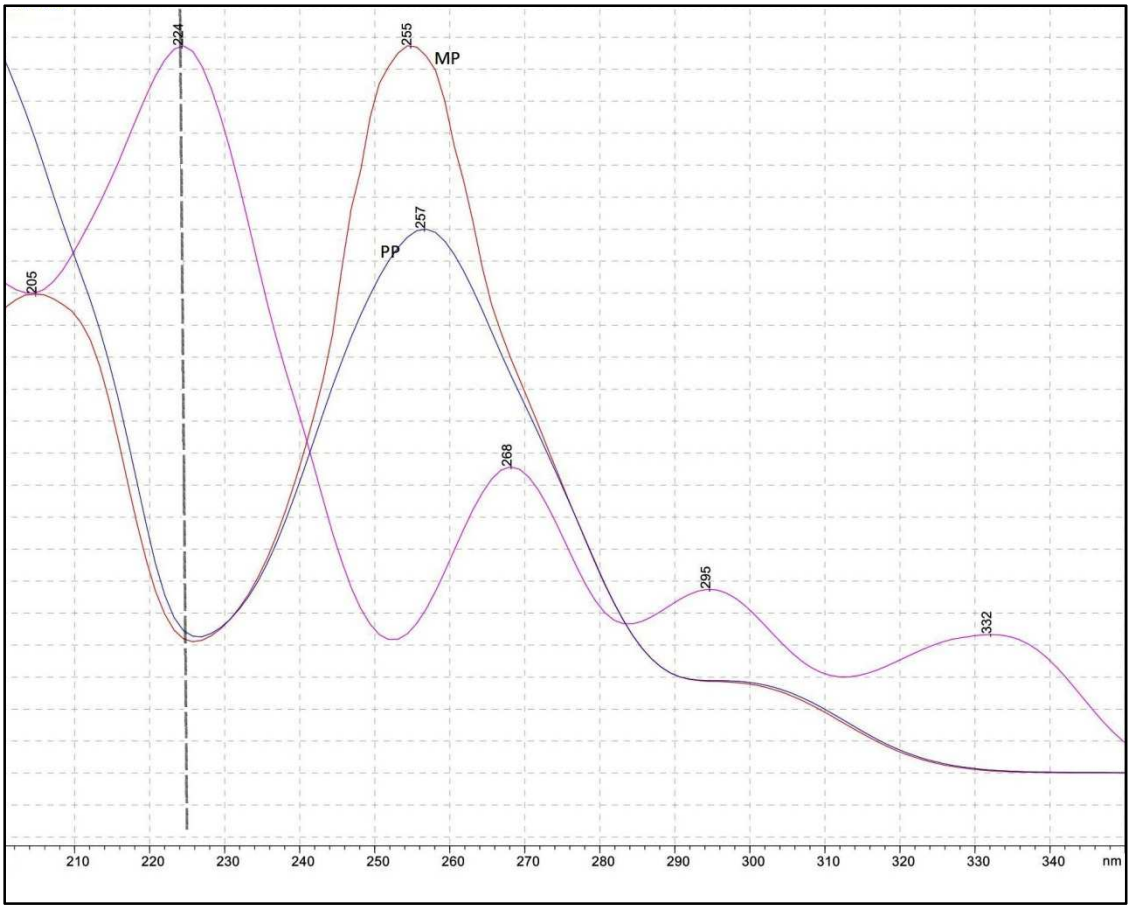


Figure 11. Spectre UV de la SA, MP et PP dans l'intervalle 200 nm à 400 nm

Conclusion

Un détecteur UV à barrette de diodes (DAD) réglé à 224 nm sera utilisé dans ce travail.

4. Choix du débit

Le débit approprié dépend des dimensions de la colonne. Pour les colonnes ayant un diamètre interne compris entre 4 et 4,6 mm, le débit optimal se situe généralement entre 0,8 ml/min et 2,0 ml/min [81].

Pour notre colonne de diamètre interne de 4,6 mm, un débit de 1 ml/min a été choisi. Cette sélection est basée sur des considérations spécifiques à notre configuration expérimentale, visant à atteindre des performances optimales surtout en termes d'efficacité.

5. Choix de la phase mobile

Le choix du méthanol en tant que solvant fort repose sur ses propriétés solvantes supérieures par rapport à l'acétonitrile vis-à-vis du saccharose, principal composant de notre sirop. Cette décision a été prise pour éviter tout risque de précipitation qui pourrait survenir avec l'utilisation d'acétonitrile.

En raison de la nature base faible de la substance active, la fraction aqueuse de la phase mobile a été tamponnée. Le tampon sélectionné est le phosphate de potassium, utilisé à une concentration de 50 mM. Cette concentration a été déterminée comme étant optimale pour maintenir la stabilité du pH de la phase aqueuse, assurant ainsi une rétention constante et reproductible.

5.1. pH de la phase mobile

Étant donné que la plage de pH de la colonne se situe entre 2,5 et 8, deux valeurs de pH, soit 3 et 7, de la phase mobile ont été testées pour évaluer l'effet du pH sur la rétention.

Matériels et méthodes

Une solution d'OXO a été préparée à une concentration de 0,037 mg/ml dans un diluant composé de 80% de méthanol et 20% d'eau ultra pure.

Deux expériences ont été réalisées en utilisant deux valeurs de pH différentes de la phase mobile, soit 3 et 7, tandis que les autres conditions opératoires sont demeurées constantes conformément au Tableau 26.

Tableau 26. Effet du pH sur la rétention de la substance active

	pH 3	**pH 7**
Tampon phosphate	A 50 mM et pH 3	A 50 mM et pH 7
Phase mobile	80V MeOH / 20V Tampon pH 3	80V MeOH / 20V Tampon pH 7
Colonne	Symmetry C18, 3.5µm, 100 x 4.6 mm	Symmetry C18, 3.5µm, 100 x 4.6 mm
Débit	1 ml/min	1 ml/min
Volume injecté	20µl	20µl

Les temps de rétention de la SA dans les deux expériences ont été comparés.

Résultats et discussion

Avec une phase mobile de pH 3, le temps de rétention de la substance active (SA) a été mesuré à 1,695 min, tandis qu'avec une phase mobile de pH 7, le temps de rétention de la SA a été de 2,670 min (Figure 12).

Ce résultat peut s'expliquer par la nature base faible de la substance active (pKa = 8,02 (Chemaxon)). À pH 7, la forme moléculaire basique prédomine, favorisant ainsi une rétention accrue sur notre phase stationnaire apolaire C18.

Conclusion

Un tampon de phosphate de potassium à une concentration de 50 mM et de pH 7 sera maintenu pour assurer une rétention optimale de la substance active.

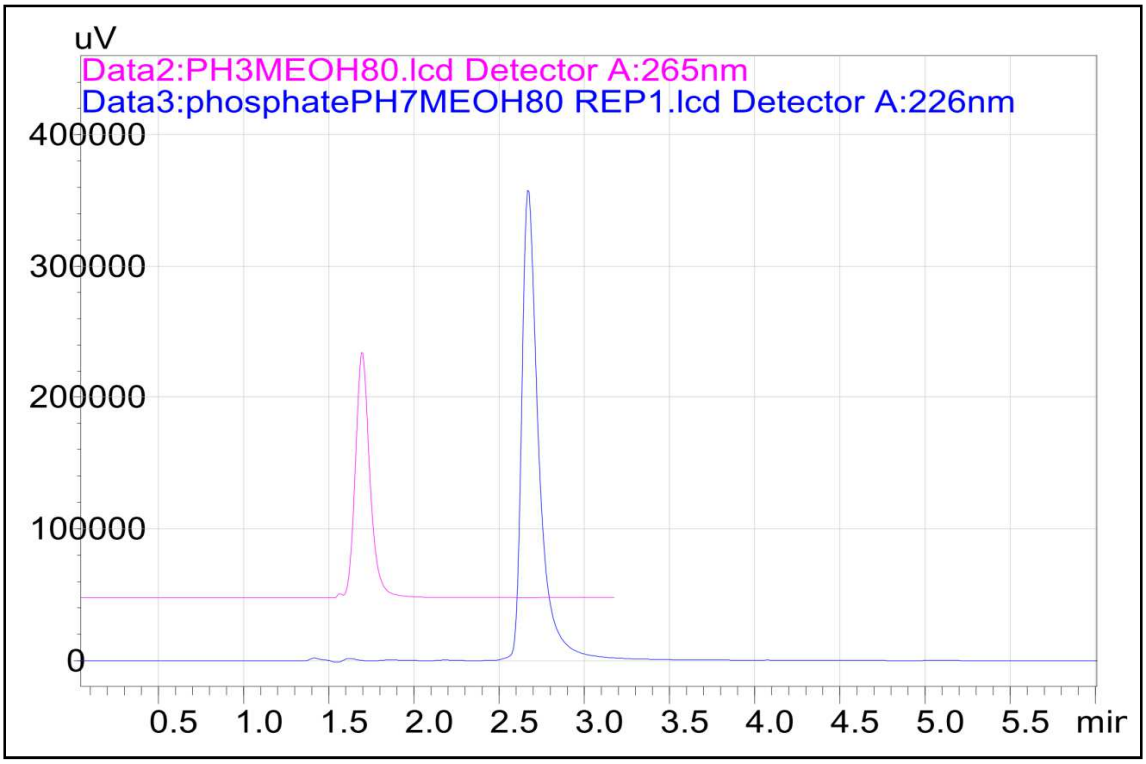


Figure 12. Effet du pH sur la rétention de la substance active

5.2. Concentration en méthanol %B

En chromatographie en phase inverse (RPLC), l'augmentation du pourcentage de méthanol, en tant que solvant fort, entraîne une diminution de la rétention, et vice versa.

Matériels et méthodes

Une solution d'OXO a été préparée à une concentration de 0,037 mg/ml dans un diluant composé de 80% de méthanol et 20% d'eau ultra pure.

Deux expériences ont été menées en utilisant deux valeurs de pourcentage de méthanol différentes dans la phase mobile, soit 80% et 50%, tandis que les autres conditions opératoires sont demeurées constantes conformément au Tableau 27.

Tableau 27. Effet du pourcentage du méthanol sur la rétention de la substance active

	80% Méthanol	**50% Méthanol**
Tampon phosphate	A 50 mM et pH 7	A 50 mM et pH 7
Phase mobile	80V MeOH / 20V Tampon pH 7	50V MeOH / 50V Tampon pH 7
Colonne	Symmetry C18, 3.5µm, 100 x 4.6 mm	Symmetry C18, 3.5µm, 100 x 4.6 mm
Débit	1 ml/min	1 ml/min
Volume injecté	20µl	20µl

Les temps de rétention de la SA dans les deux expériences ont été comparés.

Résultats et discussion

Avec une phase mobile contenant 80% de méthanol, le temps de rétention de la substance active (SA) a été mesuré à 2,670 minutes, tandis qu'avec une phase mobile contenant 50% de méthanol, le temps de rétention de la SA a été de 10,694 minutes (Figure 13). Sachant que le temps mort est d'environ 1 minute, le facteur de rétention du produit actif (PA) est de 9,694, obtenu avec une force élutive moyenne de 50% de méthanol.

Conclusion

Une phase mobile composée de 50% de méthanol et 50% de tampon de phosphate de potassium à une concentration de 50 mM et de pH 7 sera maintenue.

Cependant, avec cette phase mobile, le facteur de symétrie du pic de la SA est mesuré à 2,856. (Figure 16).

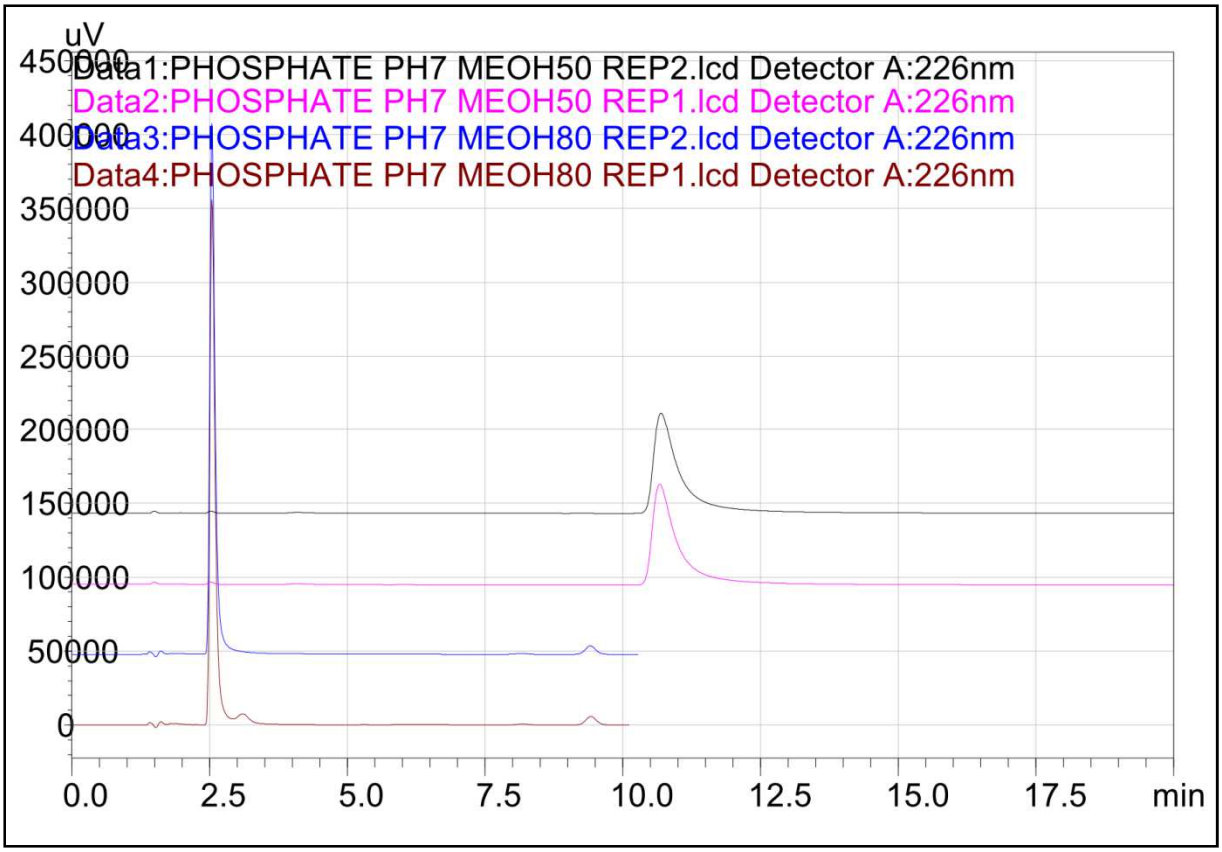


Figure 13. Effet du pourcentage du méthanol sur la rétention de la substance active

5.3. Amélioration de la forme du pic

L'asymétrie du pic de l'OXO (Figure 14) est attribuable à une interaction secondaire entre notre analyte d'intérêt, de nature basique, et les silanols libres de la phase stationnaire, dont l'ionisation est davantage favorisée par le pH 7 du tampon.

La triéthylamine (TEA) est souvent ajoutée à la phase mobile comme additif pour remédier à ce phénomène de traînée des pics.

Matériels et méthodes

La triéthylamine (TEA) a été ajoutée au tampon de phosphate de potassium à une concentration de 50 mM et un pH de 7, à raison de 1,5 ml/l (soit 10 mM).

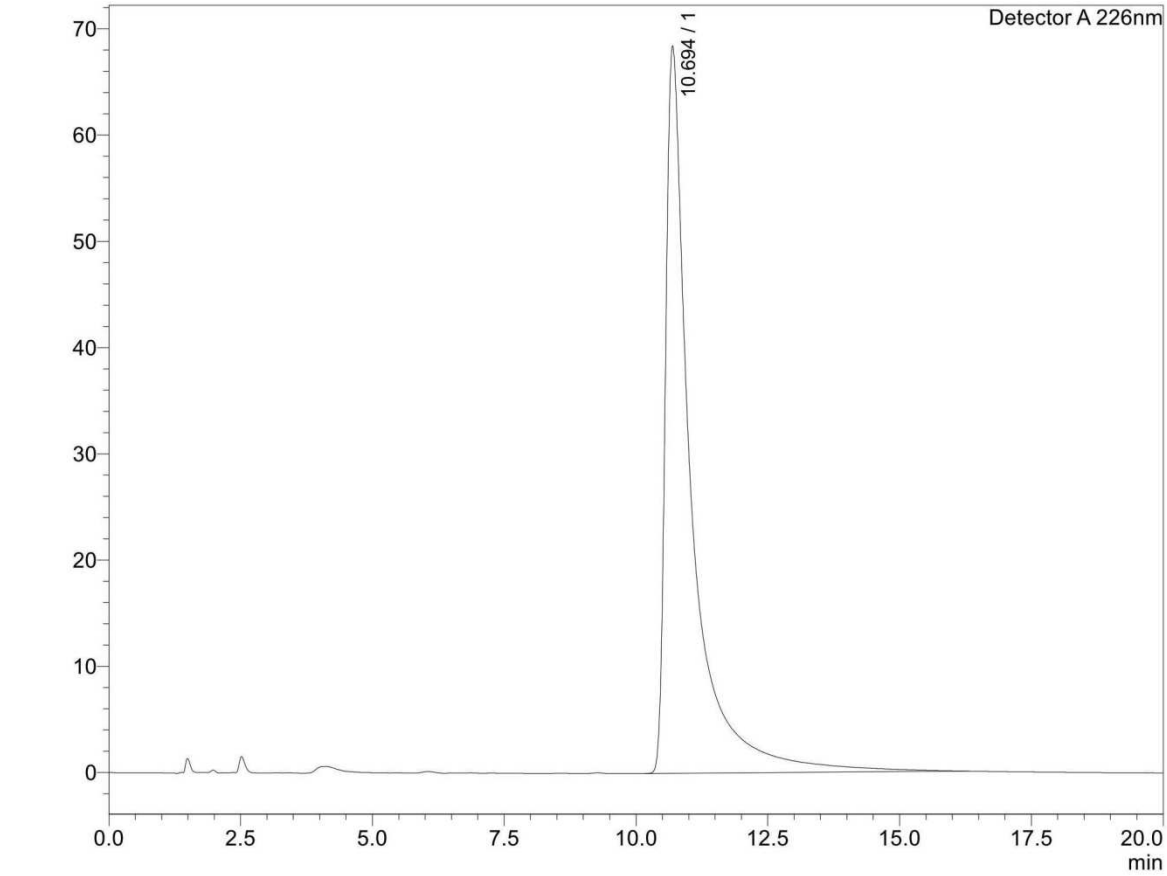
La même une solution d'OXO a été analysée avec deux phases mobiles : avec et sans triéthylamine (TEA). Les autres conditions chromatographiques sont restées constantes.

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename	: PHOSPHATE PH7 MEOH50 REP2.lcd		
Method Filename	: SIMO.lcm		
Batch Filename	:		
Vial #	: 1-50	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 20 uL		

<Chromatogram>



<Peak Table>

Detector A 226nm

ID#	Peak#	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
	1	10.694	2341129	2.856	3647

Figure 14. Effet des silanols libres sur la forme du pic d'OXO

Résultats et discussion

La Figure 15, comparant la forme du pic de la substance active (SA) avant et après l'ajout de la TEA dans la phase mobile, illustre clairement l'amélioration significative de la forme du pic. L'incorporation de la TEA a permis de réduire la valeur du facteur de symétrie à 1,171.

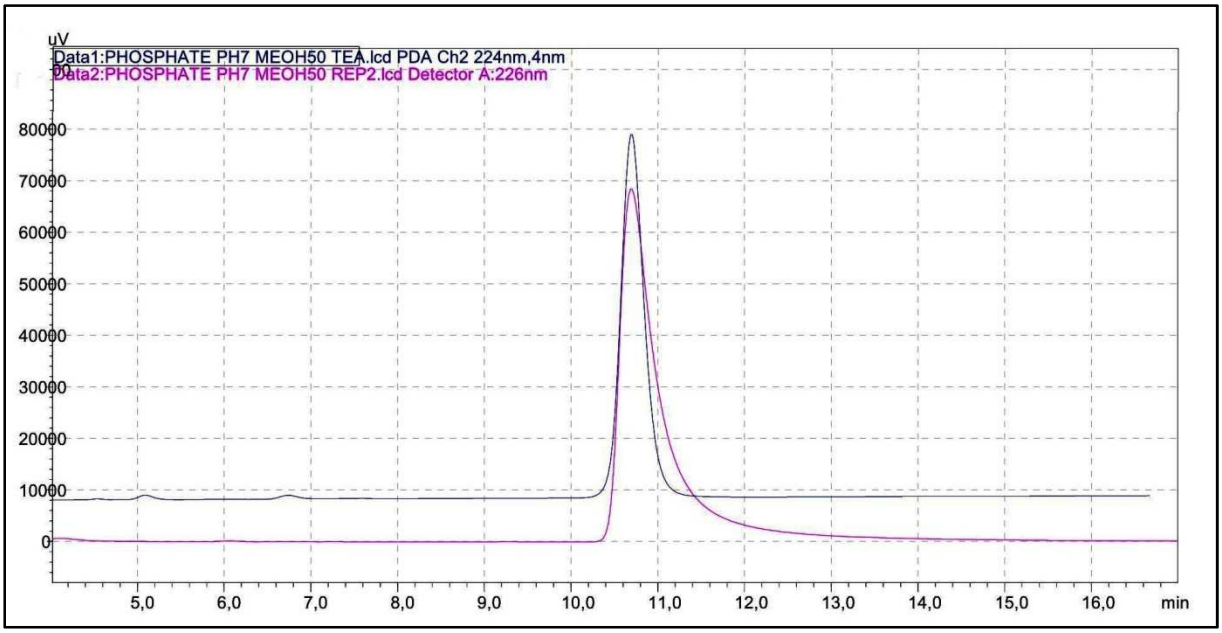


Figure 15. Effet de la triéthylamine TEA sur l'amélioration de la forme du pic d'OXO

Conclusion

Une phase mobile composée de 50% de méthanol et 50% de tampon de phosphate de potassium à 50 mM, 10 mM de TEA, et un pH de 7 sera maintenue..

6. Température

La température du four a été augmentée à 40 °C, entraînant une diminution du temps de rétention du produit actif (PA) à une valeur de 9,104 minutes (Figure 16). L'avantage majeur réside dans la réduction de la pression de la pompe, passant d'environ 26 MPa à température ambiante à environ 17 MPa à cette température de 40 °C.

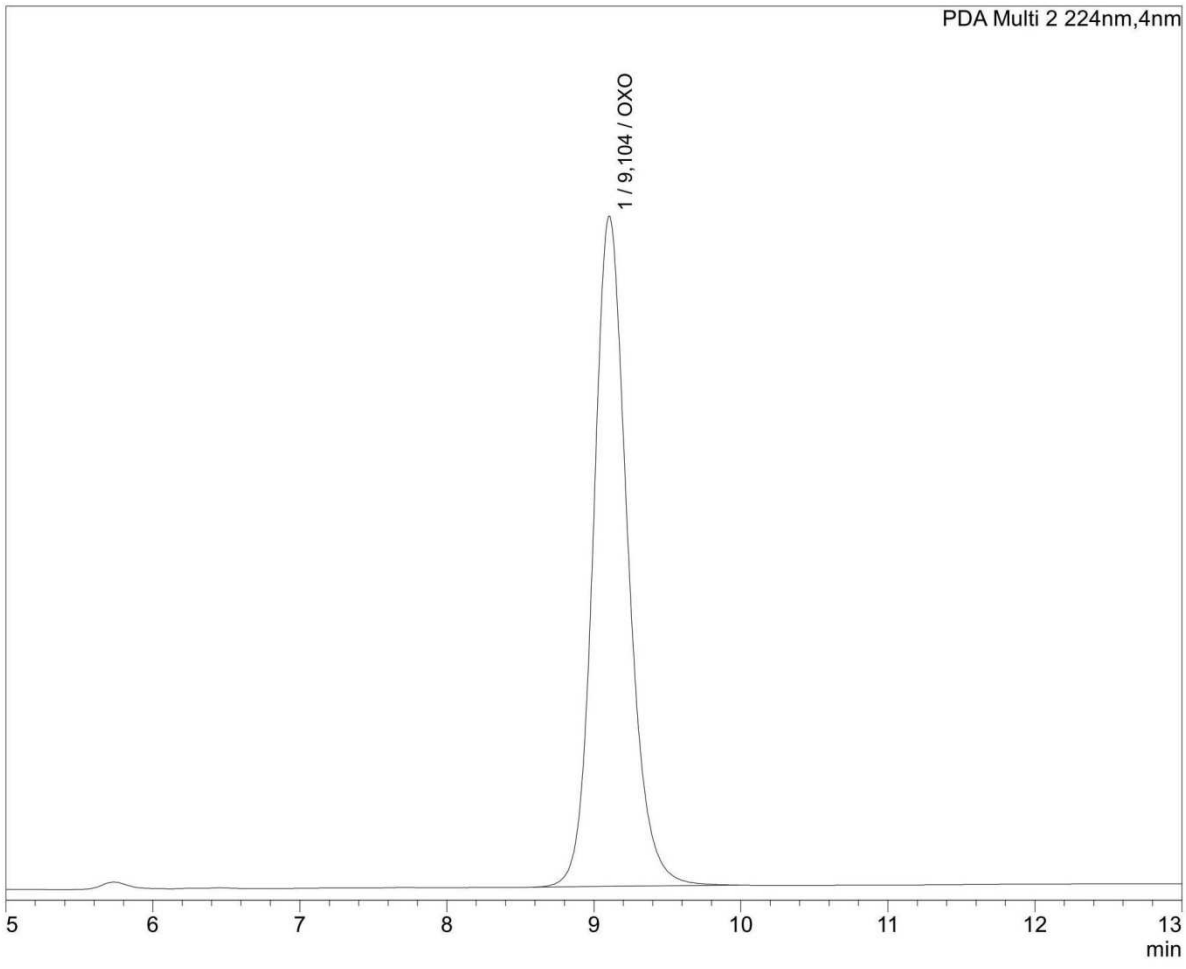
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : PHOSPHATE PH7 MEOH50 TEA.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:B.lcb
Report file: DEFAULT.lsr
Vial # : 1-2
Injection Volume : 20 uL

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	OXO	9,104	797590	1,171	7773

Figure 16. Effet de la triéthylamine TEA et la température sur le pic d'OXO

7. Choix des concentrations et préparation des échantillons

En raison de la faible concentration initiale du sirop (0,37 mg/ml), l'objectif était de minimiser la dilution pour réduire la charge et la viscosité du produit fini, tout en maintenant la capacité de détecter des impuretés de l'ordre de 0,1%.

Matériels et méthodes

Une dilution de 6 ml de sirop dans 10 ml, soit une concentration en OXO de 0,222 mg/ml, a été testée.

Une solution standard d'OXO a également été préparée à cette concentration (0,222 mg/ml) dans la phase mobile, ainsi qu'une solution échantillon en diluant 6 ml de placebo chargé à 100% dans 10 ml de phase mobile. Ces deux solutions ont été analysées selon la méthode décrite dans le Tableau 28.

Tableau 28. Conditions chromatographiques de choix des concentrations

Tampon phosphate	A 50 mM, 1,5 ml/l TEA et à pH 7
Phase mobile	50V MeOH / 50V Tampon pH 7
Colonne	Symmetry C18, 3.5µm, 100 x 4.6 mm
Température	40°C
Débit	1 ml/min
Volume injection	20µl

Résultats et discussion

Selon la Figure 17, le pic de la substance active (SA) dans la solution standard à 0,222 mg/ml présente une forme idéale, tandis que le pic de la même SA dans la solution échantillon préparée à partir d'un placebo chargé à la même concentration présente une distorsion. De plus, cette anomalie a affecté uniquement le pic OXO, les pics des excipients présentant une forme acceptable.

La différence entre les deux solutions réside dans la viscosité et la charge de la solution échantillon par rapport à la solution standard, pouvant ainsi être à l'origine de la distorsion du pic du produit actif (PA) [82–84].

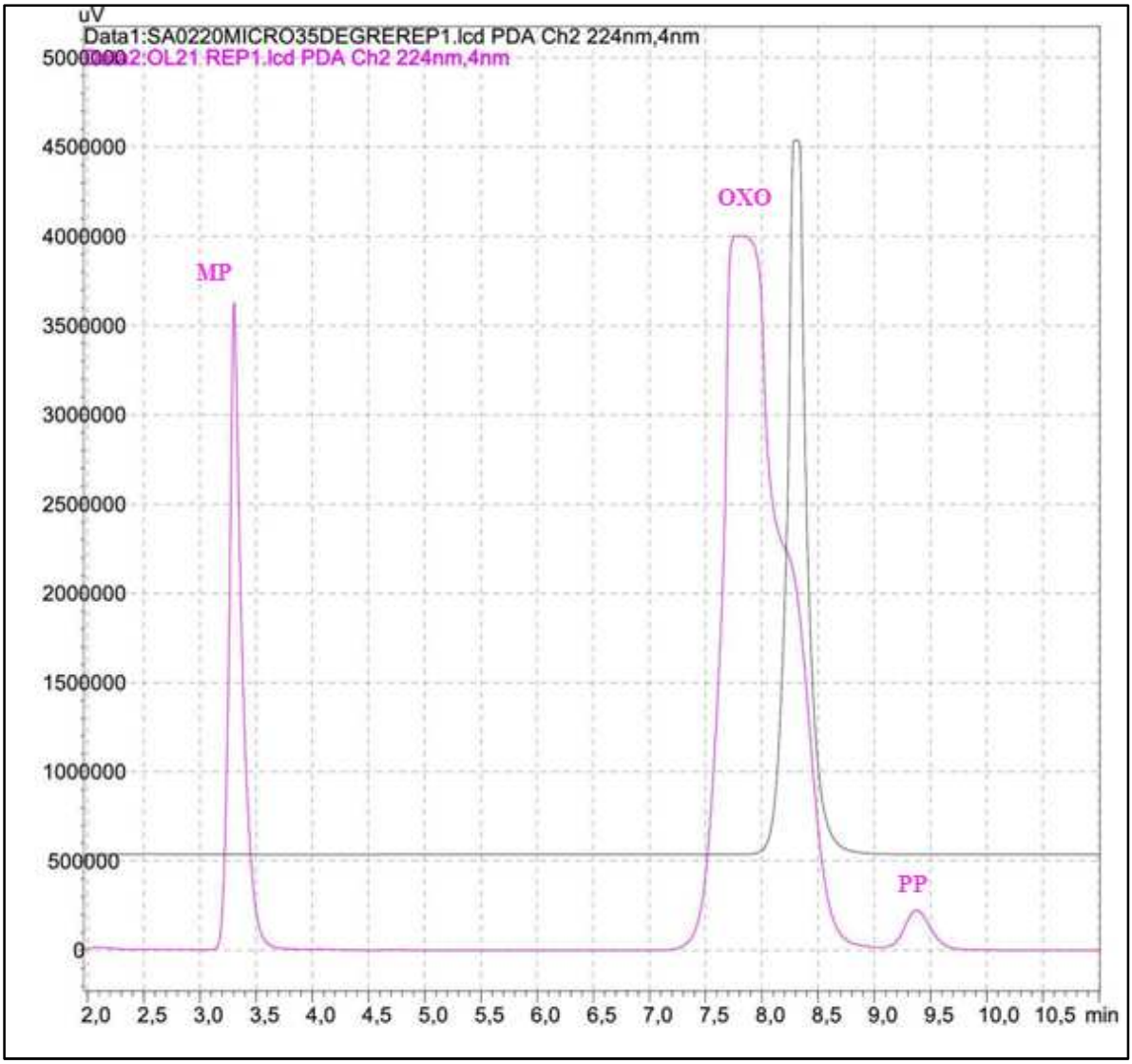


Figure 17. Comparaison des chromatogrammes de la solution standard et échantillon à la même concentration de 0,222 mg/ml.

Pour explorer cette hypothèse, une autre solution échantillon a été préparée en diluant 3 ml de placebo chargé à 100% dans 10 ml de phase mobile, soit une concentration de 0,111 mg/ml (une dilution à la moitié de la solution échantillon précédente). Ensuite, cette solution a été analysée selon la même méthode décrite dans le Tableau 30.

Selon la Figure 18, la dilution a eu un effet positif sur le chromatogramme. Les pics des excipients ont diminué de hauteur, confirmant l'effet de la dilution. Le pic de la SA a retrouvé une bonne forme sans distorsion.

En conclusion, la recherche des impuretés dans le produit fini s'effectue sur des dilutions à une concentration de 0,111 mg/ml, c'est-à-dire une dilution du sirop à raison de 3 ml dans 10 ml avec la phase mobile.

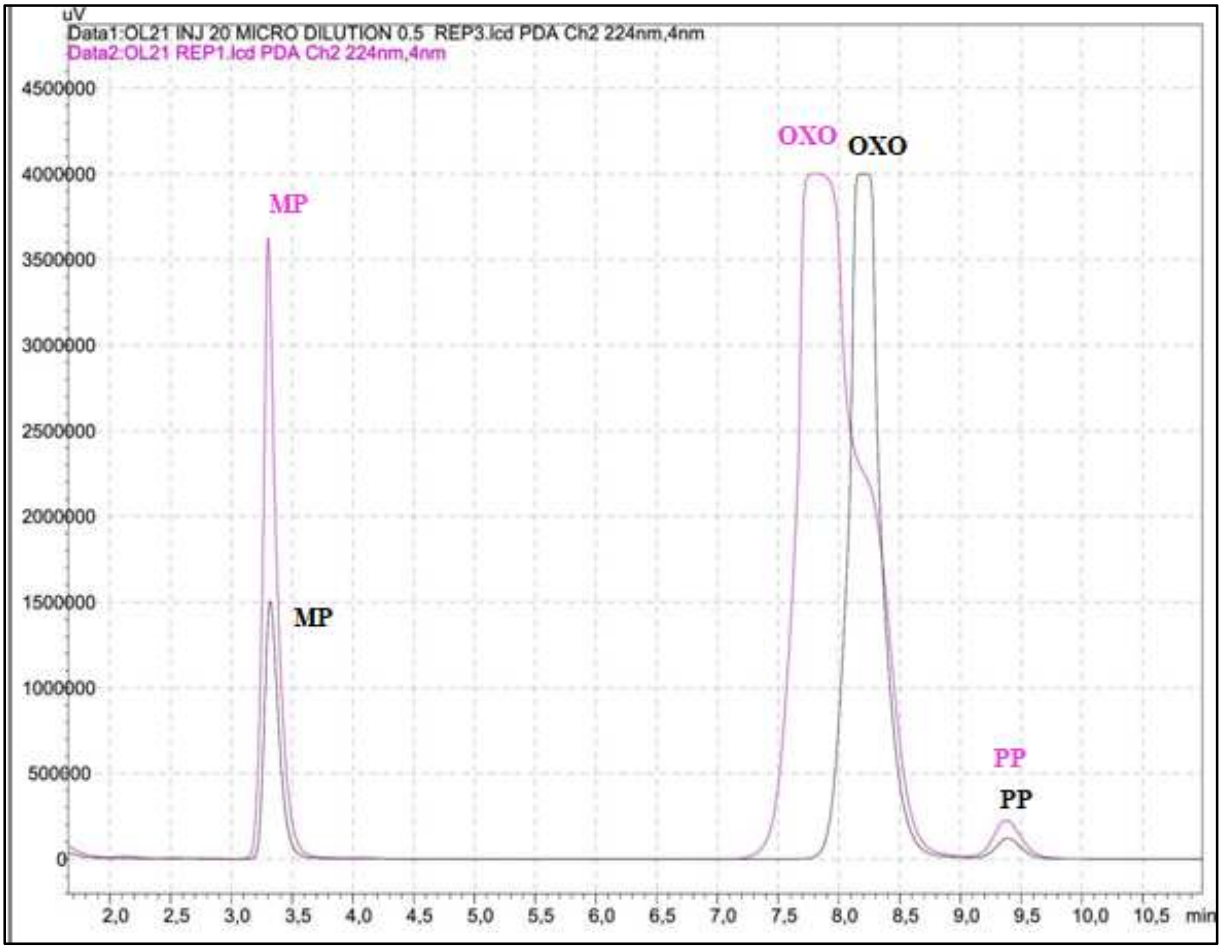


Figure 18. Comparaison des chromatogrammes de solution échantillon à des concentrations de 0,222 mg/ml et 0,111 mg/ml.

En raison des temps de rétention relativement courts (Tr SA d'environ 9 min) et dans le but d'augmenter davantage la résolution entre les pics, une dernière modification a été apportée à la méthode décrite dans le tableau 30, consistant à réduire le pourcentage de méthanol de 50% à 40%, conformément aux ajustements indiqués dans le Tableau 29.

Tableau 29. Conditions chromatographiques finales du développement analytique

Tampon phosphate	A 50 mM pH 7 et 1,5 ml TEA
Phase mobile	40V MeOH / 60V Tampon pH 7
Colonne	Symmetry C18, 3.5µm, 100 x 4.6 mm
Température	40°C
Débit	1 ml/min
Volume d'injection	20µl

Cette modification a donné les résultats attendus (Figure 19), améliorant significativement la résolution. Ainsi, cette méthode s'avère désormais plus appropriée pour séparer d'éventuelles impuretés générées lors de l'étude de la dégradation forcée.

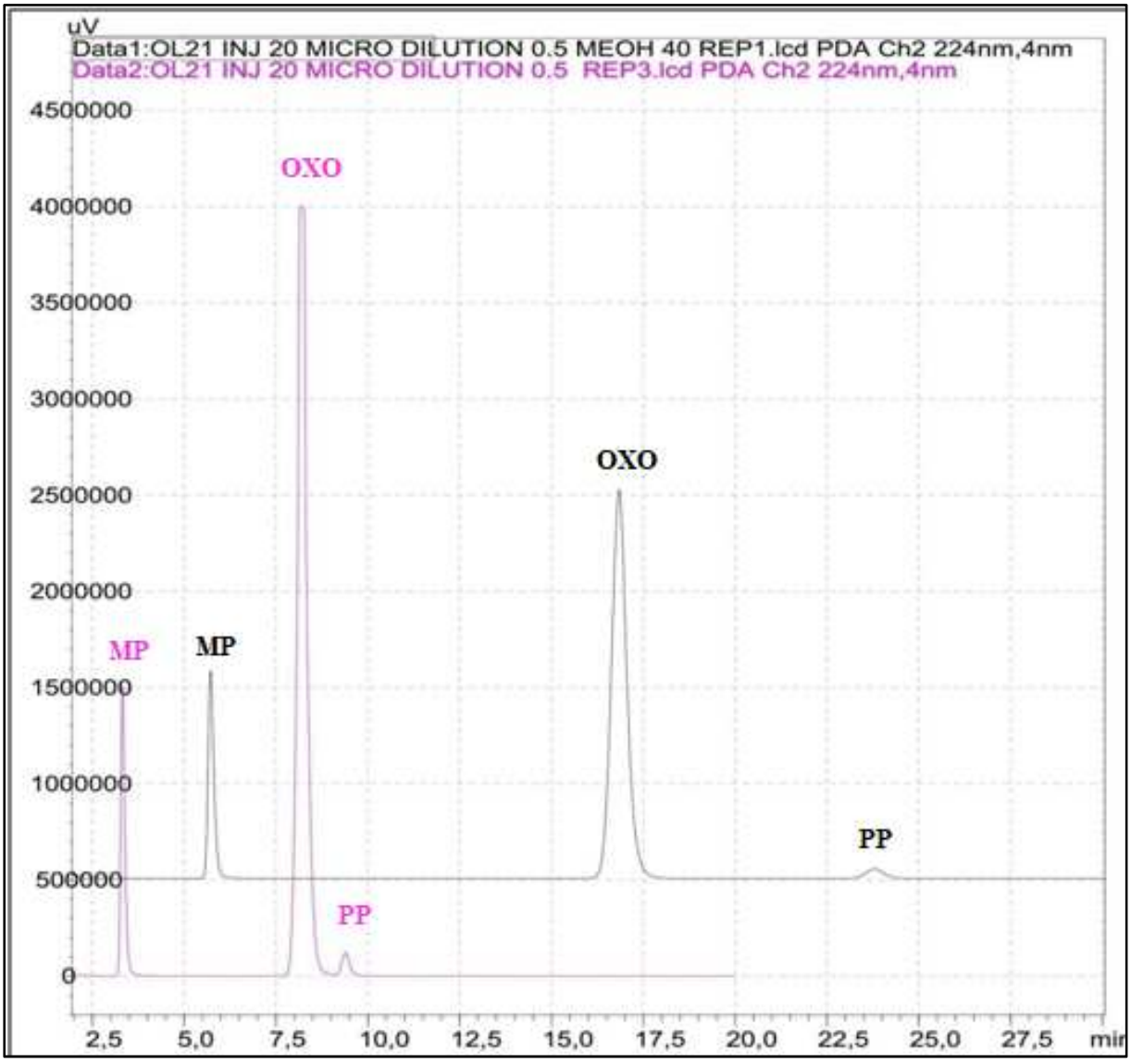


Figure 19. Comparaison des chromatogrammes de solution échantillon à 0,111 mg/ml, utilisant deux phases mobiles avec 50% de méthanol et 40% de méthanol.

8. Conclusion

La mise au point d'une méthode chromatographique pour l'analyse des substances apparentées dans un produit fini a été réalisée avec une approche progressive, prenant en compte différents paramètres influençant l'analyse, à savoir :

- La phase stationnaire et la colonne
- Le mode de détection
- Le débit
- La phase mobile
- Les concentrations et la préparation des échantillons

Ces expériences ont permis de mettre au point une méthode adaptée (une bonne rétention avec une force élutive moyenne) pour la séparation des impuretés lors d'une étude de dégradation forcée. Le détail de cette dernière est résumé dans le Tableau 30.

Tableau 30. Méthode chromatographique utilisée dans l'étude de la dégradation forcée

Tampon	Dissoudre 6,8 gr de dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 et 1,5 ml de Triéthylamine TEA dans 900 ml d'eau ultra-pure, régler le pH à 7,0 avec une solution de potassium hydroxyde KOH et ajuster le niveau à 1000 ml avec l'eau ultra-pure.	
Phase mobile	Tampon 60V / Méthanol qualité HPLC 40V	
Solution Echantillon	Diluer 3 ml de l'échantillon à 10 ml avec la phase mobile	
Colonne :	**Dimensions**	▪ Longueur L = 10 cm ▪ Diamètre Ø = 4,6 mm
	Phase stationnaire	▪ Gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie (3,5 µm) ▪ Taille des pores = 100 Å
	Fabricant	▪ Waters Symmetry C18
Température :	40°C	
Débit	1,0 ml/mn	
Détection	DAD à 224nm	
Volume d'injection	20µl	
Enregistrement	3 fois Tr OXO, soit 50 min.	
Limite d'exclusion	0,1 %	

II. Protocole de la dégradation forcée

1. Introduction

L'objectif principal des tests de la dégradation forcée est de provoquer une dégradation significative, généralement comprise entre 5 % et 20 %.

Ces études se déroulent généralement en deux phases distinctes. Tout d'abord, une enquête préliminaire expose les échantillons à des conditions de stress extrêmes en termes de temps et d'intensité de stress. Si aucune dégradation n'est observée, la substance est considérée comme stable.

En revanche, si une dégradation importante est constatée, dépassant les 20 %, une phase d'optimisation du stress testing est nécessaire. Cela implique d'ajuster à la fois la force du stress et/ou la durée d'exposition pour obtenir des résultats significatifs (une dégradation de 5% à 20%).

Le stress testing doit couvrir les quatre mécanismes principaux de dégradation pharmaceutiquement pertinents :

- Thermolytique.
- Hydrolytique.
- Oxydatif
- Photolytique.

Les études de dégradation forcée sont menées sur :

- Le placebo chargé à 100 %.
- La substance active seule.
- Le placebo seul.
- Le cas échéant, le blanc ou le témoin.

L'objectif est de différencier les impuretés issues de :

- La dégradation de la substance active.
- L'interaction entre la substance active et les excipients.
- La dégradation des excipients.

2. Matériels et méthodes

2.1. Préparation des réactifs

Placébo

Le placébo a été préparé en mélangeant tous les composants du médicament à l'exception de la substance active

Solution d'acide chlorhydrique 10M

Un volume 90 ml d'acide chlorhydrique a été dilué à 100 ml avec l'eau purifiée.

Solution d'hydroxyde de sodium 10M

Une prise d'essai de 42 gr d'hydroxyde de sodium a été dissoute dans 100 ml avec l'eau purifiée.

Solution chlorure ferrique 50 mM

Une prise d'essai de 1,351 gr de chlorure ferrique a été dissoute dans 100 ml avec l'eau purifiée

2.2. Préparation des solutions de la dégradation forcée

2.2.1. Stress thermique

Le produit fini a été préparé en dissolvant 37 mg OXO dans une quantité suffisante pour 100 ml de placébo. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon TDP).

La substance active a été préparée en dissolvant 37 mg OXO dans une quantité suffisante pour 100 ml d'eau purifiée. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon TDS).

100 ml de placébo a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon TP).

Le produit fini (TDP), la substance active (TDS) et le placébo (TP) ont été stockés dans une étuve réglée à 70°C et ils ont été analysés le temps 0 (T0) et après 21 jours (T21).

2.2.2. Hydrolyse acide 1M

Le produit fini a été préparé en dissolvant 37 mg OXO dans 80 ml de placébo, 10,0 ml de la solution d'acide chlorhydrique 10M a été ajoutée et le volume a été ajusté à 100 ml avec le placébo. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon ADP).

La substance active a été préparée en dissolvant 37 mg OXO dans 80 ml d'eau purifiée, 10,0 ml de la solution d'acide chlorhydrique 10M a été ajoutée et le volume a été ajusté à 100 ml avec l'eau purifiée. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon ADS).

La solution de placébo a été préparée en mélangeant 80 ml de placébo et 10,0 ml de la solution d'acide chlorhydrique 10M et le volume a été ajusté à 100 ml avec le placébo. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon AP).

Le produit fini (ADP), la substance active (ADS) et le placébo (AP) ont été stockés dans une étuve réglée à 70°C et ils ont été analysés le temps 0 (T0) et après 7 jours (T7).

2.2.3. Hydrolyse basique 1M

Le produit fini a été préparé en dissolvant 37 mg OXO dans 50 ml de placébo, 10,0 ml de la solution d'hydroxyde de sodium 10 M a été ajoutée, un minimum de 30 ml d'Acetonitrile était utilisé pour solubiliser OXO et le volume total a été ajusté à 100 ml avec le placébo. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon BDP).

La substance active a été préparée en dissolvant 37 mg OXO dans 50 ml d'eau purifiée, 10,0 ml de la solution d'hydroxyde de sodium 10M a été ajoutée, un minimum de 30 ml d'Acetonitrile était utilisé pour solubiliser OXO et le volume a été ajusté à 100 ml avec l'eau purifiée. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon BDS).

La solution de placébo a été préparée en mélangeant 50 ml de placébo, 10,0 ml de la solution d'hydroxyde de sodium 10M, 30 ml d'Acetonitrile et le volume total a été ajusté à 100 ml avec le placébo. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon BP).

Le produit fini (BDP), la substance active (BDS) et le placébo (BP) ont été stockés dans une étuve réglée à 70°C et ils ont été analysés le temps 0 (T0) et après 7 jours (T7).

2.2.4. Oxydation médiée par le peroxyde d'hydrogène 3%

Le produit fini a été préparé en dissolvant 37 mg OXO dans 80 ml de placébo, 10 ml de la solution d'eau oxygénée à 30% a été ajoutée et le volume a été ajusté à 100 ml avec le placébo. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon ODP).

La substance active a été préparée en dissolvant 37 mg OXO dans 80 ml d'eau purifiée, 10 ml de la solution d'eau oxygénée à 30% a été ajoutée et le volume a été ajusté à 100 ml avec l'eau purifiée. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon ODS).

La solution de placébo a été préparée en mélangeant 80 ml de placébo, 10 ml de la solution d'eau oxygénée à 30% et le volume total a été ajusté à 100 ml avec le placébo. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon OP).

Le produit fini (ODP), la substance active (ODS) et le placébo (OP) ont été stockés à température ambiante et ils ont été analysés le temps 0 (T0) et après 7 jours (T7).

2.2.5. Oxydation médiée par le fer ferrique 5mM

Le produit fini a été préparé en dissolvant 37 mg OXO dans 80 ml de placébo, 10,0 ml de la solution de chlorure ferrique 50 mM a été ajoutée et le volume a été ajusté à 100 ml avec le placébo. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon FDP).

La substance active a été préparée en dissolvant 37 mg OXO dans 80 ml d'eau purifiée, 10,0 ml de la solution de chlorure ferrique 50 mM a été ajoutée et le volume a été ajusté à 100 ml avec l'eau purifiée. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon FDS).

La solution de placébo a été préparée en mélangeant 80 ml de placébo et 10,0 ml de la solution de chlorure ferrique 50 mM et le volume a été ajusté à 100 ml avec le placébo. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon FP).

Le produit fini (FDP), la substance active (FDS) et le placébo (FP) ont été stockés à température ambiante et ils ont été analysés le temps 0 (T0) et après 7 jours (T7).

2.2.6. Stress photolytique

Le produit fini a été préparé en dissolvant 74 mg OXO dans une quantité suffisante pour 200 ml de placébo. Ensuite, 100 ml de cette solution a été conservée dans un flacon en verre clair pharmaceutique type III (Echantillon PhDP) et la quantité restante de la solution a été conservée dans un flacon en verre ambré brun pharmaceutique type III (Echantillon PhC).

La substance active a été préparée en dissolvant 37 mg OXO dans une quantité suffisante pour 100 ml d'eau purifiée. Ensuite, la solution a été conservée dans un flacon en verre clair pharmaceutique type III (Echantillon PhDS).

100 ml de placébo a été conservée dans un flacon en verre clair pharmaceutique type III (Echantillon PhP)

Le produit fini (PhDP), la substance active (PhDS), le placébo (PhP) et le contrôle (PhC) ont été placés sous le dispositif luminaire à une température ambiante et ils ont été analysés le temps 0 (T0) et après 14 jours (T14).

2.3. Méthode analytique

Tous les échantillons de la dégradation forcée ont été analysés selon la méthode chromatographique détaillée dans le tableau 30.

Juste avant les analyses chromatographiques, toutes les solutions de la dégradation forcée ont été diluées à raison de 3 ml dans 10 ml de diluant (phase mobile), puis filtrées par un filtre seringue en nylon de porosité de 0,45µm.

3. Résultats et Discussion

Dans cette section, Les pics non identifiées sont codées par l'acronyme RT suivi de leur temps de rétention.

3.1. Stress thermique

Au temps 0

Le chromatogramme de la substance active TDS0 (Figure 20a) révèle la présence d'un pic à RT6.7. Ce pic est également observable dans les chromatogrammes du produit fini TDP0 et du placebo TP0 (Figure 20b et 20c). On peut donc conclure que le pic à RT6.7 ne correspond pas à une impureté provenant de la synthèse du principe actif.

À l'exception du pic correspondant à la substance active, les pics présents dans le chromatogramme du produit fini TDP0 (Figure 20b) tels que le méthyle parabène à RT5.5, le RT6.7, le propyle parabène à RT22.8 et le RT32.5 sont également présents dans le chromatogramme du placebo (Figure 20c). Ceci indique qu'il n'y a pas d'interaction entre la substance active et les excipients.

Après 21 jours

Aucun pic dépassant la limite d'exclusion n'apparaît dans le chromatogramme de la substance active TDS21 (Figure 20d).

Trois pics (RT2.9, RT3.3 et RT3.4) du chromatogramme du produit fini TDP21 (Figure 20e) sont également présents dans le chromatogramme du placebo TP21 (Figure 20f). Ces pics proviennent de la dégradation des excipients et non de la substance active.

Bilan massique

Au temps 0, l'aire du pic OXO dans le chromatogramme de la substance active TDS0 (Figure 20a) est de 18.730.884. Après 21 jours de stress thermique, l'aire du pic OXO dans le chromatogramme de la substance active TDS21 (Figure 20d) atteint 19.266.946, soit 102,86% de la valeur initiale au temps 0. Cette augmentation peut être expliquée par la variabilité inhérente à la méthode analytique utilisée [30,39,40].

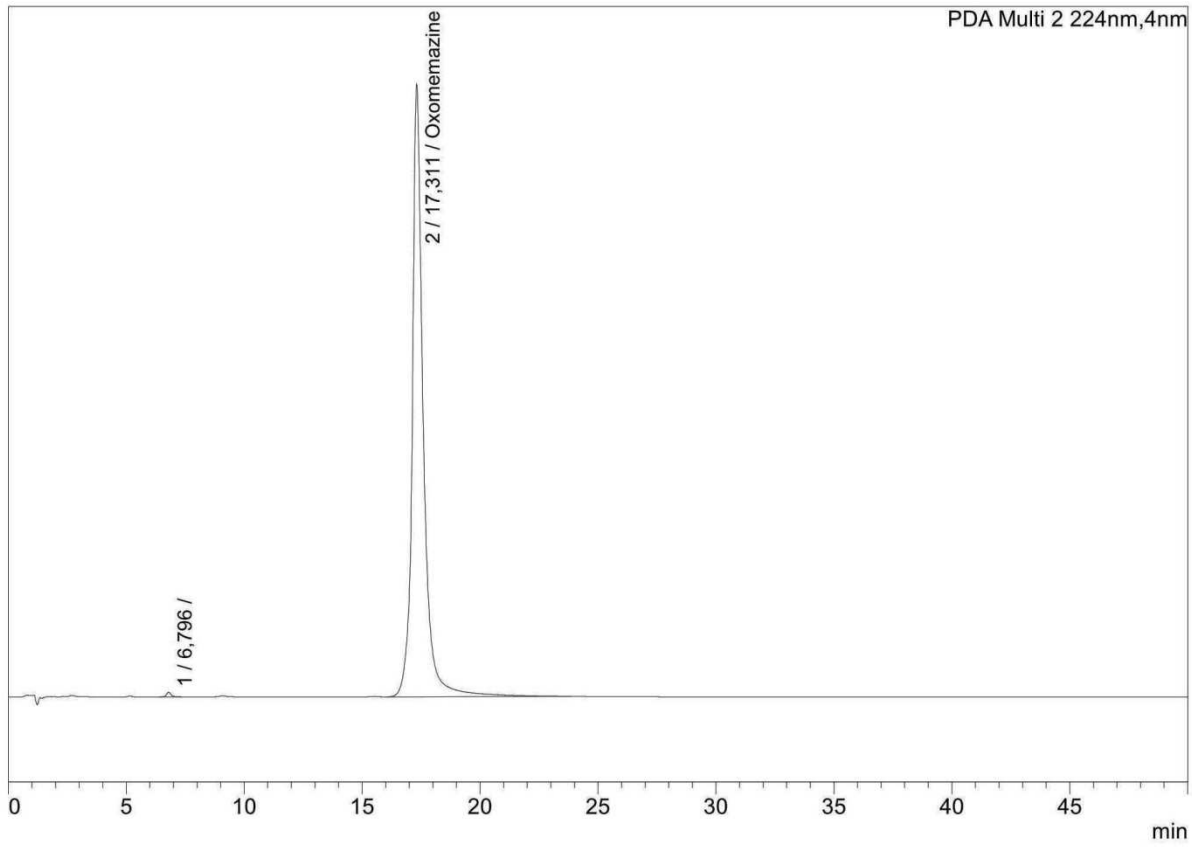
Au temps 0, l'aire du pic OXO dans le chromatogramme du produit fini TDP0 (Figure 20b) est de 19.228.190. Après 21 jours de stress thermique, l'aire du pic OXO dans le chromatogramme de la substance active TDP21 (Figure 20e) est de 18.993.583, représentant 98,78% de la valeur initiale au temps 0. Cette diminution est également attribuée à la variabilité de la méthode analytique utilisée [30,39,40].

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : TDS0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING TEMPERATURE.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		6,796	58188	--	--
2	Oxomemazine	17,311	18730884	1,244	9148

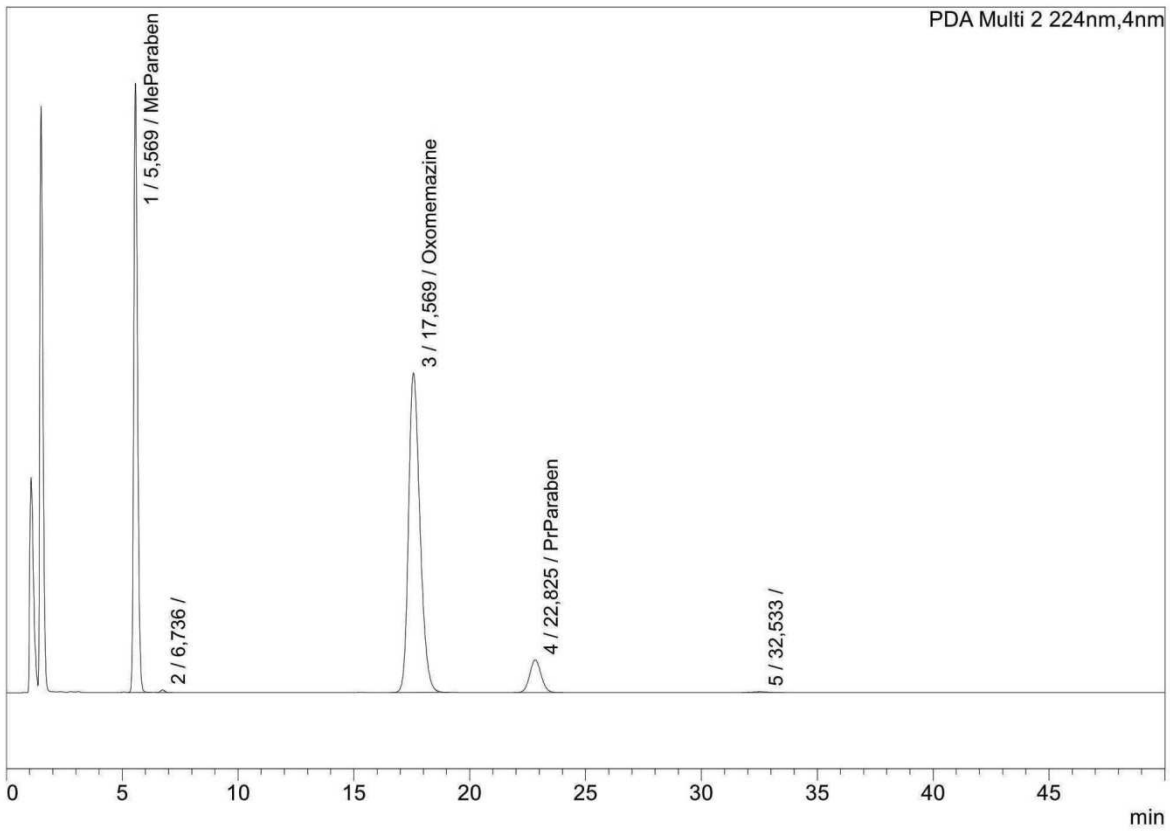
Figure 20a. Rapport d'analyse de la substance active sous stress thermique au temps0 (Echantillon TDS0)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : TDP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING TEMPERATURE.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,569	12290987	1,239	5709
2		6,736	55281	--	--
3	Oxomemazine	17,569	19228190	1,268	6251
4	PrParaben	22,825	2015881	1,073	10332
5		32,533	70565	--	--

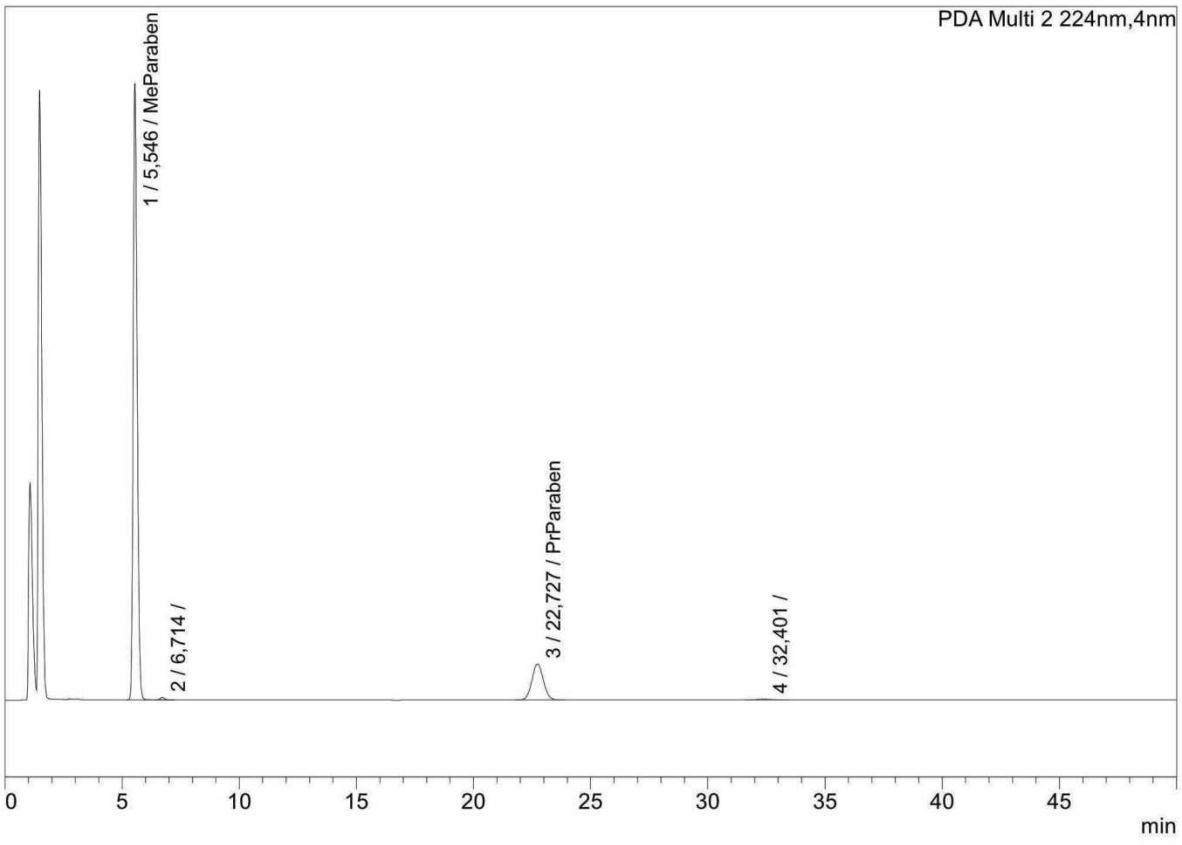
Figure 20b. Rapport d'analyse du produit fini sous stress thermique au temps0 (Echantillon TDP0)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : TP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING TEMPERATURE.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,546	12838869	1,241	5135
2		6,714	54563	--	--
3	PrParaben	22,727	2172398	1,058	10408
4		32,401	72705	--	--

Figure 20c. Rapport d'analyse du placébo sous stress thermique au temps 0 (Echantillon TP0)

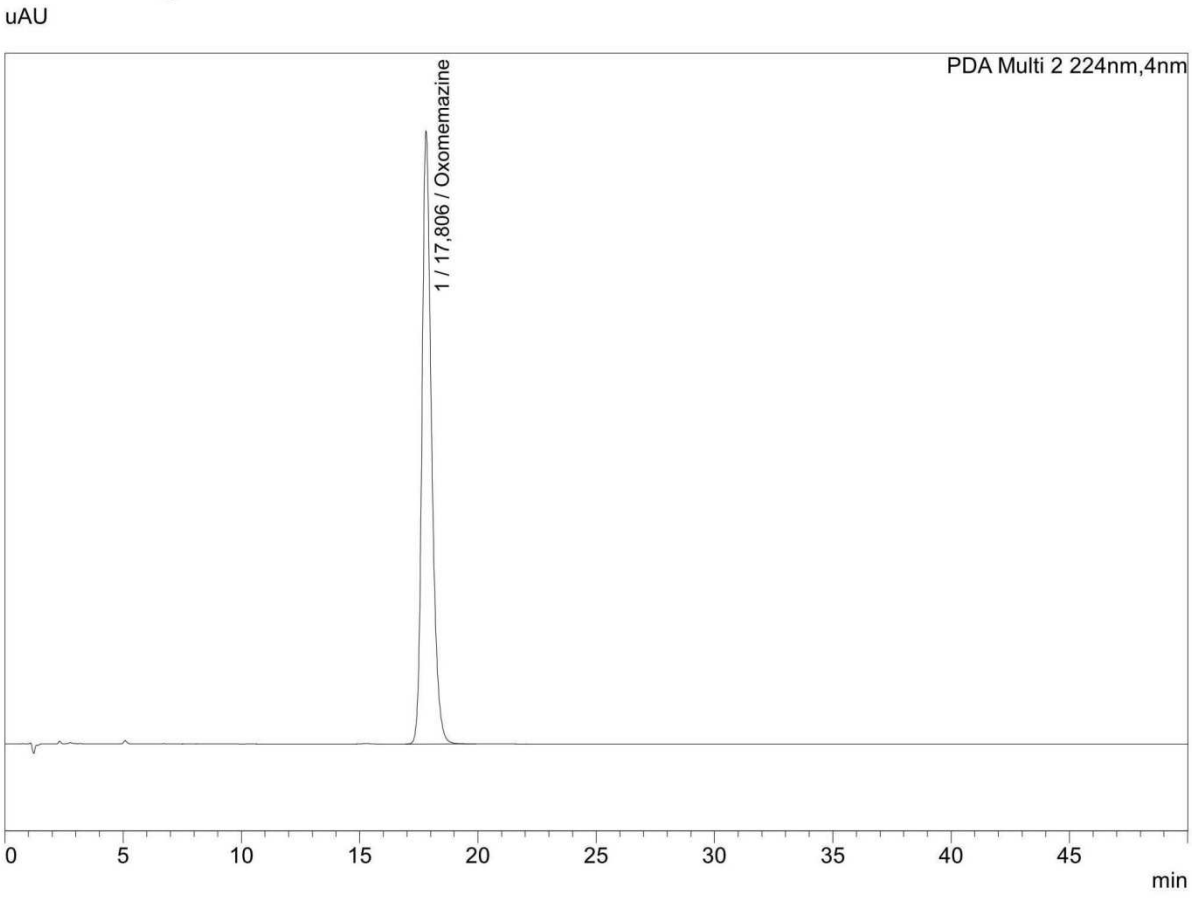
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : TDS21.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING TEMPERATURE.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	Oxomemazine	17,806	19266946	1,297	9996

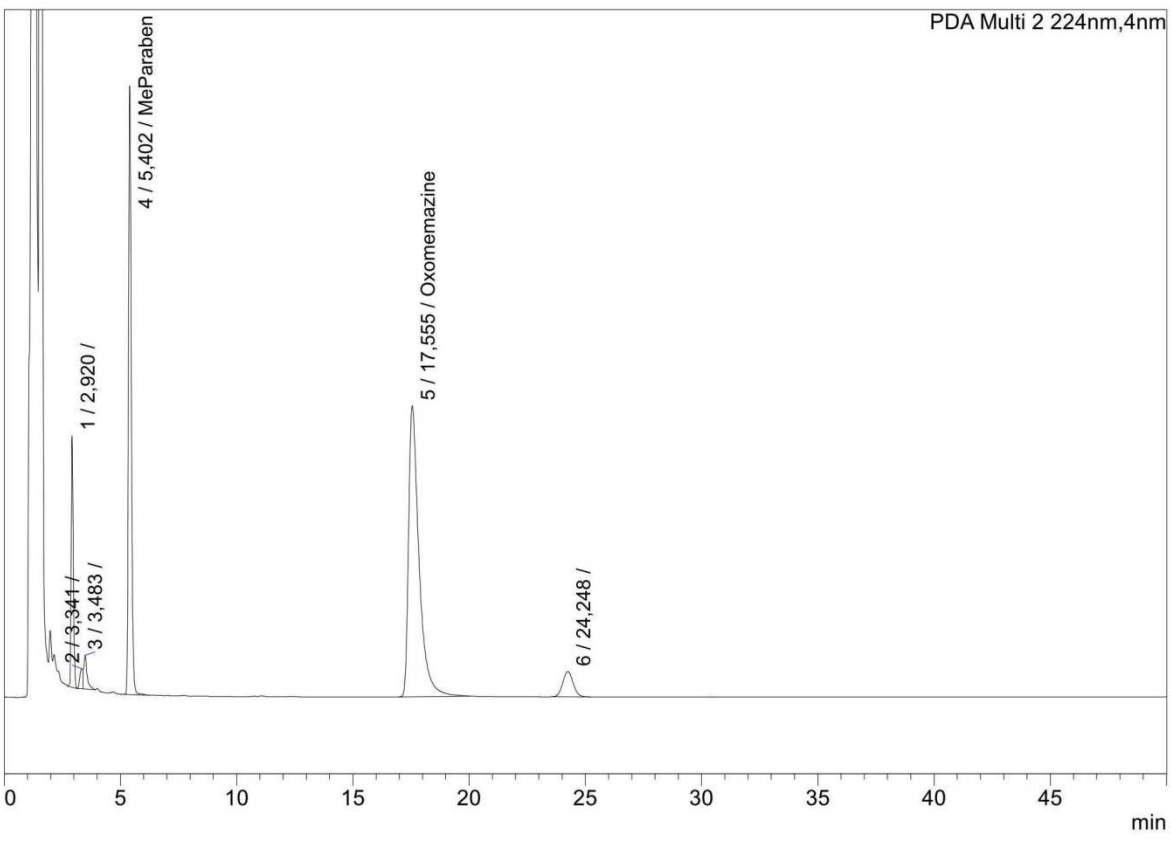
Figure 20d. Rapport d'analyse de la substance active sous stress thermique après 21 jours (Echantillon TDS21)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : TDP21.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING TEMPERATURE.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		2,920	612176	--	--
2		3,341	70412	--	--
3		3,483	129338	--	--
4	MeParaben	5,402	11980452	1,233	9742
5	Oxomemazine	17,555	18993583	1,816	8558
6	PrParaben	24,248	2303593	--	--

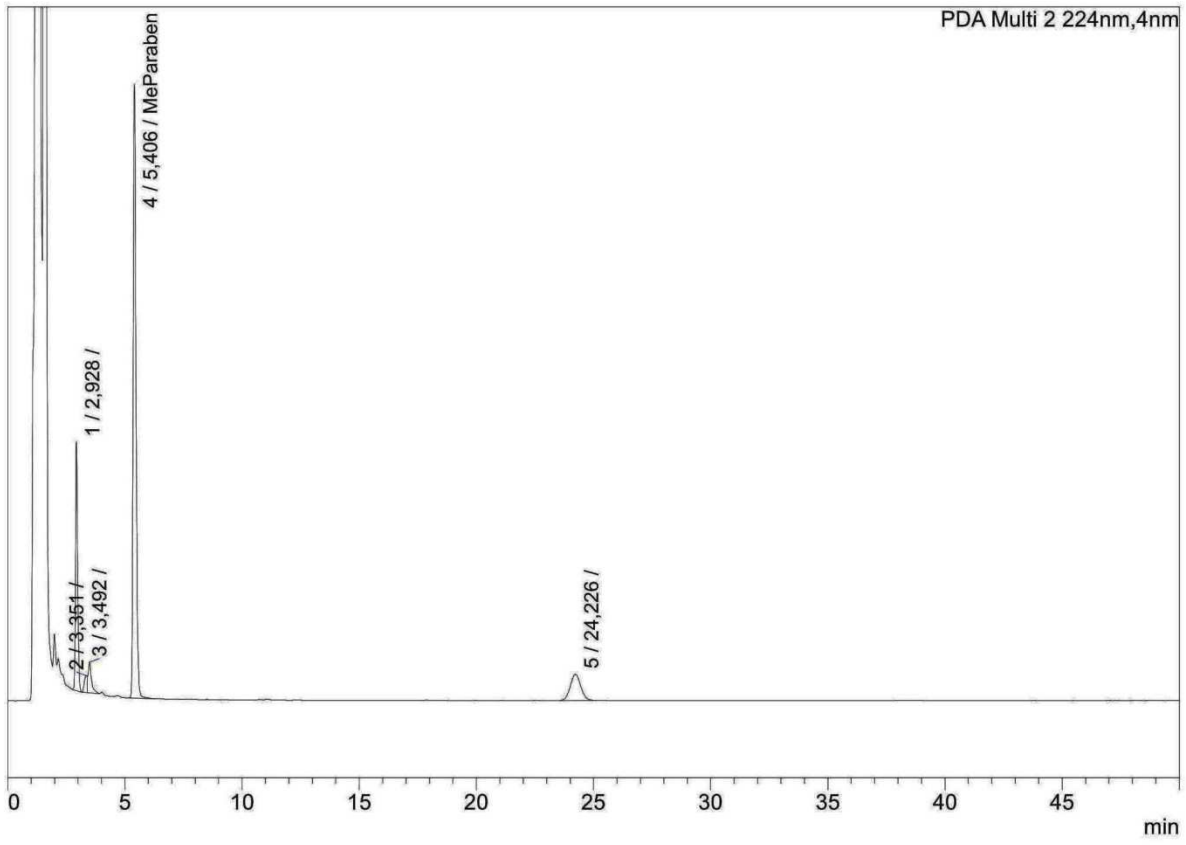
Figure 20e. Rapport d'analyse du produit fini sous stress thermique après 21 jours (Echantillon TDP21)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : TP21.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING TEMPERATURE.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		2,928	567262	--	--
2		3,351	55688	--	--
3		3,492	105760	--	--
4	MeParaben	5,406	11863966	1,238	9920
5	PrParaben	24,226	2294209	--	--

Figure 20f. Rapport d'analyse du placébo sous stress thermique après 21 jours (Echantillon TP21)

3.2. Hydrolyse acide

Au temps 0

Le chromatogramme de la substance active ADS0 (Figure 21a) ne présente aucun pic dont l'aire dépasse la limite d'exclusion.

À l'exception du pic correspondant à la substance active, les pics présents dans le chromatogramme du produit fini ADP0 (Figure 21b), tels que le méthyle parabène à RT5.5, le RT6.7, le propyle parabène à RT22.8 et le RT32.4, sont également observés dans le chromatogramme du placebo AP0 (Figure 21c). Cela suggère l'absence d'interaction entre la substance active et les excipients.

Après 7 jours

Aucun pic dépassant la limite d'exclusion n'apparaît dans le chromatogramme de la substance active ADS7 (Figure 21d).

Dans le chromatogramme du produit fini ADP7 (Figure 21e), on observe une disparition totale des pics du méthyle parabène et du propyle parabène. Cette observation est attribuée à l'hydrolyse acide de ces deux parabènes, formant un seul produit de dégradation, l'acide p-hydroxybenzoïque. L'élution de cet acide commence au temps mort, probablement en raison de l'ionisation totale de l'acide à pH 7 de la phase mobile. Le pic OXO à RT17.01 reste présent, présentant une bonne allure chromatographique.

Dans le chromatogramme du placebo AP7 (Figure 21f), on observe également une disparition totale des pics du méthyle parabène et du propyle parabène. Mis à part le pic de la substance active, les chromatogrammes du produit fini ADP7 et du placebo AP7 présentent la même empreinte chromatographique, confirmant ainsi l'hypothèse de l'hydrolyse des conservateurs.

Bilan massique

Au temps 0, l'aire du pic OXO dans le chromatogramme de la substance active ADS0 (Figure 21a) est de 21.687.850. Après 7 jours sous stress acide, l'aire du pic OXO dans le chromatogramme de la substance active ADS7 (Figure 21d) atteint 21.502.416, représentant 99,14% de la valeur initiale au temps 0. Cette diminution peut être expliquée par la variabilité inhérente à la méthode analytique utilisée [30,39,40].

Au temps 0, l'aire du pic OXO dans le chromatogramme du produit fini ADP0 (Figure 21b) est de 19.333.066. Après 7 jours de stress acide, l'aire du pic OXO dans le chromatogramme de la substance active ADP7 (Figure 21e) est de 15.180.255, représentant 78,52% de la valeur initiale au temps 0. Cette nette diminution est due à l'interférence de l'hydrolyse des parabènes. En fait, avant l'élution du pic OXO, la ligne de base n'était pas au niveau zéro (Figure 21e).

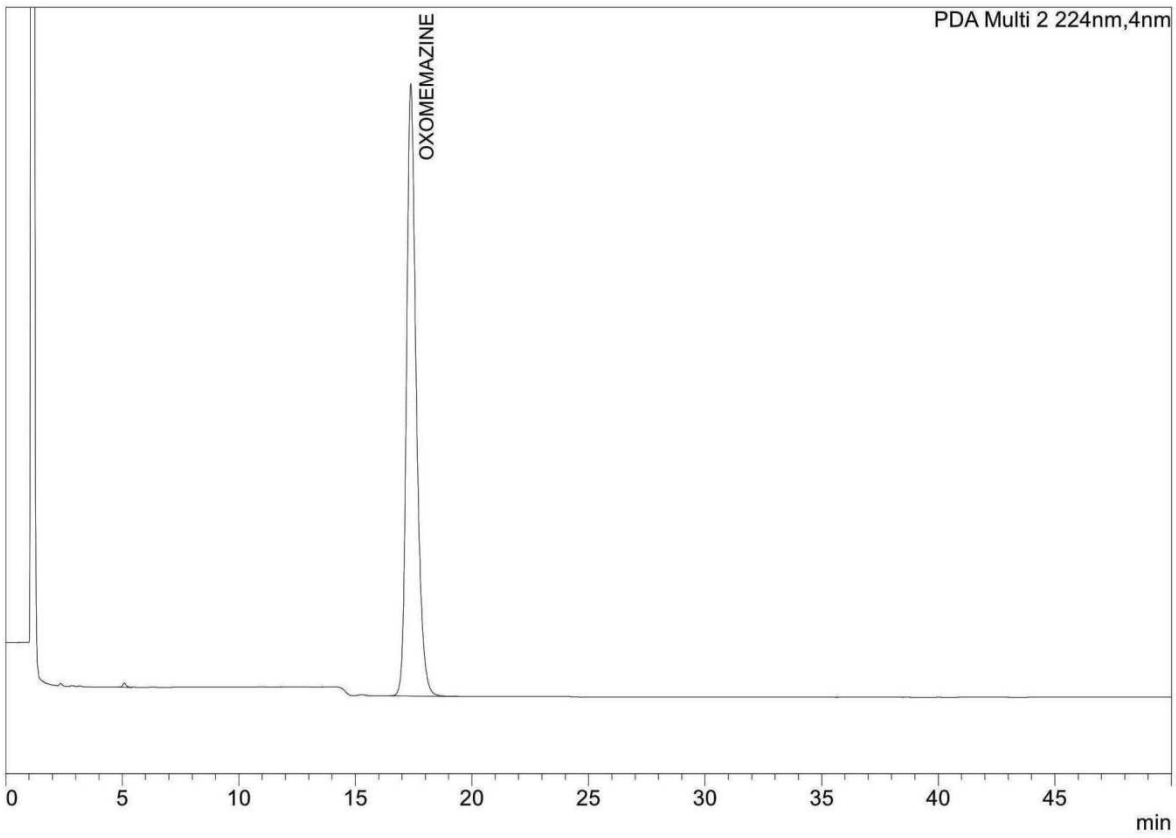
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : ADS0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST AH.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	OXOMEMAZINE	16,744	21687850	2,031	1010

Figure 21a. Rapport d'analyse de la substance active sous hydrolyse acide au temps 0 (Echantillon ADS0)

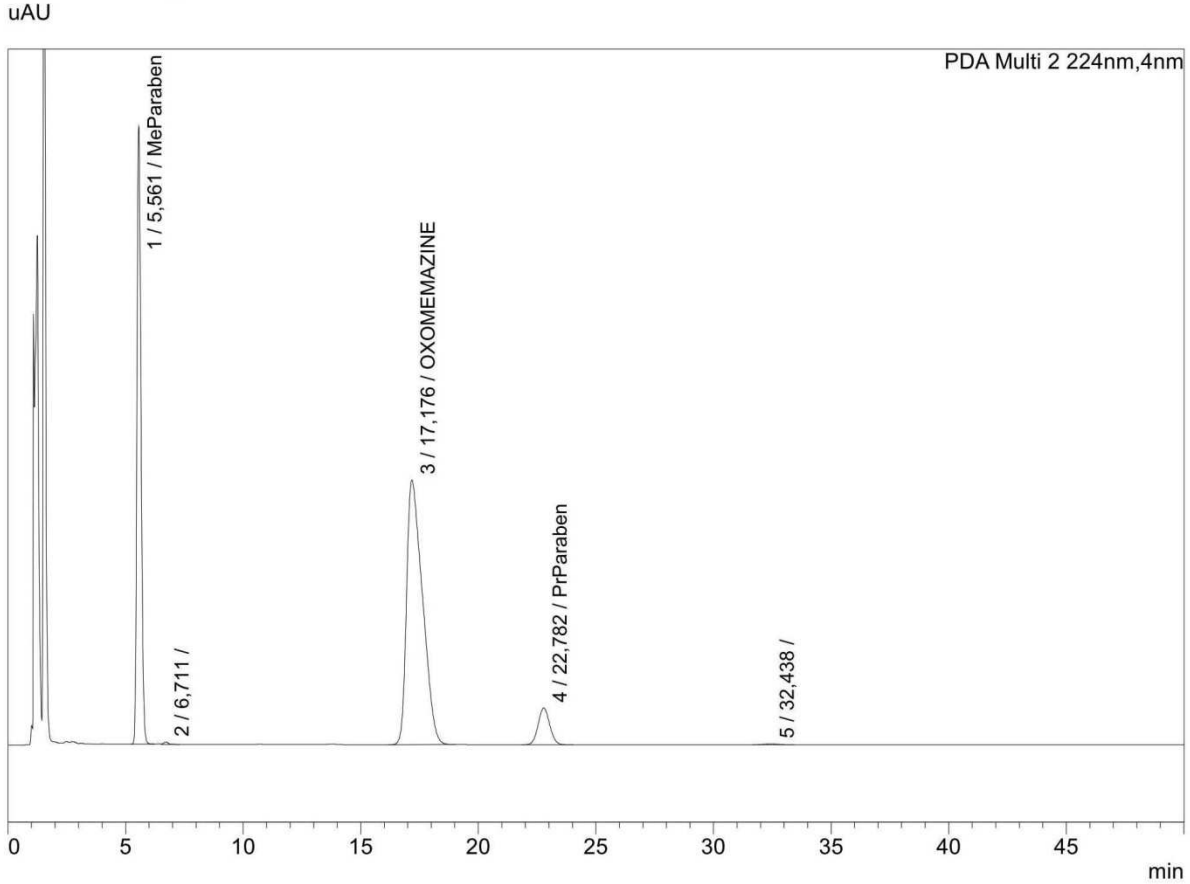
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : ADP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST AH.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,561	11550933	1,230	4886
2		6,711	48768	--	--
3	OXOMEMAZINE	17,176	19333066	1,581	2887
4	PrParaben	22,782	1963113	1,068	10262
5		32,438	62396	--	--

Figure 21b. Rapport d'analyse du produit fini sous hydrolyse acide au temps 0 (Echantillon ADP0)

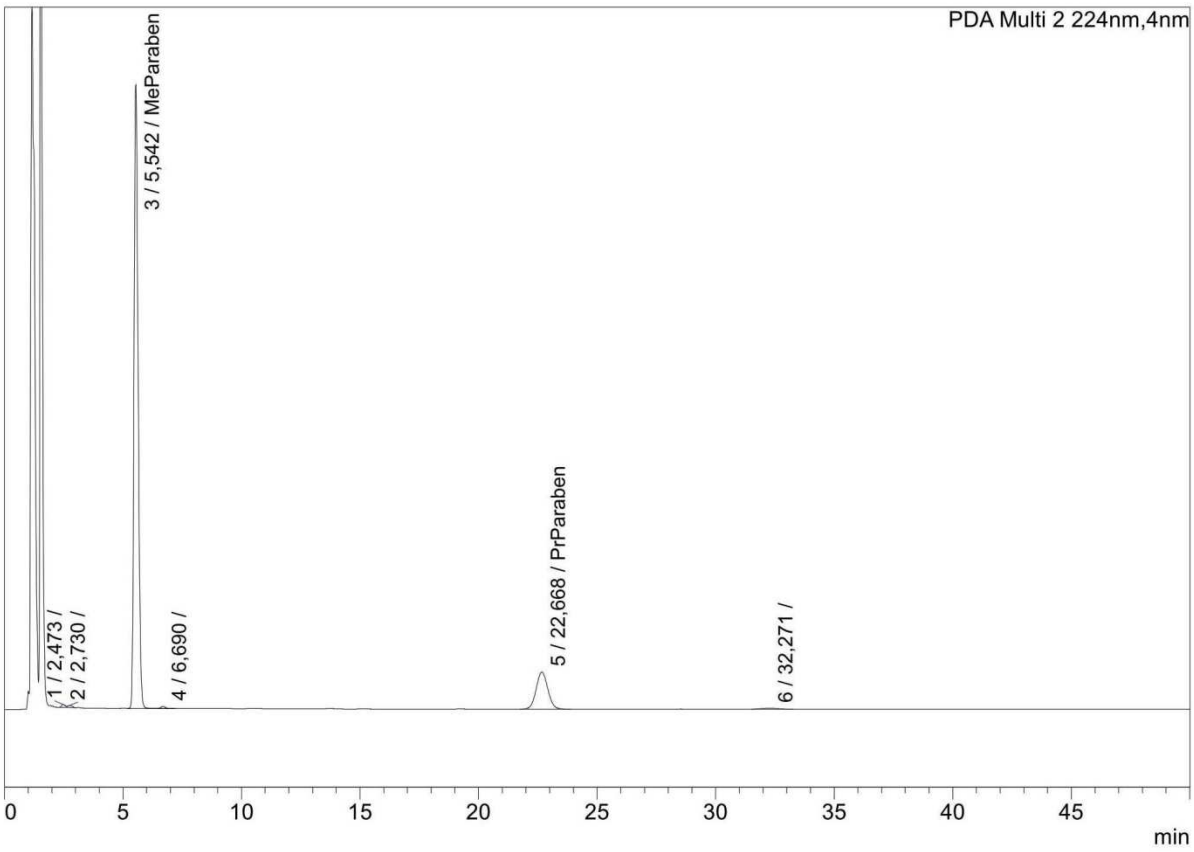
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : AP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST AH.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		2,473	48600	--	--
2		2,730	42305	--	--
3	MeParaben	5,542	11572164	1,226	4940
4		6,690	42839	--	--
5	PrParaben	22,668	1956257	1,055	10413
6		32,271	63148	--	--

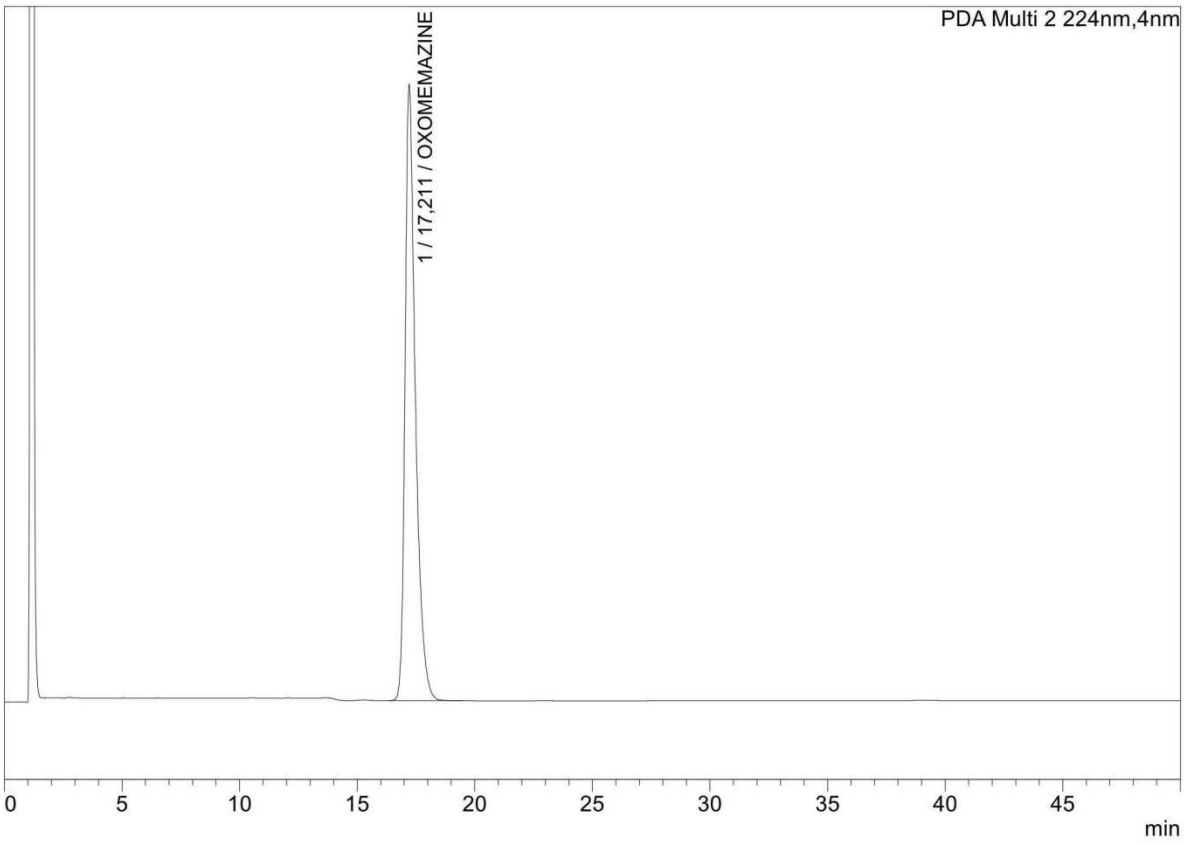
Figure 21c. Rapport d'analyse du placébo sous hydrolyse acide au temps 0 (Echantillon AP0)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : ADS7 REP1.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST AH.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	OXOMEMAZINE	17,211	21502416	1,455	8326

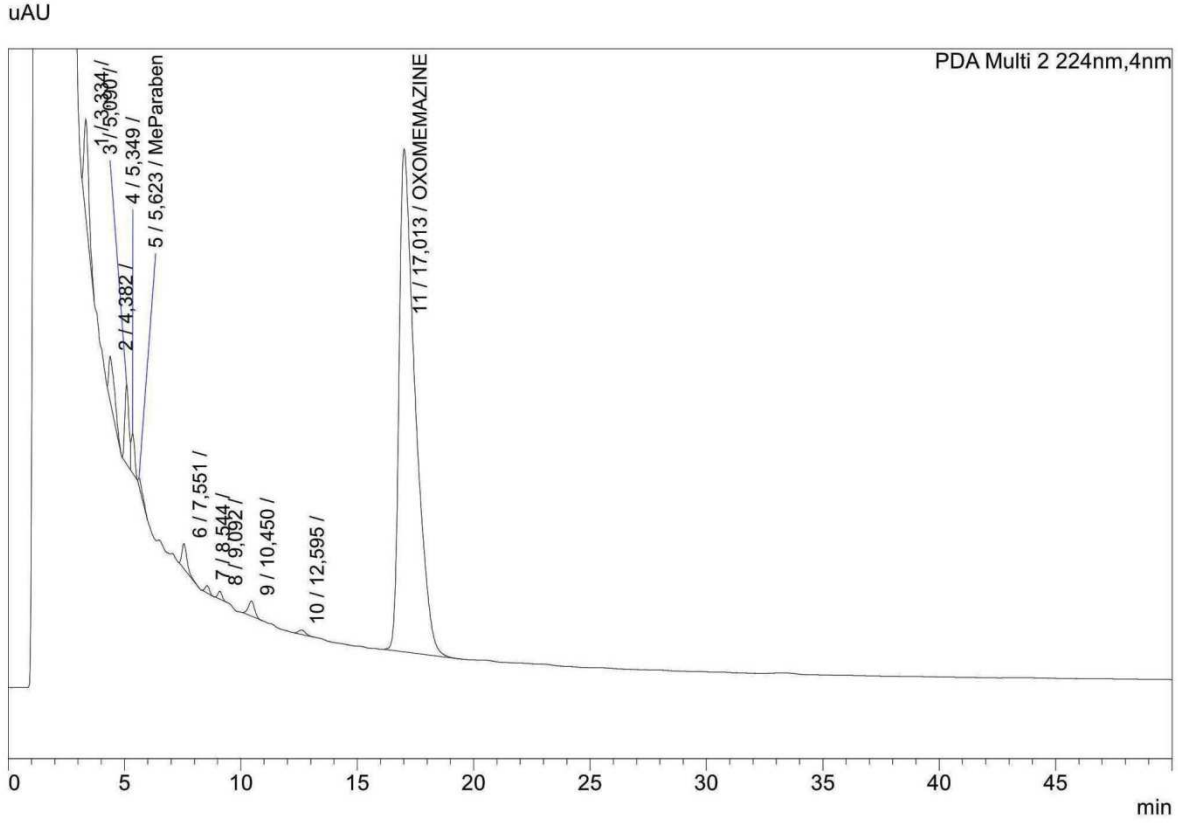
Figure 21d. Rapport d'analyse de la substance active sous hydrolyse acide après 7 jours (Echantillon ADS7)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : ADP7 REP1.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST AH.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		3,334	868293	--	--
2		4,382	508183	--	--
3		5,090	603076	--	--
4		5,349	256661	--	--
5	MeParaben	5,623	72873	3,124	2677
6		7,551	241654	--	--
7		8,544	57619	--	--
8		9,092	59779	--	--
9		10,450	175823	--	--
10		12,595	54418	--	--
11	OXOMEMAZINE	17,013	15180255	1,813	3105

Figure 21e. Rapport d'analyse du produit fini sous hydrolyse acide après 7 jours (Echantillon ADP7)

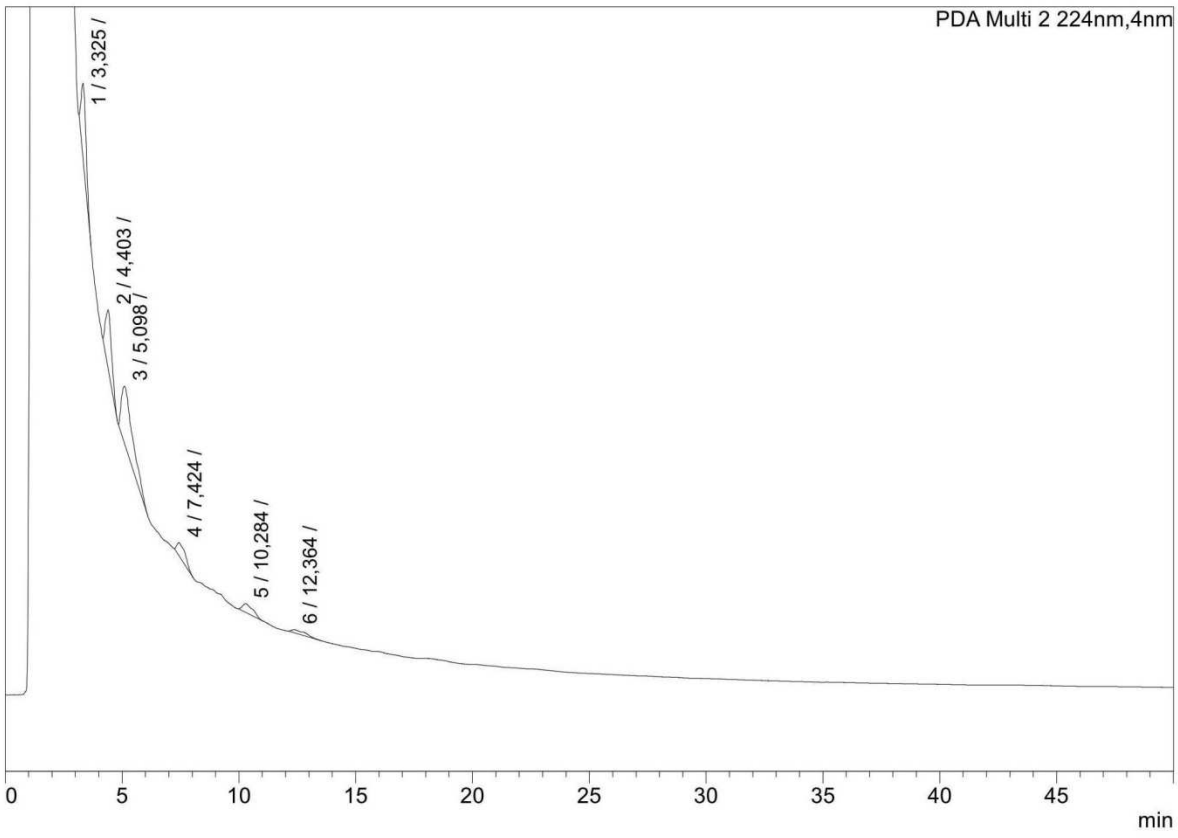
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : AP7.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST AH.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		3,325	593350	--	--
2		4,403	565284	--	--
3		5,098	1054552	--	--
4		7,424	196920	--	--
5		10,284	153109	--	--
6		12,364	83549	--	--

Figure 21f. Rapport d'analyse du placébo sous hydrolyse acide après 7 jours (Echantillon AP7)

3.3. Hydrolyse basique

Au temps 0

Le chromatogramme de la substance active BDS0 (Figure 22a) ne présente aucun pic dont l'aire dépasse la limite d'exclusion.

À l'exception du pic correspondant à la substance active, les pics observés dans le chromatogramme du produit fini BDP0 (Figure 22b), tels que le méthyle parabène à RT5.5, le RT6.7, le propyle parabène à RT22.6 et le RT32.2, sont également présents dans le chromatogramme du placebo BP0 (Figure 22c). Cela suggère l'absence d'interaction entre la substance active et les excipients.

Après 7 jours

Aucun pic dépassant la limite d'exclusion n'apparaît dans le chromatogramme de la substance active BDS7 (Figure 22d).

Dans le chromatogramme du produit fini BDP7 (Figure 22e), les trois pics du méthyle parabène à RT5.5, de la SA à RT17.6 et du propyle parabène à RT22.4 sont présents et intacts. Les conservateurs n'ont pas subi d'hydrolyse alcaline, probablement en raison du rôle de l'Acetonitrile ajouté à raison de 30% pour solubiliser la substance active.

De même pour le placebo BP7 (Figure 22f), les parabènes n'ont pas subi d'hydrolyse alcaline. Cependant, les parabènes ont présenté un dédoublement de leurs pics. La pureté des pics a été vérifiée en comparant les spectres UV-Visible entre 200 nm et 400 nm du début, milieu et fin du pic, et ils étaient superposables. L'origine de ce phénomène était une contamination par un métal, qui sera discutée ultérieurement.

Bilan massique

Au temps 0, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme BDS0 (Figure 22a) est de 19.776.582. Après 7 jours sous stress basique, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme BDS7 (Figure 22d) atteint 20.353.564, représentant 102,92% de la valeur initiale au temps 0. Cette augmentation peut être expliquée par la variabilité inhérente à la méthode analytique utilisée [30,39,40].

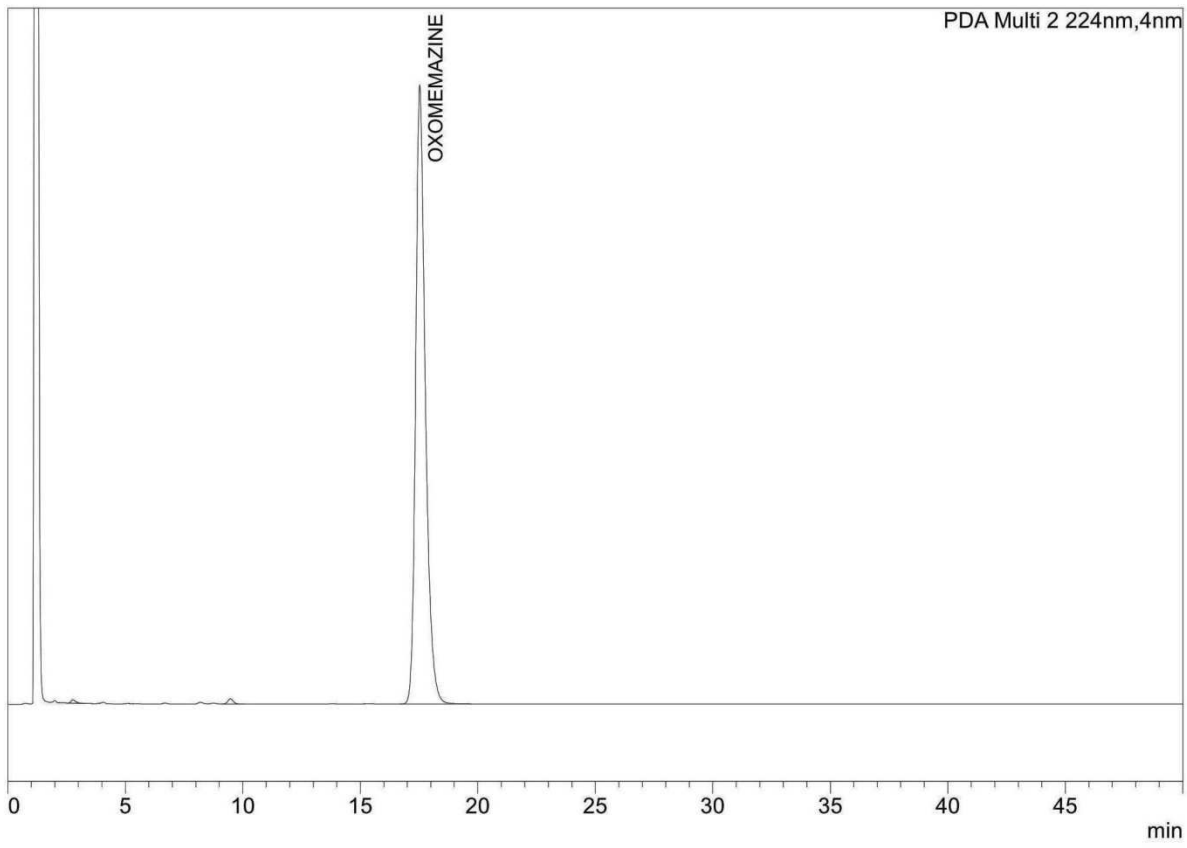
Au temps 0, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme du produit fini BDP0 (Figure 22b) est de 19.766.882. Après 7 jours de stress basique, l'aire du pic de la substance active dans le chromatogramme BDP7 (Figure 22e) est de 20.483.563, représentant 103,63% de la valeur initiale au temps 0. Cette augmentation peut être expliquée par la variabilité inhérente à la méthode analytique utilisée [30,39,40].

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : BDS0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING BASE HYDROLYSIS.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	OXOMEMAZINE	17,765	19776582	1,314	7605

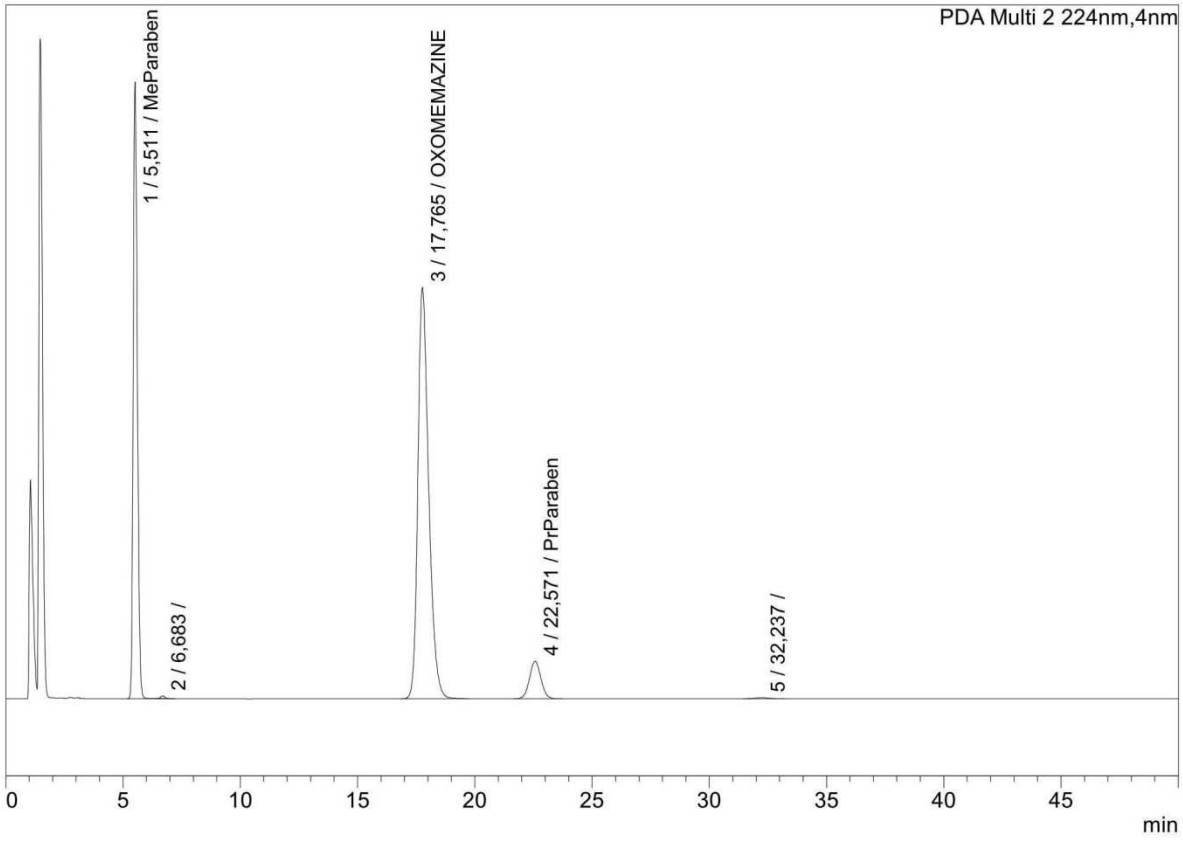
Figure 22a. Rapport d'analyse de la substance active sous hydrolyse basique au temps0 (Echantillon BDS0)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : BDP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING BASE HYDROLYSIS.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,511	11248638	1,238	4746
2		6,683	50430	--	--
3	OXOMEMAZINE	17,765	19766882	1,314	7605
4	PrParaben	22,571	1902536	1,040	10356
5		32,237	62944	--	--

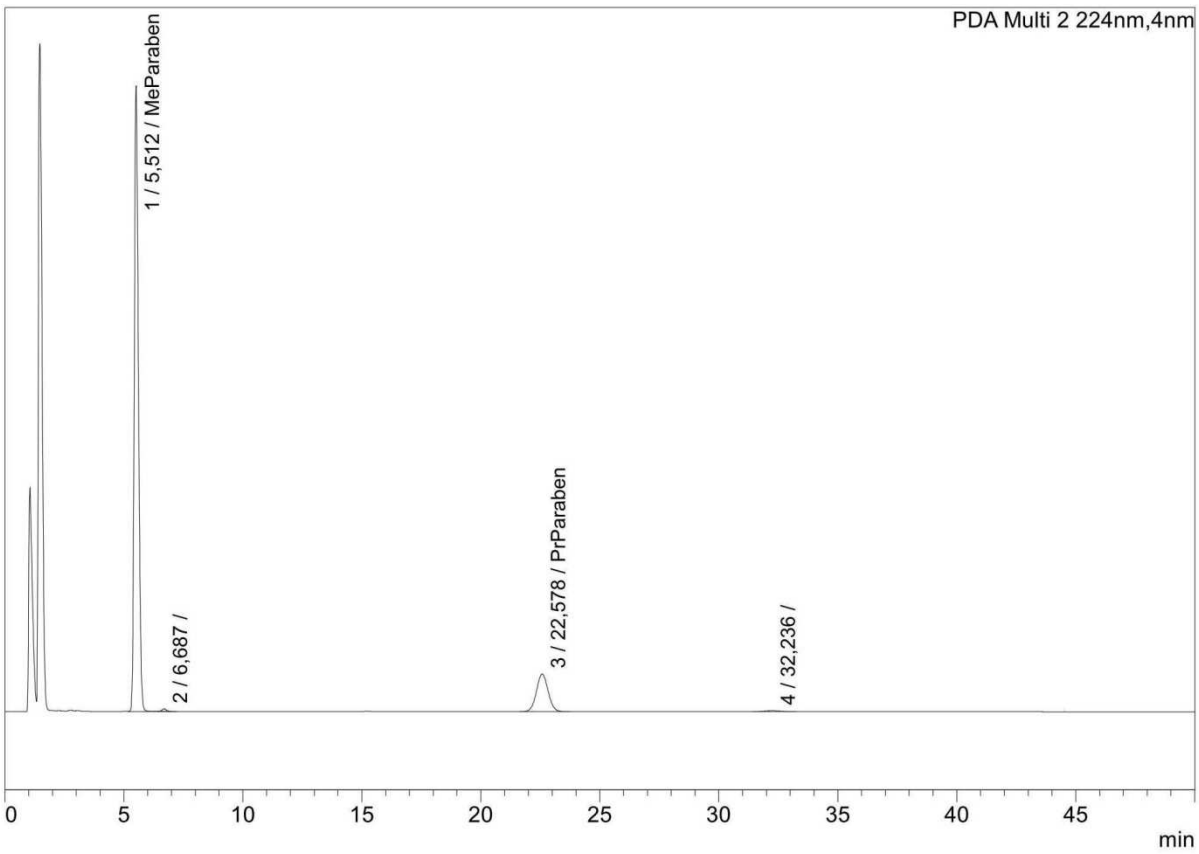
Figure 22b. Rapport d'analyse du produit fini sous hydrolyse basique au temps 0 (Echantillon BDP0)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : BP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING BASE HYDROLYSIS.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,512	11224846	1,230	4725
2		6,687	47803	--	--
3	PrParaben	22,578	1889025	1,037	10259
4		32,236	63770	--	--

Figure 22c. Rapport d'analyse du placébo sous hydrolyse basique au temps0 (Echantillon BP0)

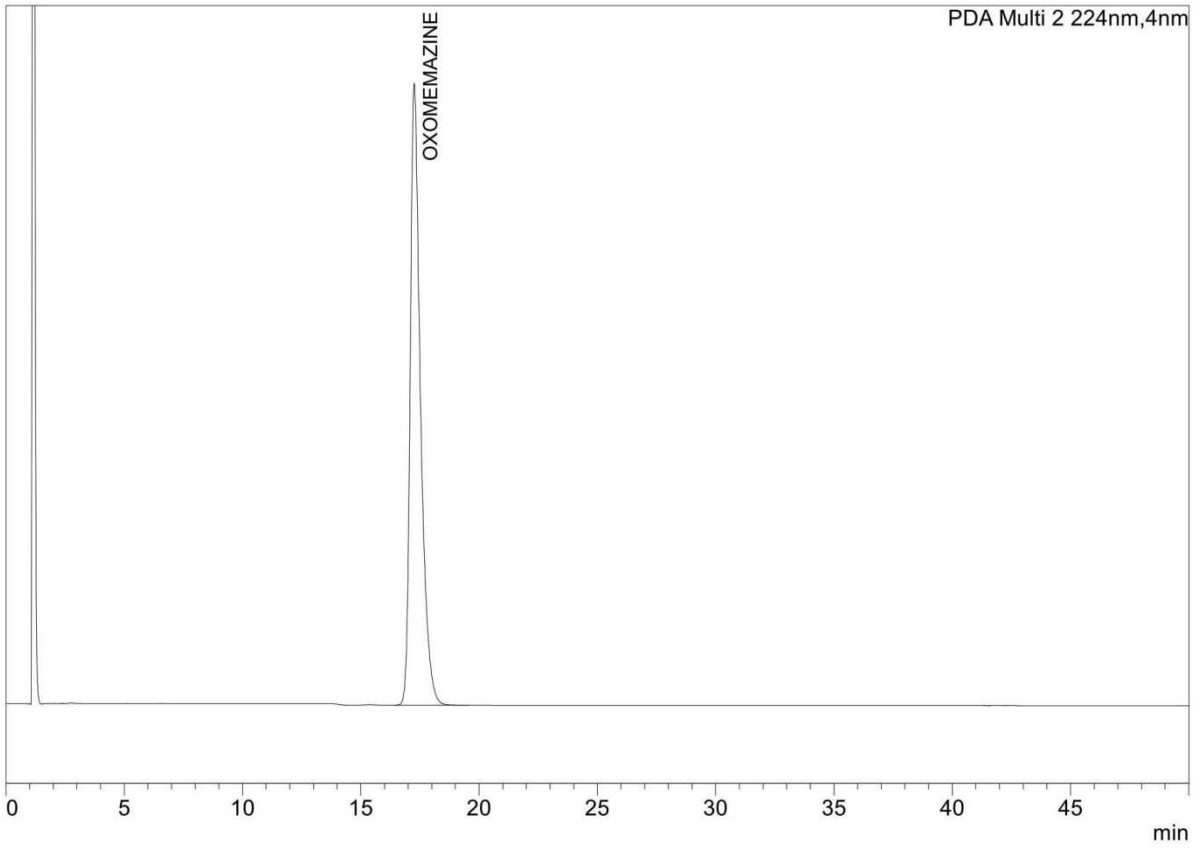
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : BDS7.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING BASE HYDROLYSIS.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	OXOMEMAZINE	17,564	20353564	1,079	4030

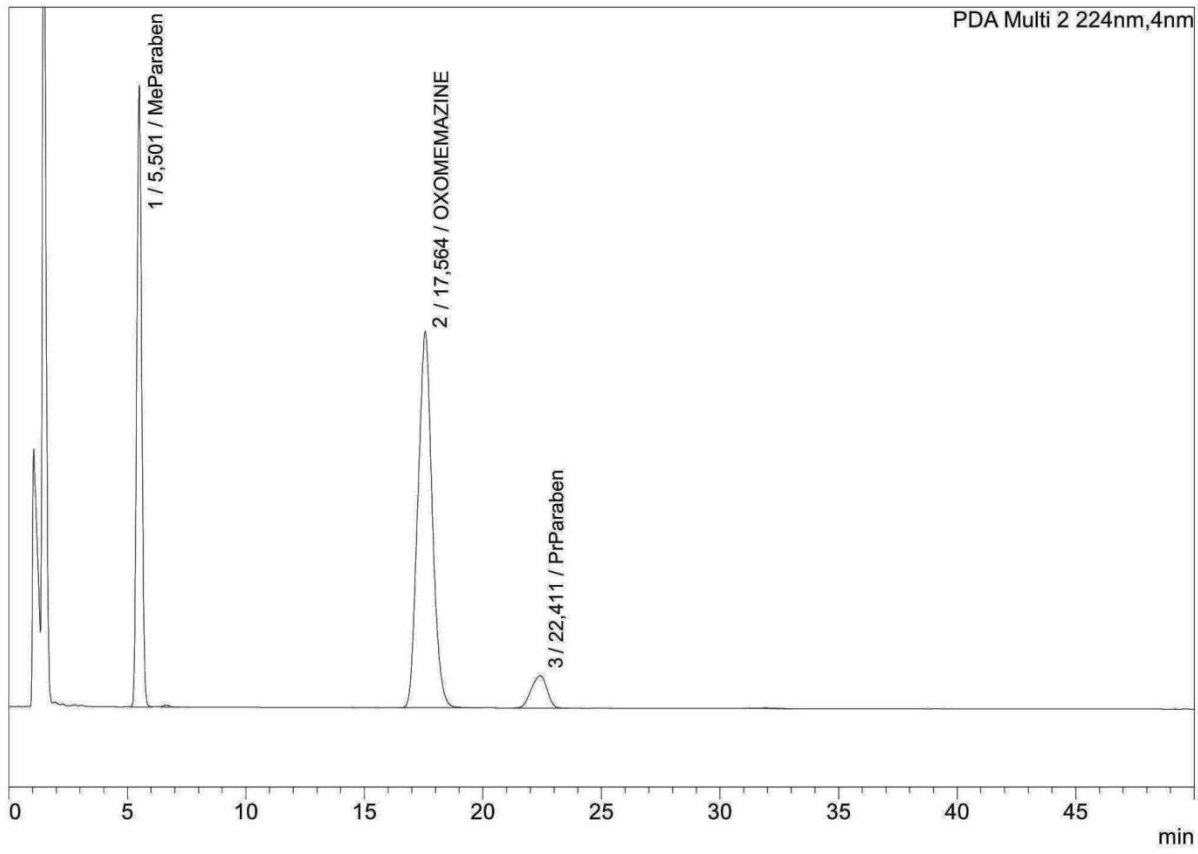
Figure 22d. Rapport d'analyse de la substance active sous hydrolyse basique après 7 jours (Echantillon BDS7)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : BDP7 REP1.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING BASE HYDROLYSIS.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,501	11607063	1,052	3255
2	OXOMEMAZINE	17,564	20483563	1,079	4030
3	PrParaben	22,411	1940503	0,918	4986

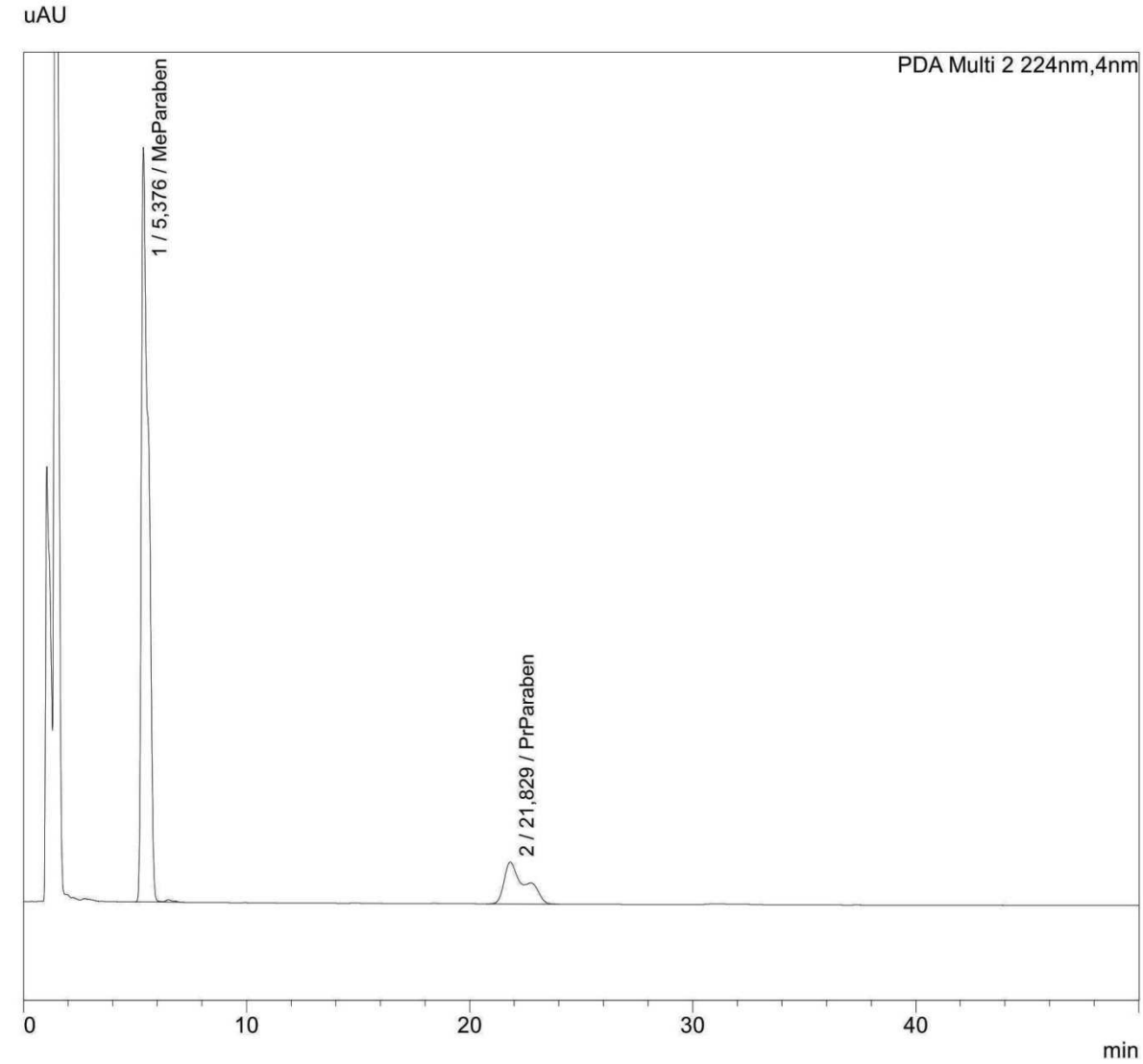
Figure 22e. Rapport d'analyse du produit fini sous hydrolyse basique après 7 jours (Echantillon BDP7)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : BP7.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:STRESS TESTING BASE HYDROLYSIS.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,376	11575437	1,697	1026
2	PrParaben	21,829	1925416	1,785	4491

Figure 22f. Rapport d'analyse du placébo sous hydrolyse basique après 7 jours (Echantillon BP7)

3.4. Oxydation médiée par peroxyde d'hydrogène

Au temps 0

Le chromatogramme de la substance active ODS0 (Figure 23a) révèle, en plus du pic de la SA à RT17.5, deux autres pics à RT5.1 et RT9.5.

À l'exception du pic correspondant à la substance active, les pics observés dans le chromatogramme du produit fini ODP0 (Figure 23b), tels que le méthyle parabène à RT5.5, le RT6.7, le propyle parabène à RT22.7 et le RT32.4, sont également présents dans le chromatogramme du placebo OP0 (Figure 23c). Cela suggère l'absence d'interaction entre la substance active et les excipients.

Le chromatogramme du placebo montre un pic à RT15.2 (Figure 23c) absent dans la SA ODS0 et le produit fini ODP.

Après 7 jours

Dans le chromatogramme de la substance active ODS7 (Figure 23d), on observe :

- La disparition du pic RT5.1 initialement présent à T0.
- La présence du pic RT2.8 dans le chromatogramme du placebo OP7 (Figure 23f).
- La persistance du pic RT9.5 initialement présent à T0. Son aire passe de 46,931 à T0 (0,24% de la SA) à 92,832 après 7 jours (0,48% de la SA). Cette faible augmentation de l'ordre de 0,24% peut être attribuée à une variabilité analytique ou à une dégradation.

Dans le chromatogramme du produit fini ODP7 (Figure 23e), l'absence du pic RT9.5 du ODS7 favorise l'hypothèse de la variance de la méthode. Le pic RT2.8 est également présent dans le chromatogramme du placebo OP7 (Figure 23f), ainsi qu'un pic RT6.7, qui est également présent dans le chromatogramme ODP0 (Figure 23b).

Dans le chromatogramme du placebo OP7 (Figure 23f), le propyle parabène présente un dédoublement de son pic.

La pureté de ce dernier a été vérifiée en comparant les spectres UV-Visible entre 200 nm et 400 nm du début, milieu et fin du pic, et ils étaient superposables. L'origine de ce phénomène était une contamination par un métal, qui sera discutée ultérieurement.

Bilan massique

Au temps 0, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme ODS0 (Figure 23a) est de 19.756.282. Après 7 jours sous stress oxydatif par peroxyde d'hydrogène à température ambiante, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme ODS7 (Figure 23d) atteint 19.306.932, représentant 97,72% de la valeur initiale au temps 0. Cette diminution peut être expliquée par la variabilité inhérente à la méthode analytique utilisée [30,39,40].

Au temps 0, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme du produit fini ODP0 (Figure 23b) est de 20.874.374. Après 7 jours sous stress oxydatif par peroxyde d'hydrogène à température ambiante, l'aire du pic de la substance active dans le chromatogramme ODP7 (Figure 23e) est de 20.661.094, représentant 98,98% de la valeur initiale au temps 0. Cette augmentation peut être expliquée par la variabilité inhérente à la méthode analytique utilisée [30,39,40].

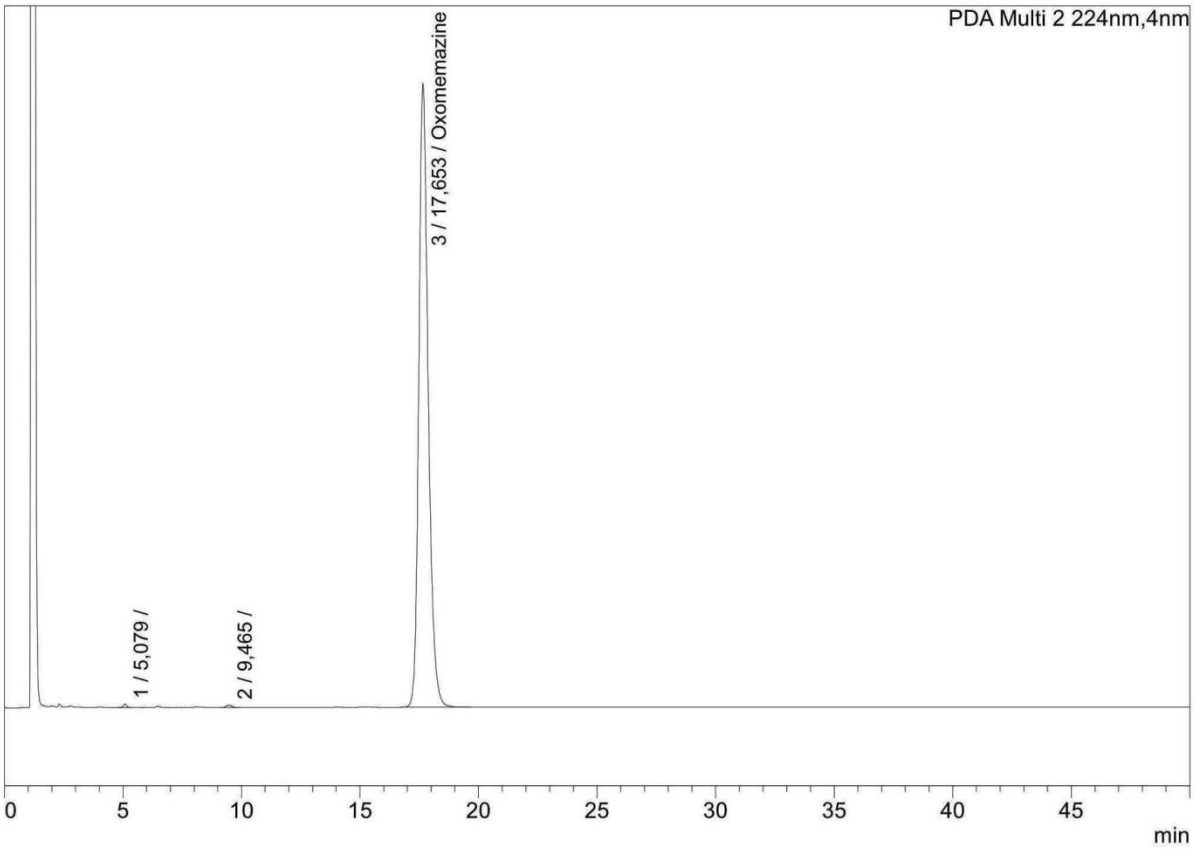
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : ODS0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST O.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		5,079	41403	--	--
2		9,465	46931	--	--
3	Oxomemazine	17,653	19756282	1,260	10153

Figure 23a. Rapport d'analyse de la substance active sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène au temps0 (Echantillon ODS0)

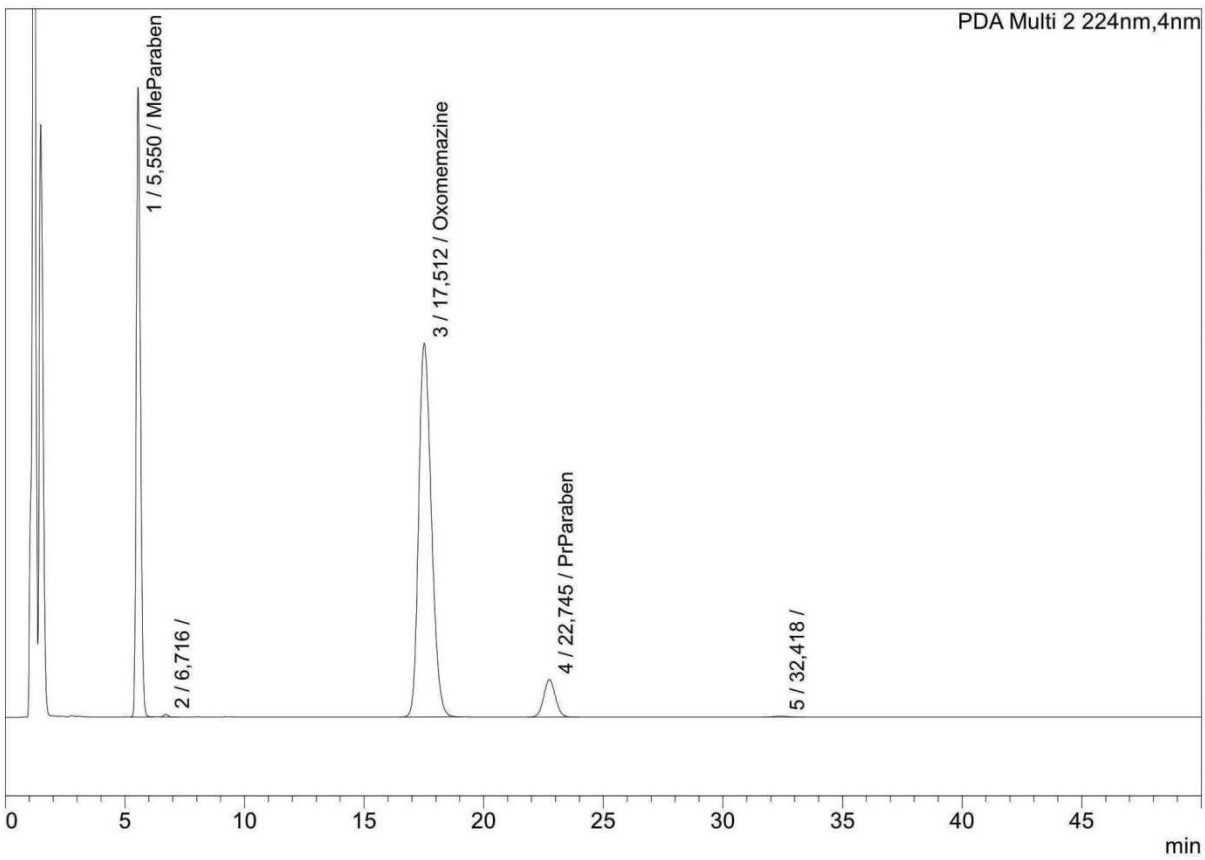
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : ODP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST O.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,550	11475967	1,240	4844
2		6,716	55984	--	--
3	Oxomemazine	17,512	20874374	1,238	5197
4	PrParaben	22,745	1935028	1,061	10308
5		32,418	65476	--	--

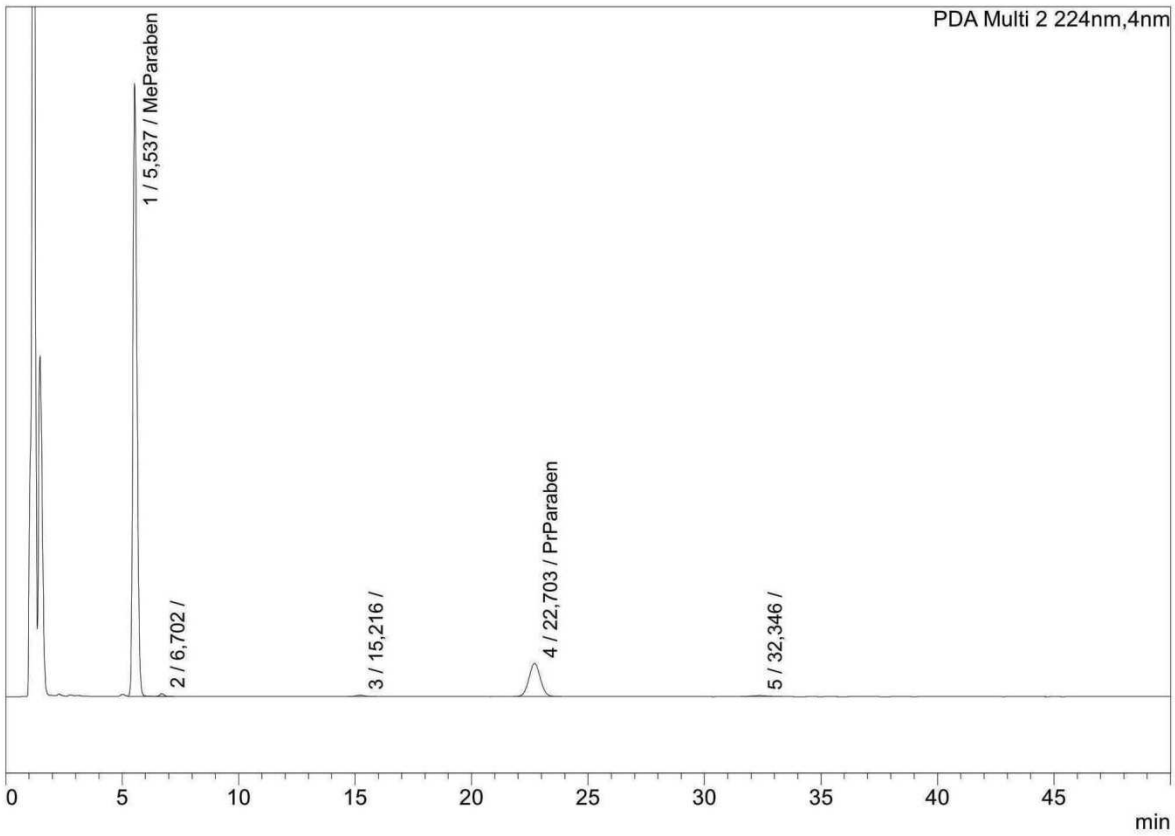
Figure 23b. Rapport d'analyse du produit fini sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène au temps0 (Echantillon ODP0)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : OP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST O.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,537	11395931	1,223	4869
2		6,702	49028	--	--
3		15,216	48419	--	--
4	PrParaben	22,703	1896717	1,038	10249
5		32,346	58578	--	--

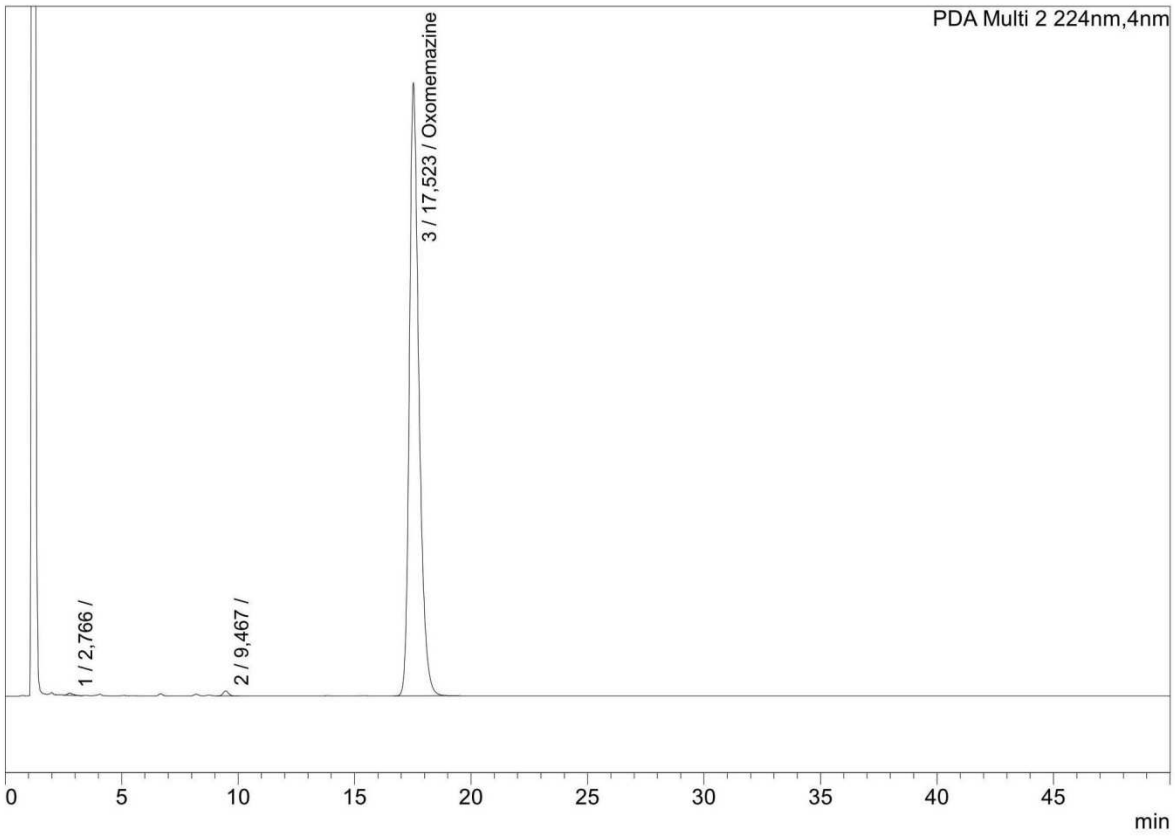
Figure 23c. Rapport d'analyse du placébo sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène au temps0 (Echantillon OP0)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : ODS7 REP1.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST O.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		2,766	40896	--	--
2		9,467	92823	--	--
3	Oxomemazine	17,523	19306932	1,330	9578

Figure 23d. Rapport d'analyse de la substance active sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène après 7 jours (Echantillon ODS7)

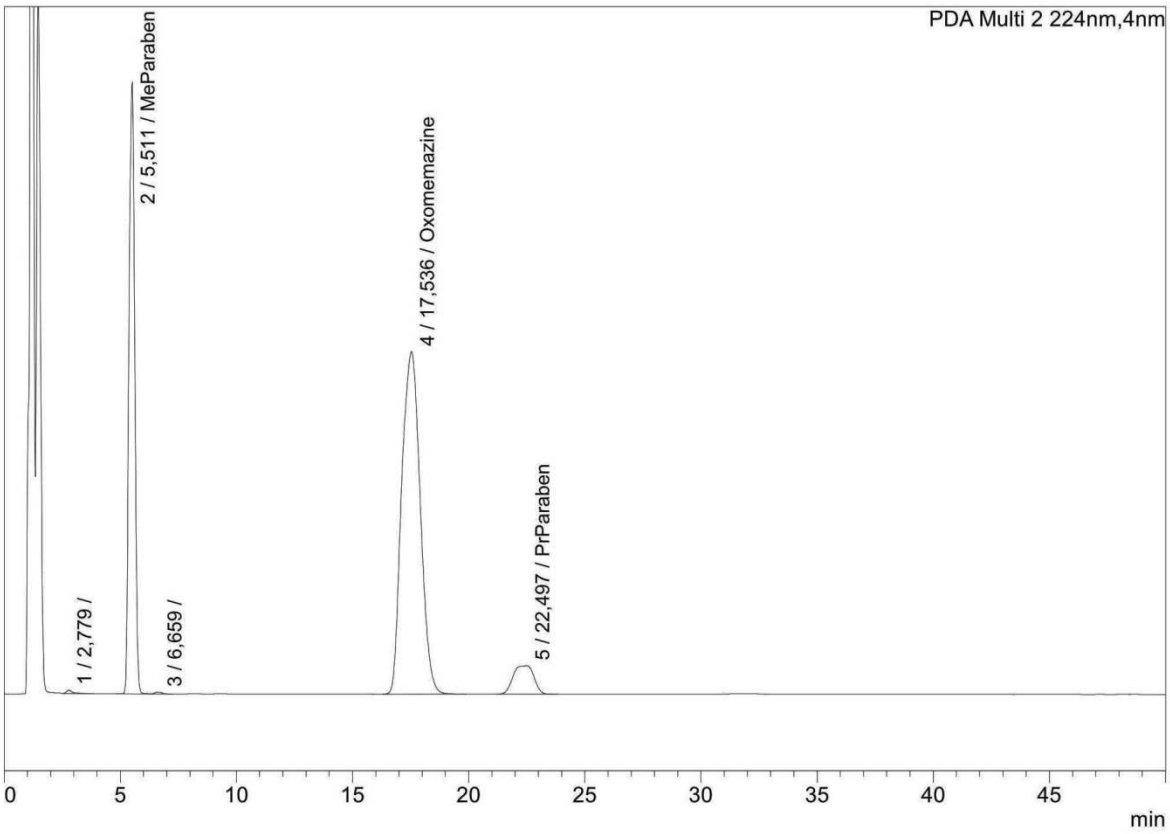
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : ODP7 REP1.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST O.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		2,779	64872	--	--
2	MeParaben	5,511	11437126	1,002	2122
3		6,659	42037	--	--
4	Oxomemazine	17,536	20661094	1,082	2091
5	PrParaben	22,497	1912367	0,859	2745

Figure 23e. Rapport d'analyse du produit fini sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène après 7 jours (Echantillon ODP7)

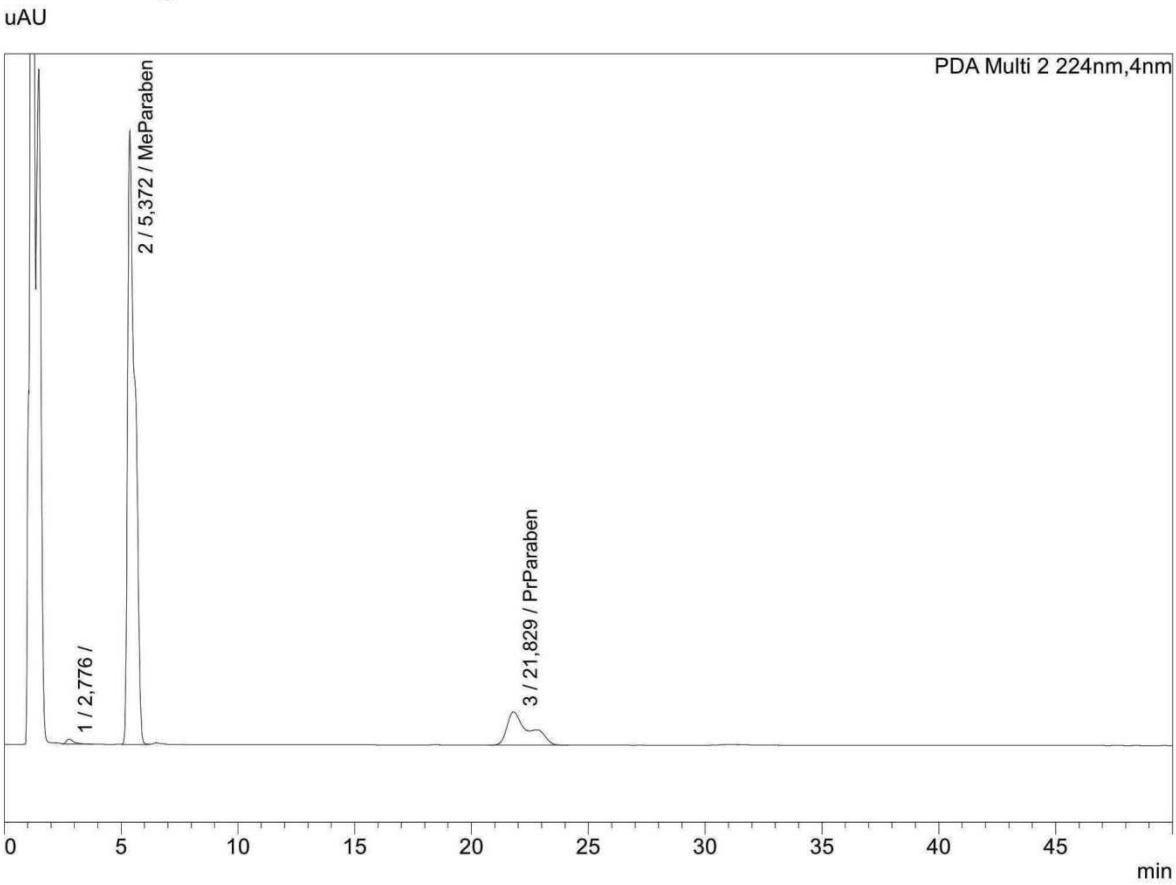
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : OP7.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST O.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		2,776	88456	--	--
2	MeParaben	5,372	11396261	1,713	1013
3	PrParaben	21,829	1870925	1,759	4453

Figure 23f. Rapport d'analyse du placébo sous oxydation par le peroxyde d'hydrogène après 7 jours (Echantillon OP7)

3.5. Oxydation catalysée par le fer ferrique

Au temps 0

Le chromatogramme de la substance active FDS0 (Figure 24a) ne présente aucun pic dont l'aire dépasse la limite d'exclusion.

À l'exception du pic correspondant à la substance active, les pics observés dans le chromatogramme du produit fini FDP0 (Figure 24b), tels que le méthyle parabène à RT5.5, le RT6.7, le propyle parabène à RT22.7 et le RT32.4, sont également présents dans le chromatogramme du placebo FP0 (Figure 24c). Cela suggère l'absence d'interaction entre la substance active et les excipients.

Le chromatogramme du placebo montre deux pics à RT15.2 et RT5.01 (Figure 24c) absent dans la SA FDS0 et le produit fini FDP0.

Après 7 jours

Le chromatogramme de la substance active FDS7 (Figure 24d) ne présente aucun pic dont l'aire dépasse la limite d'exclusion.

À l'exception du pic correspondant à la substance active, les pics présents dans le chromatogramme du produit fini FDP7 (Figure 24d) tels que le méthyle parabène à RT5.5, le RT6.6 et le propyle parabène à RT22.5 sont également présents dans le chromatogramme du placebo FP7 (Figure 24f). Ceci indique qu'il n'y a pas d'interaction entre la substance active et les excipients.

Dans les chromatogrammes du FP7 (Figure 24f) et FDP7, le pic du propyle parabène présente un dédoublement de son pic. La pureté de ce dernier a été vérifiée en comparant les spectres UV-Visible entre 200 nm et 400 nm du début, milieu et fin du pic, et ils étaient superposables. L'origine de ce phénomène était une contamination par un métal, qui sera discutée ultérieurement.

Bilan massique

Au temps 0, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme FDS0 (Figure 24a) est de 18683193. Après 7 jours sous stress oxydatif catalysée par le fer ferrique à température ambiante, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme FDS7 (Figure 24d) atteint

18831998, représentant 100,80% de la valeur initiale au temps 0. Cette augmentation peut être expliquée par la variabilité inhérente à la méthode analytique utilisée [30,39,40].

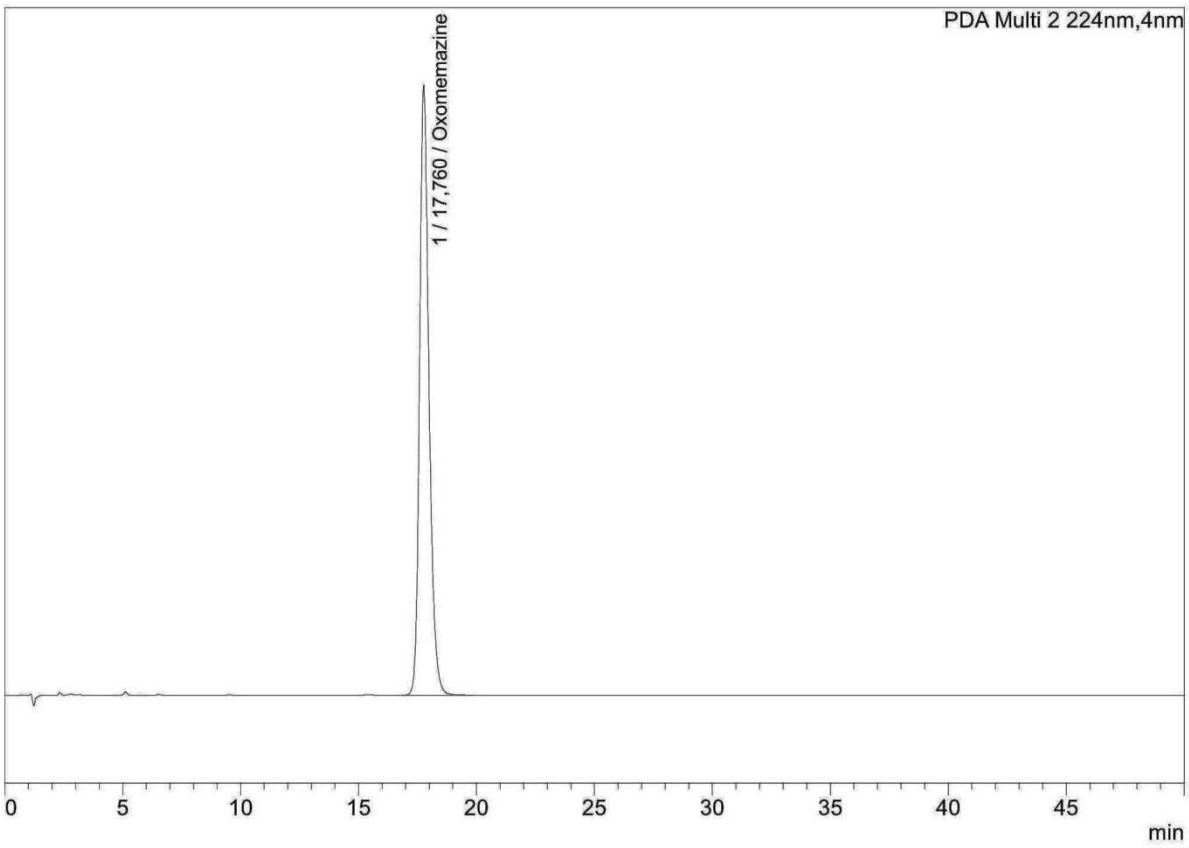
Au temps 0, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme du produit fini FDP0 (Figure 24b) est de 18991023. Après 7 jours sous stress oxydatif catalysée par le fer ferrique à température ambiante, l'aire du pic de la substance active dans le chromatogramme FDP7 (Figure 24e) est de 18985734, représentant 99,97% de la valeur initiale au temps 0. Cette diminution peut être expliquée par la variabilité inhérente à la méthode analytique utilisée [30,39,40].

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : FDS0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST Fe.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	Oxomemazine	17,760	18683193	1,254	10162

Figure 24a. Rapport d'analyse de la substance active sous oxydation catalysée par le fer ferrique au temps0 (Echantillon FDS0)

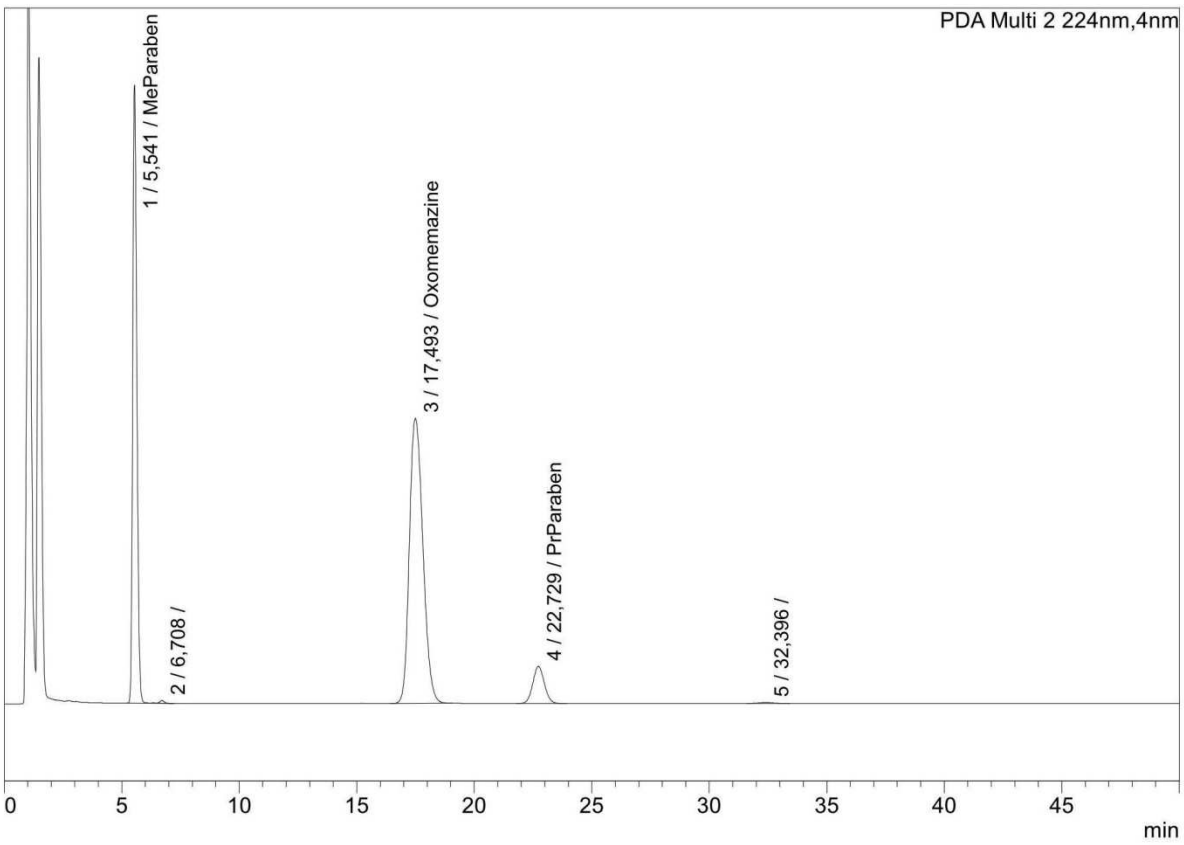
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : FDP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST Fe.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,541	12529549	1,242	4755
2		6,708	56038	--	--
3	Oxomemazine	17,493	18991023	1,217	4335
4	PrParaben	22,729	2112417	1,061	10295
5		32,396	71835	--	--

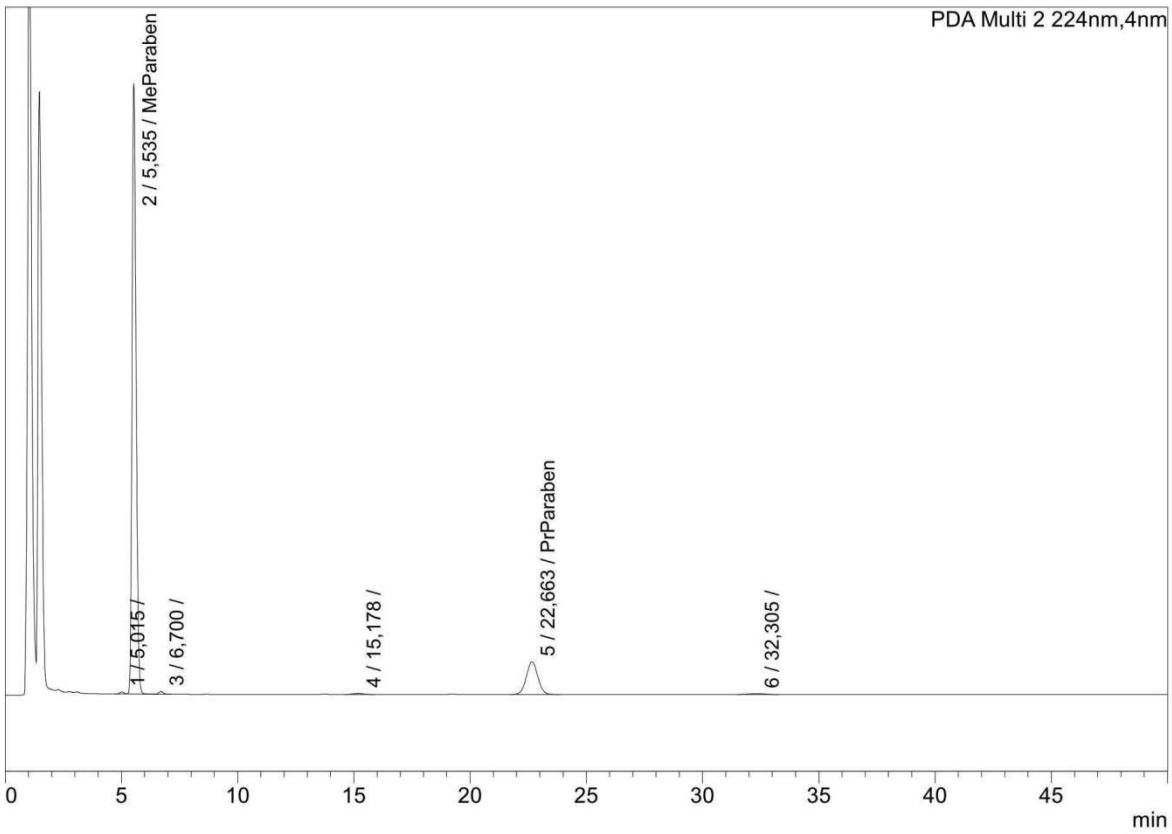
Figure 24b. Rapport d'analyse du produit fini sous oxydation catalysée par le fer ferrique au temps0 (Echantillon FDP0)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : FP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST Fe.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		5,015	42485	--	--
2	MeParaben	5,535	12373731	1,224	4868
3		6,700	54640	--	--
4		15,178	53469	--	--
5	PrParaben	22,663	2036526	1,035	10205
6		32,305	63560	--	--

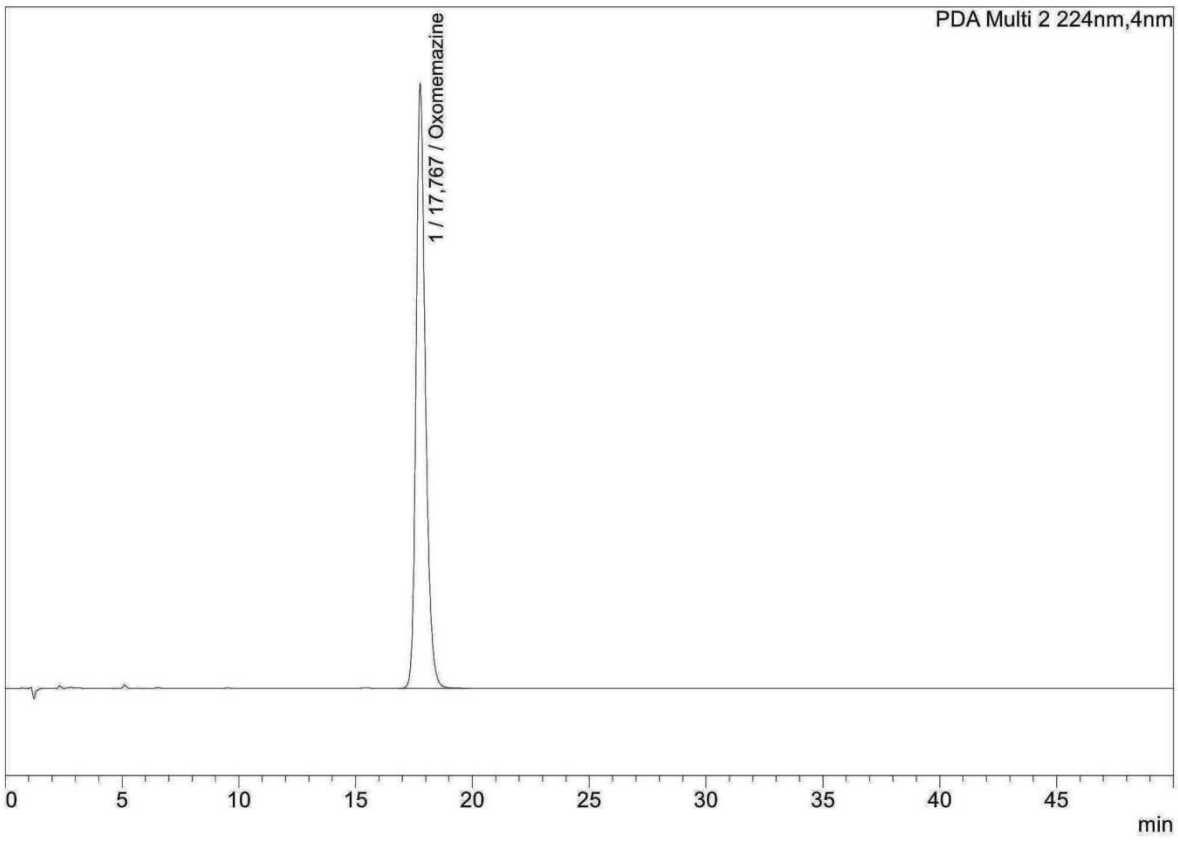
Figure 24c. Rapport d'analyse du placébo sous oxydation catalysée par le fer ferrique au temps0 (Echantillon FP0)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : FDS7.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST Fe.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	Oxomemazine	17,767	18831998	1,251	10161

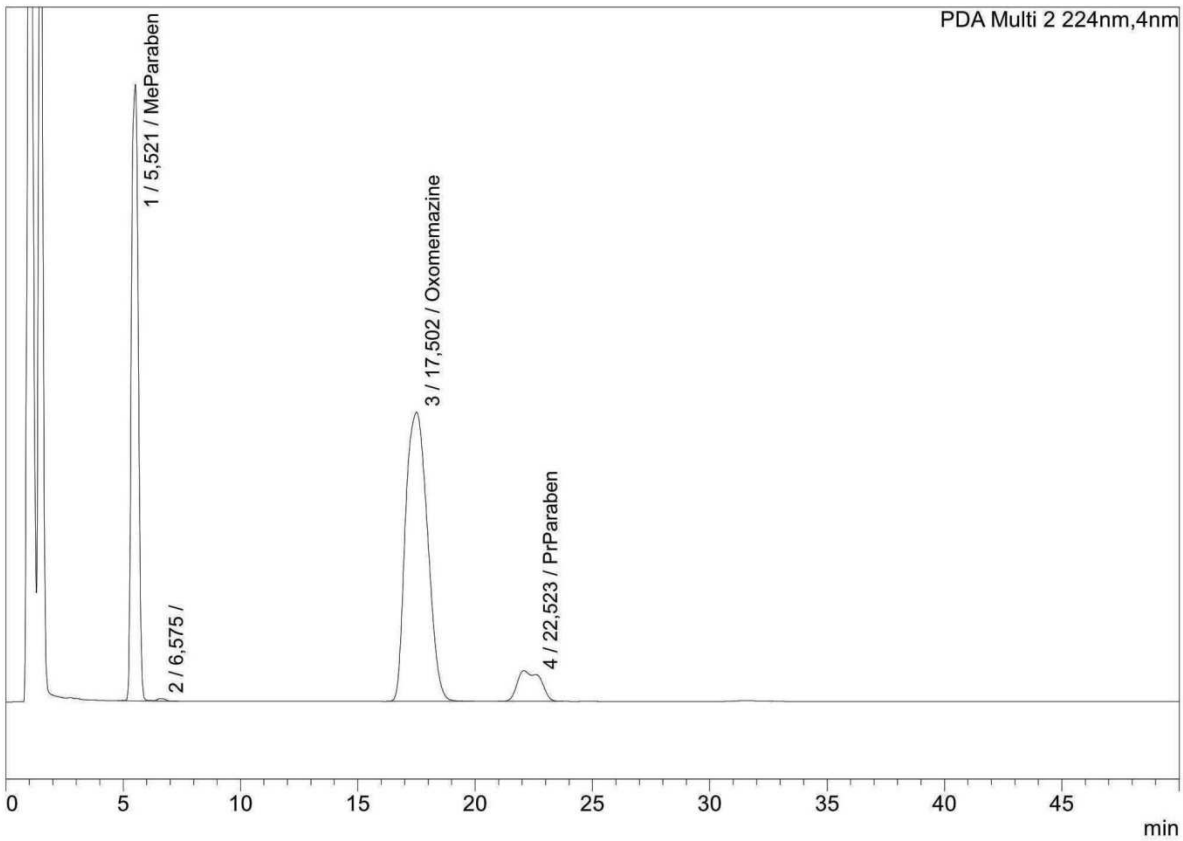
Figure 24d. Rapport d'analyse de la substance active sous oxydation catalysée par le fer ferrique après 7 jours (Echantillon FDS7)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : FDP7 REP1.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST Fe.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,521	12631670	0,983	1531
2		6,575	60222	--	--
3	Oxomemazine	17,502	18985734	1,141	1486
4	PrParaben	22,523	2102671	0,848	1858

Figure 24e. Rapport d'analyse du produit fini sous oxydation catalysée par le fer ferrique après 7 jours (Echantillon FDP7)

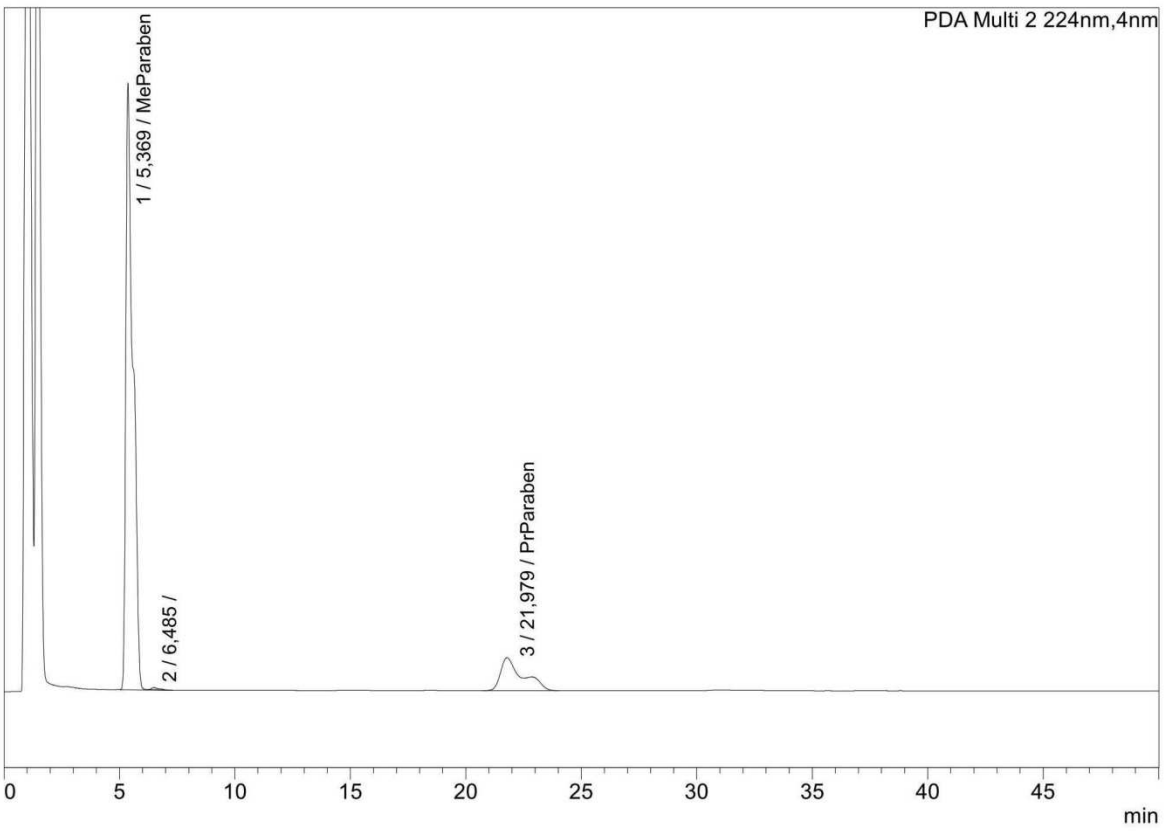
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : FP7.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST Fe.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,369	12656881	1,781	1045
2		6,485	47089	--	--
3	PrParaben	21,979	2089331	1,448	3182

Figure 24f. Rapport d'analyse du placébo sous oxydation catalysée par le fer ferrique après 7 jours (Echantillon FDS7)

3.6. Photo dégradation

Au temps 0

Le chromatogramme de la substance active PhDS0 (Figure 25a) ne présente aucun pic dont l'aire dépasse la limite d'exclusion.

À l'exception du pic correspondant à la substance active, les pics observés dans le chromatogramme du produit fini PhDP0 (Figure 25b), tels que le méthyle parabène à RT5.5, le RT6.8, le propyle parabène à RT22.8 et le RT32.3, sont également présents dans le chromatogramme du placebo PhP0 (Figure 25c).

Après 14 jours

Aucun pic dépassant la limite d'exclusion n'apparaît dans le chromatogramme de la substance active PhDS14 (Figure 25d).

Le chromatogramme du produit fini PhDP14 (Figure 25e) et celui du contrôle noir PhD14 (Figure 25f) sont parfaitement semblables. Ils contiennent tous les pics du méthyle parabène (MP) à RT5.6, de la SA à RT17.8 et du propyle parabène (PP) à RT22.9, ce qui signifie la photostabilité de ce produit fini, que ce soit en verre clair ou ombré.

De même pour le placebo PhP14 (Figure 25g), il ne contient que les pics du méthyle parabène (MP) à RT5.6 et du propyle parabène (PP) à RT22.9.

Bilan massique

Au temps 0, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme PhDS0 (Figure 25a) est de 18.543.198. Après 14 jours sous stress photolytique, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme PhDS14 (Figure 25d) atteint 18.610.162, représentant 100,36% de la valeur initiale au temps 0. Cette augmentation peut être expliquée par la variabilité inhérente à la méthode analytique utilisée [30,39,40].

Au temps 0, l'aire du pic de la SA dans le chromatogramme du produit fini PhDP0 (Figure 25b) est de 18.912.417. Après 14 jours de stress photolytique, l'aire du pic de la substance active dans le chromatogramme PhDP14 (Figure 25e) est de 18.835.717, représentant 99,59% de la valeur initiale au temps 0. Cette diminution peut être expliquée par la variabilité inhérente à la méthode analytique utilisée [30,39,40].

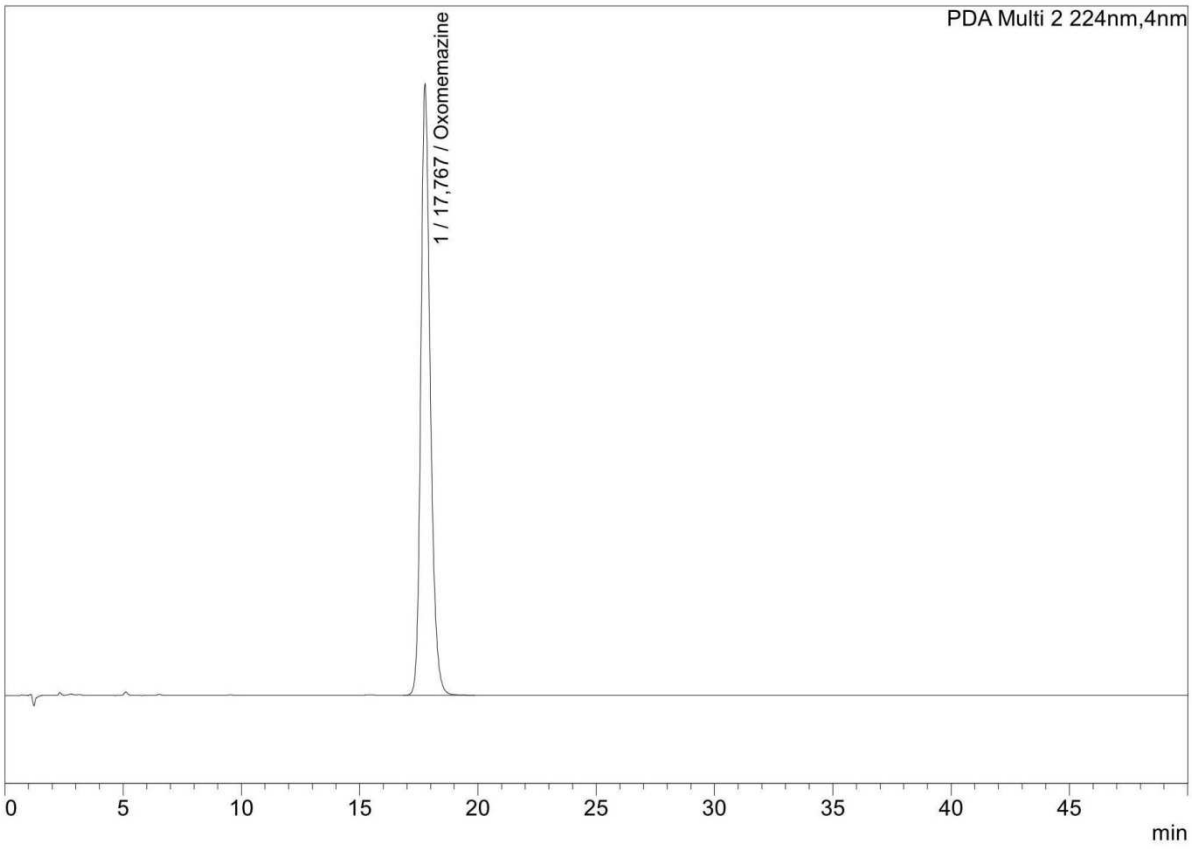
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : PDS0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST PD.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	Oxomemazine	17,767	18543198	1,252	10185

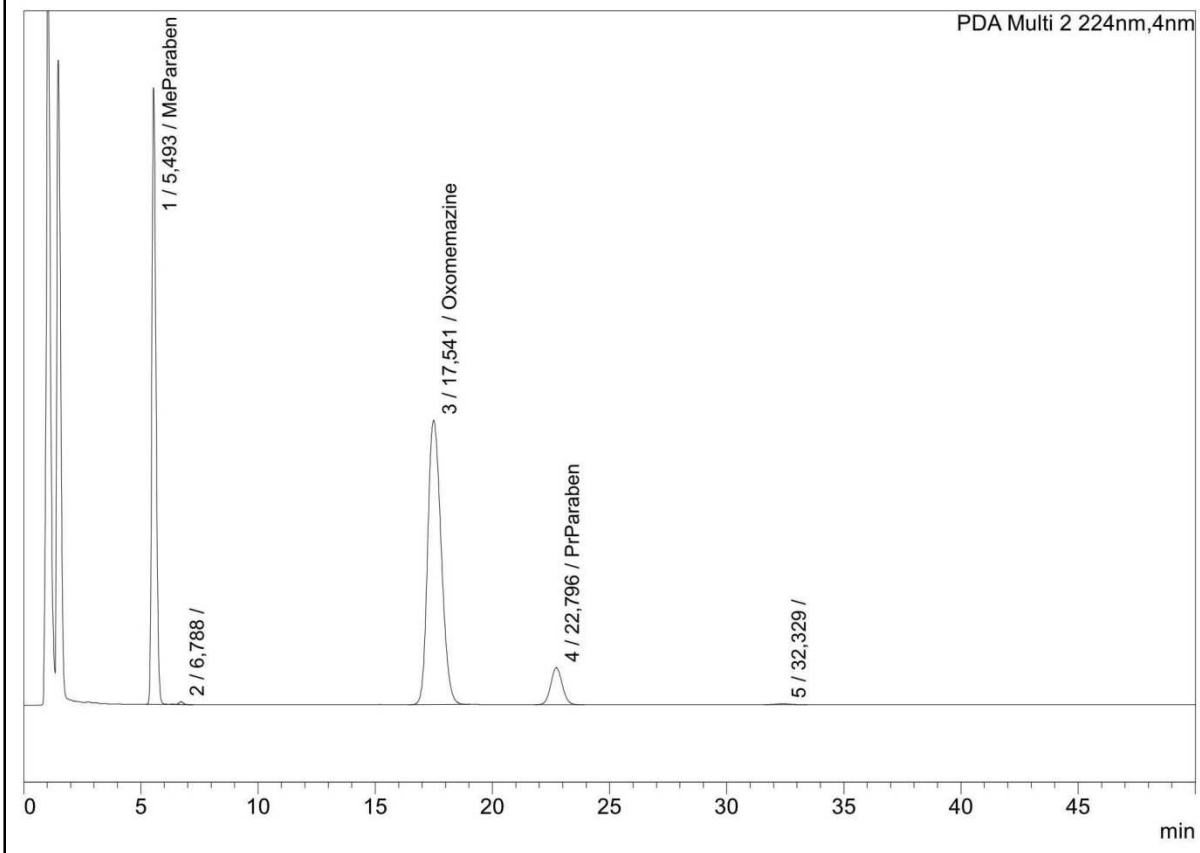
Figure 25a. Rapport d'analyse de la substance active sous photo dégradation au temps0 (Echantillon PhDS0)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : PDP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST PD.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,493	12417549	1,261	4555
2		6,788	56183	--	--
3	Oxomemazine	17,541	18912417	1,277	4535
4	PrParaben	22,796	2118357	1,042	10255
5		32,329	73335	--	--

Figure 25b. Rapport d'analyse du produit fini sous photo dégradation au temps0 (Echantillon PhDP0)

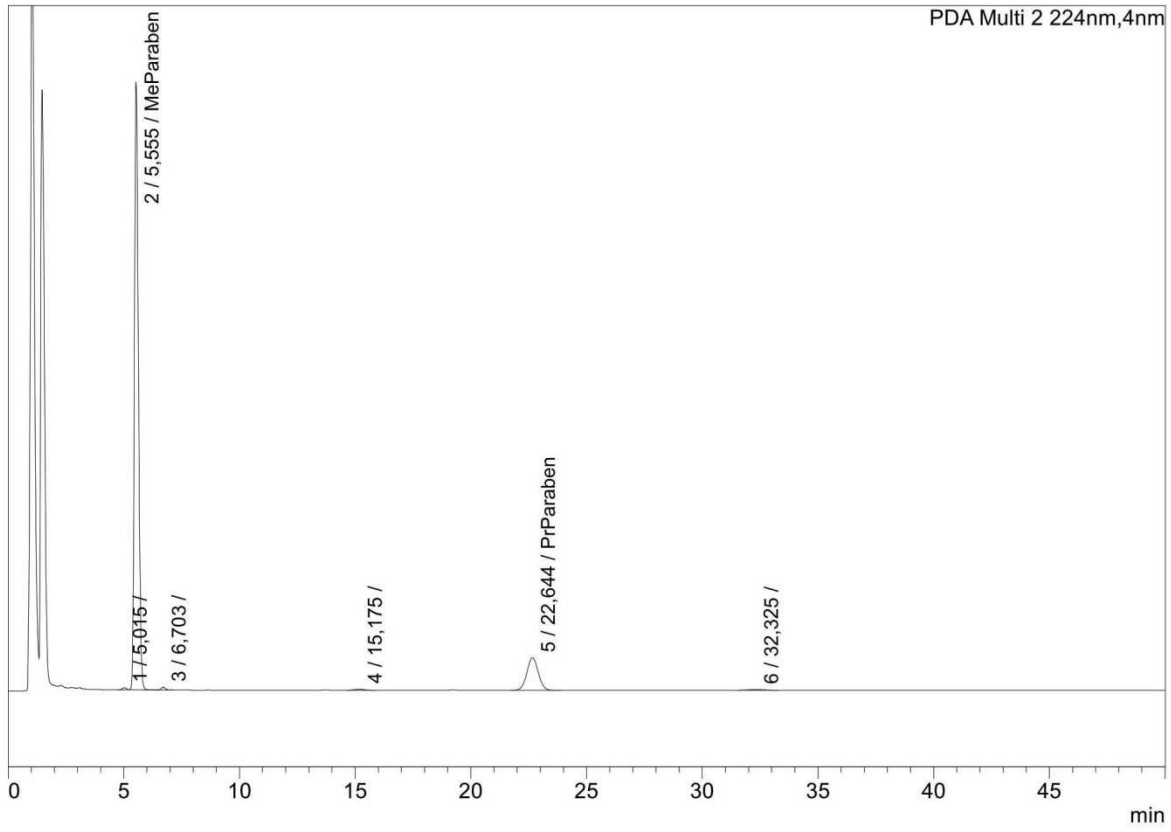
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : PP0.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST PD.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1		5,015	41235	--	--
2	MeParaben	5,555	12353551	1,035	4820
3		6,703	50040	--	--
4		15,175	50409	--	--
5	PrParaben	22,644	2044524	1,224	10005
6		32,325	62260	--	--

Figure 25c. Rapport d'analyse du placébo sous photo dégradation au temps0 (Echantillon PhP0)

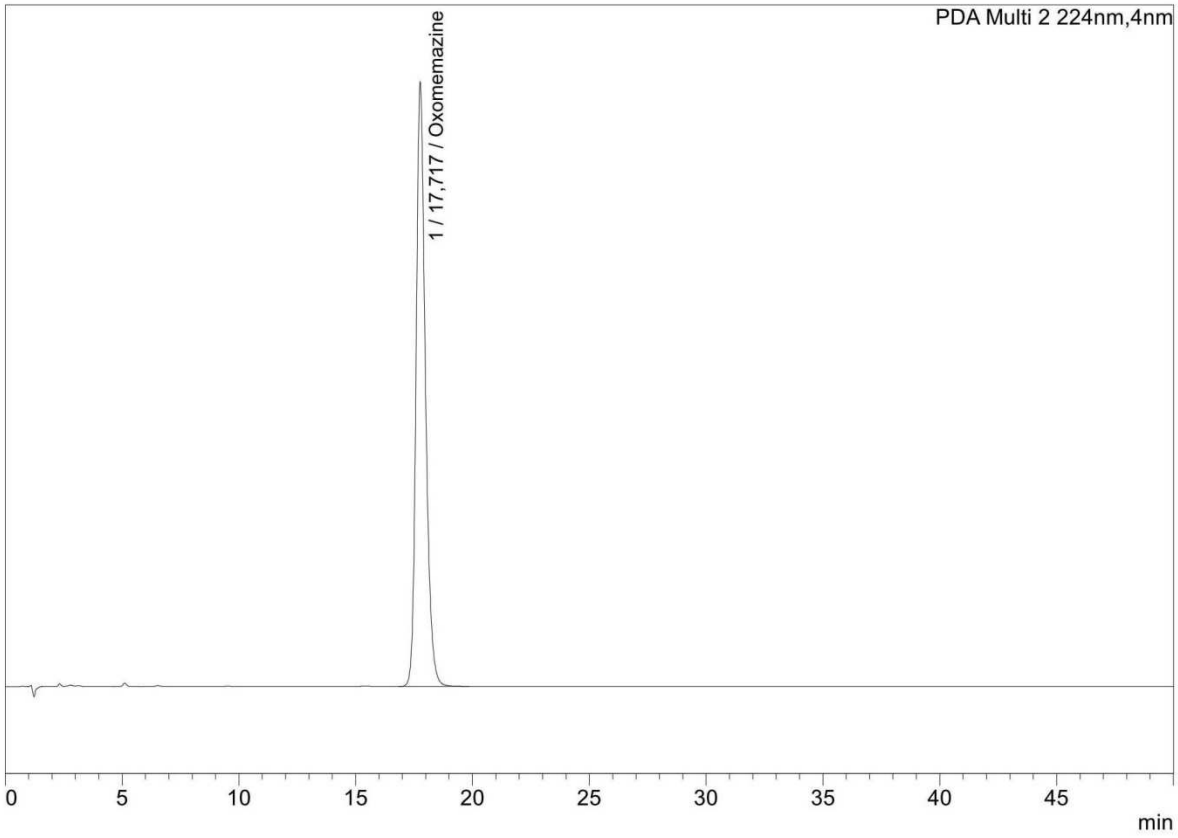
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : PDS14.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST PD.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	Oxomemazine	17,717	18610162	1,216	10186

Figure 25d. Rapport d'analyse de la substance active sous photo dégradation après 14 jours (Echantillon PhDS14)

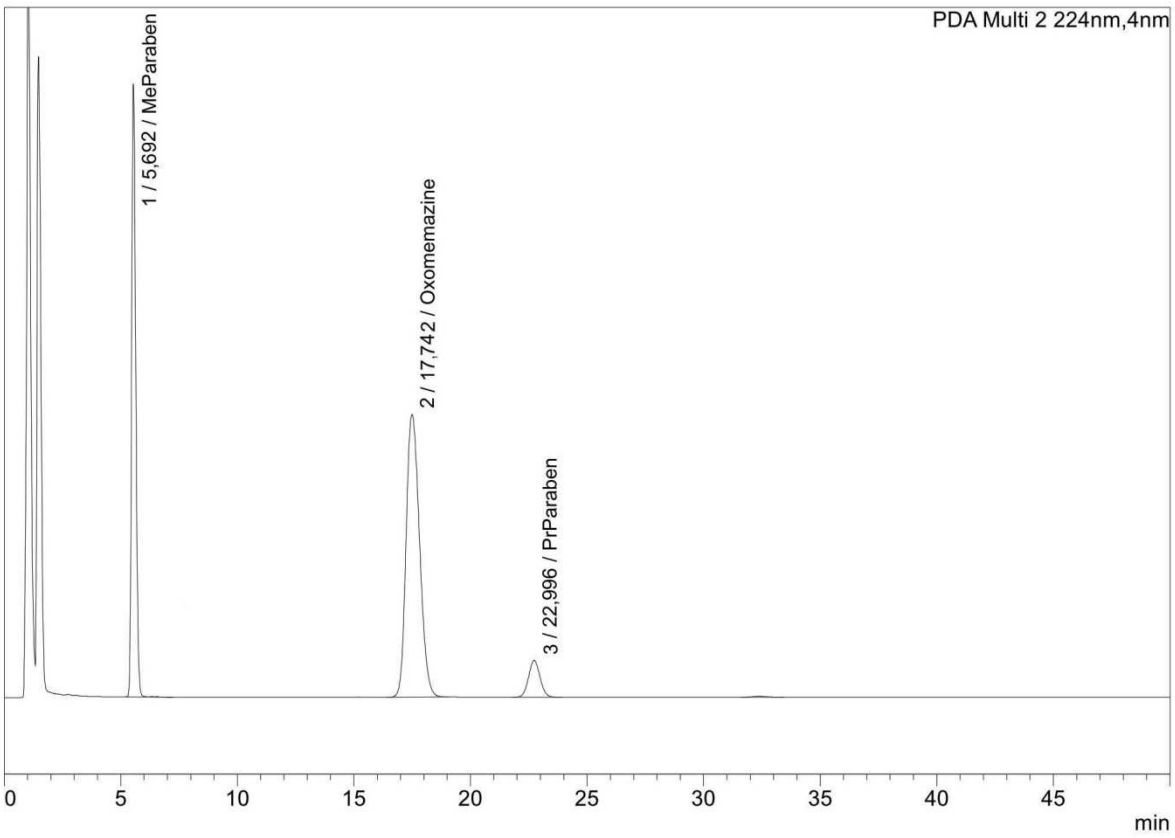
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : PDP14.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST PD.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,692	12357549	1,263	4754
2	Oxomemazine	17,742	18835717	1,237	4734
3	PrParaben	22,996	2111883	1,032	10275

Figure 25e. Rapport d'analyse du produit fini sous photo dégradation après 14 jours (Echantillon PhDP14)

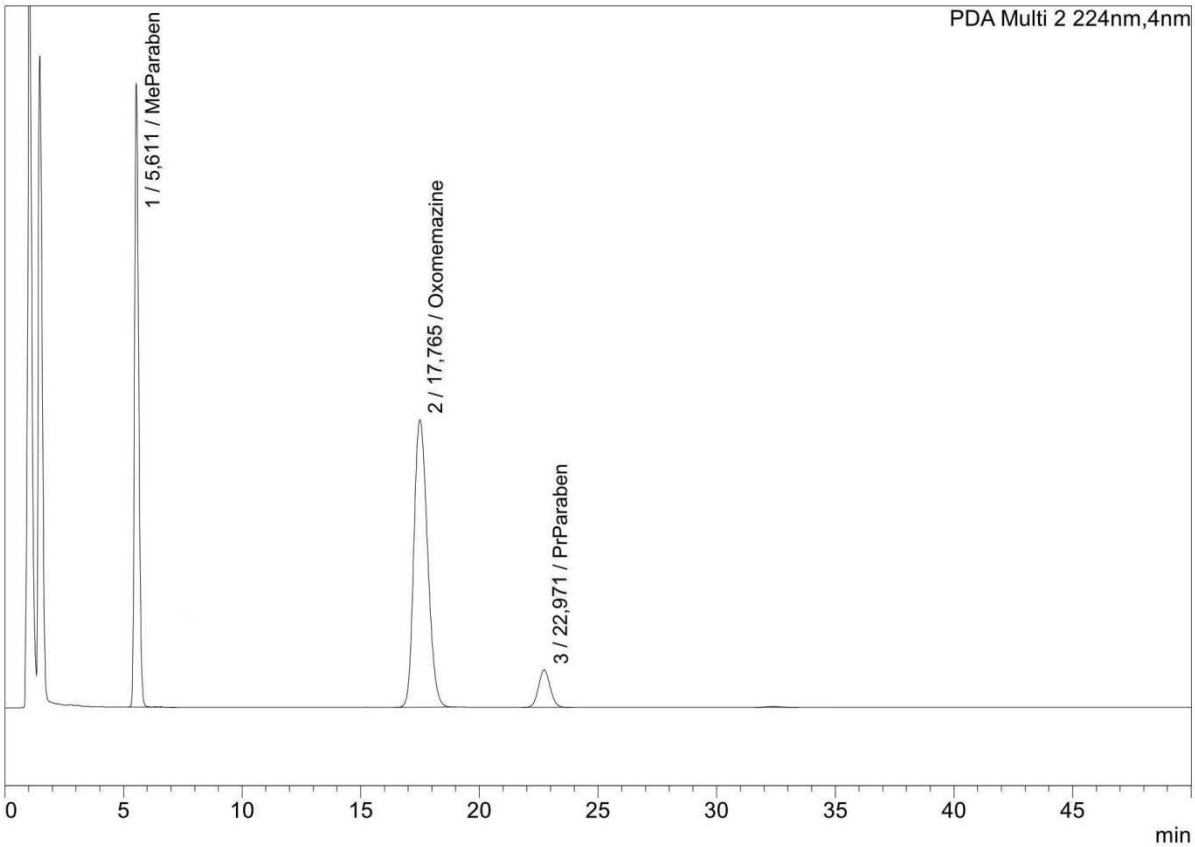
SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

<Sample Information>

Data Filename : PD14.lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file:SIMO ST PD.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,611	12350430	1,238	4735
2	Oxomemazine	17,765	18862944	1,317	7604
3	PrParaben	22,971	2111536	1,030	10355

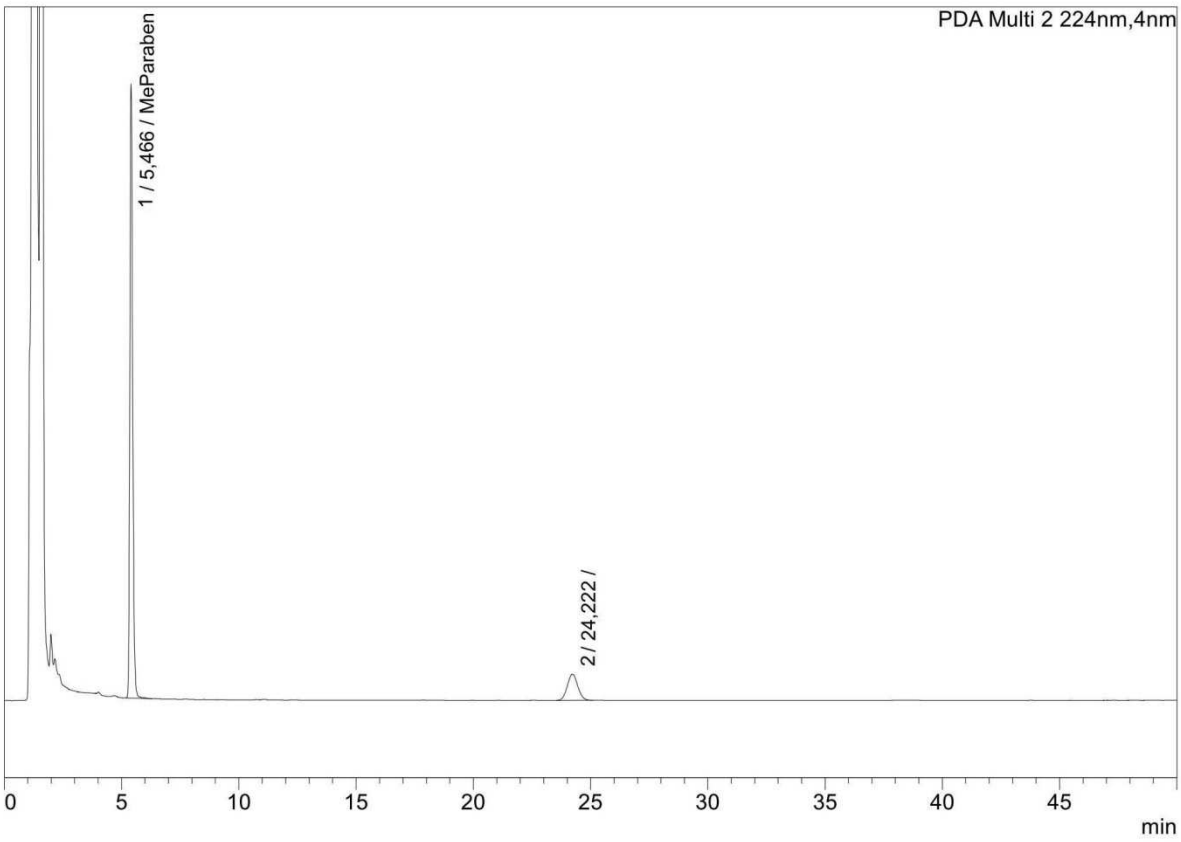
Figure 25f. Rapport d'analyse du contrôle sous photo dégradation après 14 jours (Echantillon PhD14)

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Data Filename : PP14 .lcd
Method Filename : SIMO.lcm
Batch file: SIMO ST PD.lcb
Report file: DEFAULT.lsr

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
1	MeParaben	5,466	12263966	1,098	4209
2	PrParaben	24,222	2064209	1,238	9920

Figure 25g. Rapport d'analyse du placébo sous photo dégradation après 14 jours (Echantillon PhP14)

3.7. Contamination par les métaux

Dans les chromatogrammes BP7 (figure 22f), OP7 (figure 23f), FP7 (figure 24f) et FDP7 (figure 24e), le pic du propyle parabène présente un dédoublement. Ce phénomène n'a pas affecté le pic de la substance active (SA) dans le chromatogramme FDP7 (figure 24e), c'est-à-dire que le problème ne concerne pas tous les pics. Cela suggère une origine chimique du phénomène [85,86].

L'injection des échantillons soumis à un stress oxydatif médié par le fer ferrique a contaminé la colonne. Ces ions de fer se sont fixés sur la silice, provoquant :

- L'attraction électrostatique des analytes chargés négativement vers la surface métallique électropositive.
- L'augmentation de l'ionisation des silanols [85,87].



Figure 26. Effets de la contamination par les métaux [88]

Ces interactions entraînent des problèmes de forme des pics.

Aux temps 0 et 7 jours, Le fer introduit n'a pas été éliminé en raison des limitations de la méthode de nettoyage standard de la colonne, qui comprennait deux étapes distinctes :

1. Un mélange d'eau ultra-pur/méthanol dans les mêmes proportions que celles de la phase mobile pour éliminer les sels du tampon.

2. Ensuite, un mélange d'eau ultra-pur à 10% et de méthanol à 90% pour éluer toutes les substances fortement retenues par la colonne [88].

Après avoir identifié cette cause, une étape supplémentaire de nettoyage avec EDTA 50 mM a été ajoutée [88].

Cette action s'est avérée efficace, étant donné que les pics des échantillons soumis à un stress photolytique après 14 jours (Voir figures 25d, 25e, 25f et 25g) et les échantillons soumis à un stress thermique après 21 jours (Voir figures 20d, 20e, 20f) présentent une forme chromatographique acceptable sans défaut.

4. Conclusion

Les résultats de l'étude de dégradation forcée démontrent la stabilité de la substance active et du produit fini sous diverses conditions de stress.

La substance reste inchangée et conserve son intégrité face à un stress thermique prolongé à 70°C pendant 21 jours, que ce soit en solution aqueuse ou dans le produit fini.

De même, elle demeure stable lorsqu'elle est soumise à un stress acide à 70°C pendant 7 jours, aussi bien en solution aqueuse que dans le produit fini.

Lorsqu'exposée à un stress basique à 70°C pendant 7 jours, la substance active maintient sa stabilité, que ce soit en solution aqueuse ou dans le produit fini.

Elle présente également une remarquable résistance face à un stress oxydatif, que ce soit par peroxyde d'hydrogène à température ambiante pendant 7 jours ou catalysé par le fer ferrique à la même température sur une période similaire, que ce soit en solution aqueuse ou dans le produit fini.

En outre, la substance active conserve son intégrité lorsqu'elle est soumise à un stress photolytique équivalent à 2 fois 1,2 million de lux-heures. Ces résultats positifs sont observés tant en solution aqueuse que dans le produit fini, et ce, que le contenant soit en verre pharmaceutique de type III ambré ou clair.

L'ensemble de ces données montre la stabilité de la substance active face à des conditions variées de stress.

CHAPITRE 3. OPTIMISATION ET VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE DES IMPURETES

I. Optimisation de la méthode de dosage des impuretés

1. Introduction

Les résultats de l'étude de dégradation forcée ont démontré la stabilité remarquable de la substance active (SA) face à divers stress, qu'ils soient thermique, acide, basique, oxydatif (induits par le peroxyde d'hydrogène ou catalysés par le fer), ainsi que photolytique.

La méthode analytique utilisée lors du stress testing était une méthode isocratique (Tableau 30), dont les facteurs de rétention du méthyle parabène (MP), de l'OXO et du propyle parabène (PP) sont respectivement d'environ 6, 17 et 23 (Figure 19). Cette importante différence de rétention doit faire l'objet d'une optimisation, que ce soit par l'augmentation du pourcentage de méthanol dans la phase mobile en mode isocratique ou par l'utilisation d'un gradient d'élution.

D'autre part, selon les tests de stress réalisés, s'il y avait des impuretés dans le produit fini, elles seraient présentes à des niveaux très faibles. En mode isocratique, les pics élués ultérieurement s'élargissent et leurs hauteurs diminuent. Par conséquent, leur mesure voire leur détection peut être compromise en raison d'un faible rapport signal/bruit [89,90].

Dans de telles situations, le mode en gradient d'élution est généralement la première option à considérer car il génère des pics de largeurs constantes et une sensibilité de détection comparable pour chaque pic, sous l'hypothèse d'une réponse de détecteur similaire pour chaque soluté [89]. Ce gain en sensibilité de détection avec l'élution en gradient se traduit par des bandes d'échantillons environ deux fois plus étroites (et les hauteurs de pic sont deux fois plus grandes) que dans des séparations correspondantes par élution isocratique [91].

Pour ces raisons, la méthode isocratique, utilisée pour l'évaluation de l'étude de dégradation forcée, sera transformée en mode gradient d'élution afin de rendre la méthode plus fiable pour la détection des impuretés à faible concentration.

Dans le but d'établir la capacité indicative de stabilité de notre méthode, il est essentiel de démontrer sa capacité à séparer notre analyte d'intérêt OXO des excipients et des impuretés de synthèse. À cette fin, l'optimisation est effectuée avec un placebo chargé de 100% d'OXO et 0,2% de dioxyde de phénothiazine (PDO), représentant l'impureté de synthèse de notre substance active.

2. Matériels et méthodes

La mise en œuvre d'un plan d'expériences visant à étudier la surface de réponse d'un système expérimental en vue de trouver un optimum peut être résumée en suivant la procédure détaillée ci-dessous :

1. **Choisir un critère d'optimisation et définir l'optimum :** Identifiez le critère que vous souhaitez optimiser, et déterminez la valeur optimale de ce critère pour le système en question.

2. **Sélectionner des facteurs contrôlables :** Identifiez les facteurs qui influent sur le critère d'optimisation et qui peuvent être contrôlés pendant les expériences.

3. **Borner exactement le domaine expérimental :** Définissez de manière précise et pertinente les limites du domaine expérimental dans lequel les essais seront réalisés.

4. **Choisir un modèle :** Sélectionnez le modèle mathématique ou statistique qui représentera la relation entre les facteurs contrôlables et le critère d'optimisation.

5. **Choisir un plan d'expériences tenant compte des conditions propres au problème à traiter :** Sélectionnez un plan d'expériences adapté aux caractéristiques spécifiques du problème, en veillant à maximiser l'efficacité des essais.

6. **Réaliser les essais :** Mettez en place et effectuez les expérimentations conformément au plan établi, en enregistrant les données de manière précise.

7. **Calculer les coefficients :** Utilisez les résultats des essais pour calculer les coefficients du modèle choisi, en ajustant le modèle aux données expérimentales.

8. **Sélectionner les coefficients significatifs :** Identifiez les coefficients du modèle qui ont une influence significative sur le critère d'optimisation, en se basant sur des analyses statistiques.

9. **Prédire les niveaux des facteurs à l'optimum :** Utilisez le modèle ajusté pour prédire les niveaux optimaux des facteurs qui maximisent le critère d'optimisation, permettant ainsi d'atteindre les meilleures performances du système.

En suivant cette démarche méthodique, la planification et l'exécution d'un plan d'expériences peuvent être optimisées, conduisant à des résultats plus fiables et à une meilleure compréhension du système étudié.

2.1. Critères d'optimisation (Réponses)

Dans la mise au point d'une séparation chromatographique, il est nécessaire non seulement d'obtenir une résolution satisfaisante, mais aussi de prendre en compte certaines contraintes pratiques, telles que la durée de la séparation. Ainsi, une stratégie d'optimisation consiste à déterminer un point de fonctionnement expérimental qui constitue un compromis vis-à-vis de contraintes contradictoires [92]. Si le temps d'analyse est privilégié, la résolution chute. En revanche, si l'on favorise la résolution, le temps d'analyse augmente.

Dans notre travail, les critères qui ont été sujet d'optimisation, sont les suivants :

- La résolution entre les composés suivants : méthyle parabène (MP), dioxyde de phénothiazine (PDO), OXO et propyle parabène (PP), soit respectivement R-MP-PDO, R-PDO-OXO et R-OXO-PP.
- Le temps d'analyse représenté par le temps de rétention du dernier pic à savoir propyle parabène (PP), soit Tr PP.

2.2. Choix des facteurs

La méthode isocratique, utilisée pour l'évaluation de l'étude de dégradation forcée, a été transformée en mode gradient d'élution. Parmi les facteurs d'optimisation les plus importants de la phase mobile en mode gradient se trouvent le temps de gradient (Tg) et la variation de la fraction volumique du méthanol (%B final - %B initial) ($\Delta\phi$) [93]. En outre, le pH de cette phase joue également un rôle crucial dans l'optimisation, étant donné la nature basique faible de l'OXO.

Pour cela, trois facteurs d'optimisation ont été choisis pour ce travail :

- Le pH du tampon phosphate (pH)
- Le temps de gradient (Tg)
- La variation de la fraction volumique du méthanol (%B final - %B initial) ($\Delta\phi$)

2.3. Domaine expérimental et définition des niveaux des facteurs

Le choix des niveaux bas et haut de chaque facteur, définissant ainsi le domaine d'étude, est une étape essentielle pour garantir la validité des conclusions de l'expérimentation. Cependant, cette étape est plus complexe qu'il n'y paraît initialement, car il est crucial que le domaine de chaque facteur soit ni trop large ni trop restreint.

Ces décisions ont été prises en tenant compte de notre connaissance initiale du sujet ainsi que des contraintes techniques associées. Les niveaux choisis pour les facteurs pH, Δϕ et Tg ont été déterminés en référence aux paramètres de la méthode isocratique utilisée dans l'étude de dégradation forcée précédente, assurant ainsi la cohérence des conditions expérimentales.

2.3.1. Facteur pH

- **Niveau haut** : la valeur pH 7 a été choisie, car c'était la valeur utilisée lors de l'étude de dégradation forcée en mode isocratique.
- **Niveau bas :** la valeur de 6 a été sélectionnée afin d'évaluer son impact sur la rétention de l'OXO, dont le pKa prédit est de 8,02 (Tableau 26). De plus, s'éloigner du pH limite d'utilisation de la colonne (pH 8) contribue à prolonger sa durée de vie. A noter que la rétention du MP et du PP est peu sensible aux variations de pH.

Les tampons utilisés avaient tous une concentration de 50 mM en dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) et 10 mM en triéthylamine (TEA) (soit 1,5 ml / 1 litre). L'ajustement du pH a été réalisé soit par l'ajout de KOH, soit d'H_3PO_4, selon le cas.

2.3.2. Facteur Δϕ

Le pourcentage initial de méthanol a été maintenu constant tout au long de l'optimisation, avec un %B initial de 40%, correspondant au %B utilisé dans la méthode isocratique de l'étude de dégradation forcée.

- **Niveau haut :** 0,4, correspondant à un %B initial de 40% et un %B final de 80%.
- **Niveau bas :** 0,2, correspondant à un %B initial de 40% et un %B final de 60%.

2.3.3. Facteur Tg

- **Niveau haut :** 30 min, un laps de temps suffisant pour l'élution du méthyle parabène (MP), de l'OXO et du propyle parabène (PP) dans la méthode isocratique utilisée lors du stress testing.
- **Niveaubas:**15 min.

Le domaine d'étude des trois facteurs étudiés et leurs valeurs au centre du domaine sont présentés dans le Tableau 31.

Tableau 31. Facteurs retenus et domaine expérimental

Facteurs / *Niveaux*	**pH**	**Δϕ**	**Tg (min)**
Niveau (-1)	6	0,2	15
Niveau (+1)	7	0,4	30
Centre (0)	6,5	0,3	22,5

2.4. Choix du plan expérimental

Un plan central composite a été choisi. Ce plan est particulièrement adapté à la conduite séquentielle d'une étude. La première phase de l'étude consiste en un plan factoriel complet ou fractionnaire, complété par des points au centre afin de vérifier la validité du modèle. Dans la seconde phase, des essais supplémentaires sont entrepris pour établir un modèle du second degré.

Plan composite centré

Récapitulatif du plan

Facteurs :	3	Répliques :	1
Essais de base :	20	Nombre total d'essais :	20
Blocs de base :	1	Nombre total de blocs :	1

Factoriel à deux niveaux : factoriel complet

Types de points

Points du cube :	8
Points centraux à l'intérieur du cube :	6
Points sur les axes :	6
Points centraux sur les axes :	0

2.5. Matrice d'expériences

La liste des 20 essais à effectuer est présentée dans le Tableau 32.

Tableau 32. Matrice d'expérience du plan composite centré

Ordre Essai	Tg(min)	Δϕ	pH
1	22,5	0,3	6,5
2	15	0,4	6
3	15	0,2	7
4	22,5	0,2	6,5
5	30	0,4	7
6	30	0,3	6,5
7	22,5	0,3	7
8	30	0,4	6
9	22,5	0,4	6,5
10	22,5	0,3	6,5
11	30	0,2	7
12	22,5	0,3	6
13	15	0,4	7
14	15	0,3	6,5
15	22,5	0,3	6,5
16	22,5	0,3	6,5
17	30	0,2	6
18	22,5	0,3	6,5
19	22,5	0,3	6,5
20	15	0,2	6

2.6. Solution préparée pour l'optimisation

Solution standard stock de PDO

La solution standard stock a été préparée en dissolvant 37 mg de PDO dans 5 ml d'acétonitrile, puis en ajustant le volume à 100 ml avec un diluant (40% méthanol et 60% Eau Ultra-pur).

Placebo chargé de 100% d'OXO et 0,2% de dioxyde de phénothiazine (PDO)

Une prise d'essai de 37 mg d'OXO a été dissoute dans 90 ml de placébo, 200 µl de la Solution standard stock de PDO a été ajouté et le volume de cette solution a été à 100 ml avec le placébo.

Solution préparée pour l'optimisation

3 ml du Placebo chargé de 100% d'OXO et 0,2% de dioxyde de phénothiazine (PDO) ont été dilués à 10 ml avec un diluant (40% méthanol et 60% Eau Ultra-pur). La solution a été filtrée sur un filtre seringue en nylon de 0,45 µm

2.7. Conditions chromatographiques

Mise à part la composition de la phase mobile qui a été sujet d'optimisation, les conditions chromatographiques détaillées dans le Tableau 33, ont été utilisées pendant toute la phase d'optimisation.

Tableau 33. Conditions Chromatographiques utilisées dans l'optimisation

Colonne	**Dimensions**	▪ Longueur L = 10 cm ▪ Diamètre Ø = 4,6 mm
	Phase stationnaire	▪ Gel de silice octadécylsilylépostgreffé pour chromatographie (3,5 µm) ▪ Taille des pores = 100 Å
	Fabricant	▪ Waters Symmetry C18
Débit	1.0 ml/minute	
Température	40 °C	
Volume injecté	20 µL de la Solution préparée pour l'optimisation	
Détection	DAD à 224 nm	

2.8. Validation du modèle d'optimisation

Afin de valider le modèle d'optimisation, une méthodologie logique a été adoptée, comprenant les étapes suivantes :

A. Prévision des réponses

- Les conditions de l'optimum ont été utilisées pour anticiper les réponses du système, notamment Tr PP, R-OXO-PP, R-PDO-OXO, et R-MP-PDO. Cette

prévision a été réalisée en se basant sur les modèles mathématiques établis précédemment, permettant d'estimer les performances du système dans ces conditions spécifiques.

B. Analyse de l'échantillon :

- Le placébo chargé est analysé en suivant les conditions de l'optimum (Le temps de gradient (Tg), la variation de la fraction volumique ($\Delta\phi$) et pH de la phase mobile)

C. Comparaison des résultats :

- Les résultats pratiques de l'analyse ont été comparés aux prévisions obtenues à partir des modèles mathématiques. Cette comparaison visait à évaluer la capacité des modèles à prédire avec précision les performances du système sous les conditions optimales. Des résultats pratiques comparables aux prévisions indiqueraient une bonne adéquation des modèles aux conditions expérimentales réelles, validant ainsi leur fiabilité.

Tout écart significatif entre les résultats pratiques et prévus pourrait signaler des ajustements nécessaires aux modèles ou des variations dans les conditions expérimentales non prises en compte.

2.9. But de l'étude

- Evaluer les effets des trois facteurs choisis sur la résolution et le temps d'analyse.
- Déterminer un modèle mathématique prédictif.
- Déterminer les conditions optimales pour avoir une résolution maximale entre les composés (MP, PDO, OXO et PP) et un temps d'analyse minimal.

3. Résultats et discussion

3.1. Résultats des essais d'optimisation

Les 20 essais de la matrice d'expérience ont été effectués sur trois jours distincts, suivant l'ordre chronologique suivant :

1. Les expériences avec un pH de la phase mobile à 7 (Figures 27 et 27-bis).
2. Les expériences avec un pH de la phase mobile à 6 (Figures 28 et 28-bis).
3. Les expériences avec un pH de la phase mobile à 6,5 (Figures 29 et 29-bis).

Dans tous les cas, le gradient est maintenu à la valeur maximale de méthanol pendant 5 minutes, ce qui permet de nettoyer la colonne (phase purge). Ensuite, le pourcentage de méthanol retrouve sa valeur initiale et est maintenu pendant 5 minutes pour rééquilibrer la colonne et préparer l'injection suivante (phase rééquilibration).

Par exemple, pour l'essai 5 avec les informations suivantes :

- Tg = 30 min
- $\Delta\phi$ = 0,4
- pH = 7

Le gradient appliqué a été résumé dans le Tableau 34.

Tableau 34. Gradient d'élution de l'essai 5 (Tg=30, $\Delta\phi$= 0,4 et pH=7)

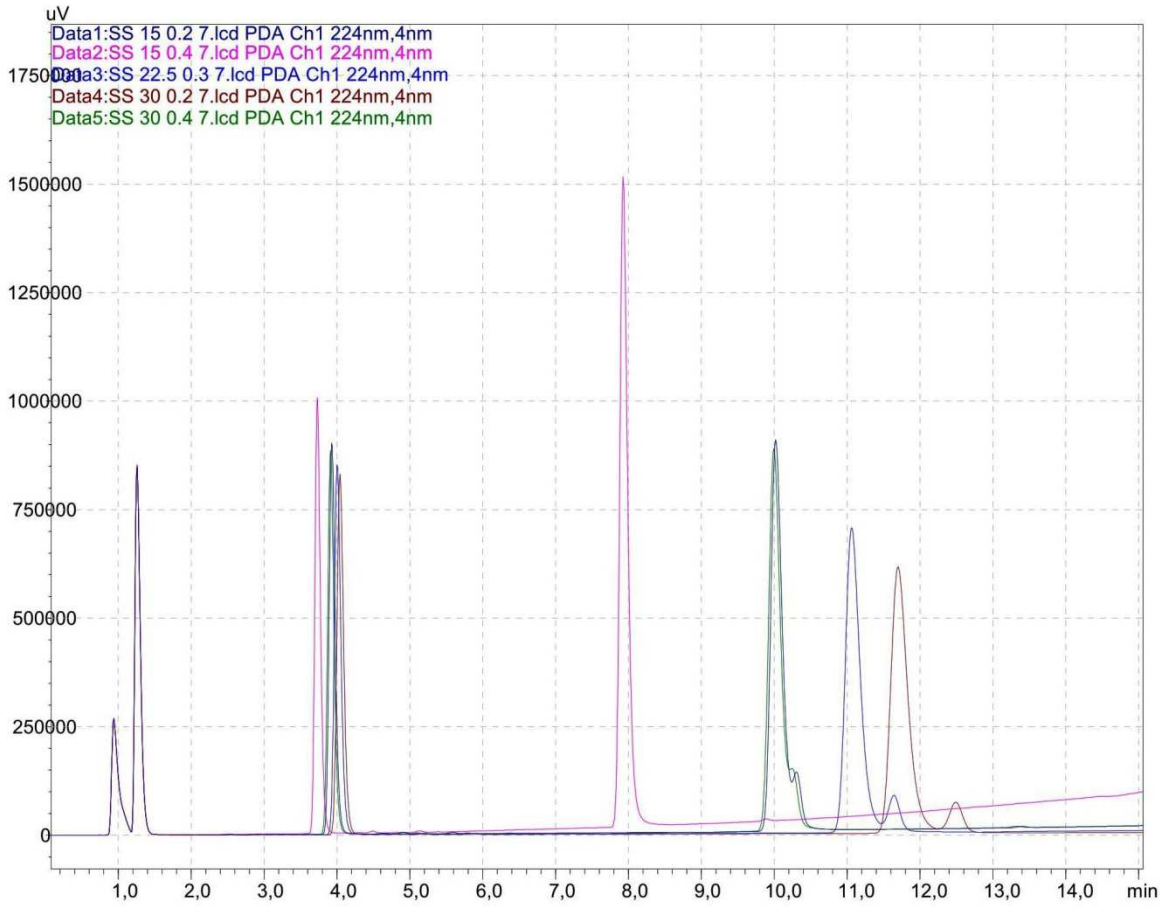
Temps en min	Méthanol (%)	Tampon pH 7 (%)
0	40	60
30	80	20
35	80	20
36	40	60
41	40	60

Tous les gradients ont suivis la même logique, assurant une cohérence dans l'approche expérimentale

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

Batch Filename : SIMOG 7.lcb



<Peak Table>

SS 15 0.2 7.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	3,930	901020	--
2	PDO	4,917	3630	6,206
3	OXO	10,020	901497	22,643
4	PP	10,304	135866	--

SS 15 0.4 7.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	3,731	1003859	--
2	PDO	4,488	4284	5,388
3	PP	7,927	1497308	20,466
4		9,889	4634	11,007

Figure 27. Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH 7

SS 22.5 0.3 7.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,004	851834	--
2	PDO	5,102	3317	6,343
3	OXO	11,063	702890	21,670
4	PP	11,643	85560	1,715

SS 30 0.2 7.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,041	831041	--
2	PDO	5,200	3170	6,463
3	OXO	11,699	613947	21,300
4	PP	12,491	71282	2,054

SS 30 0.4 7.lcd

PDA Ch1 224nm

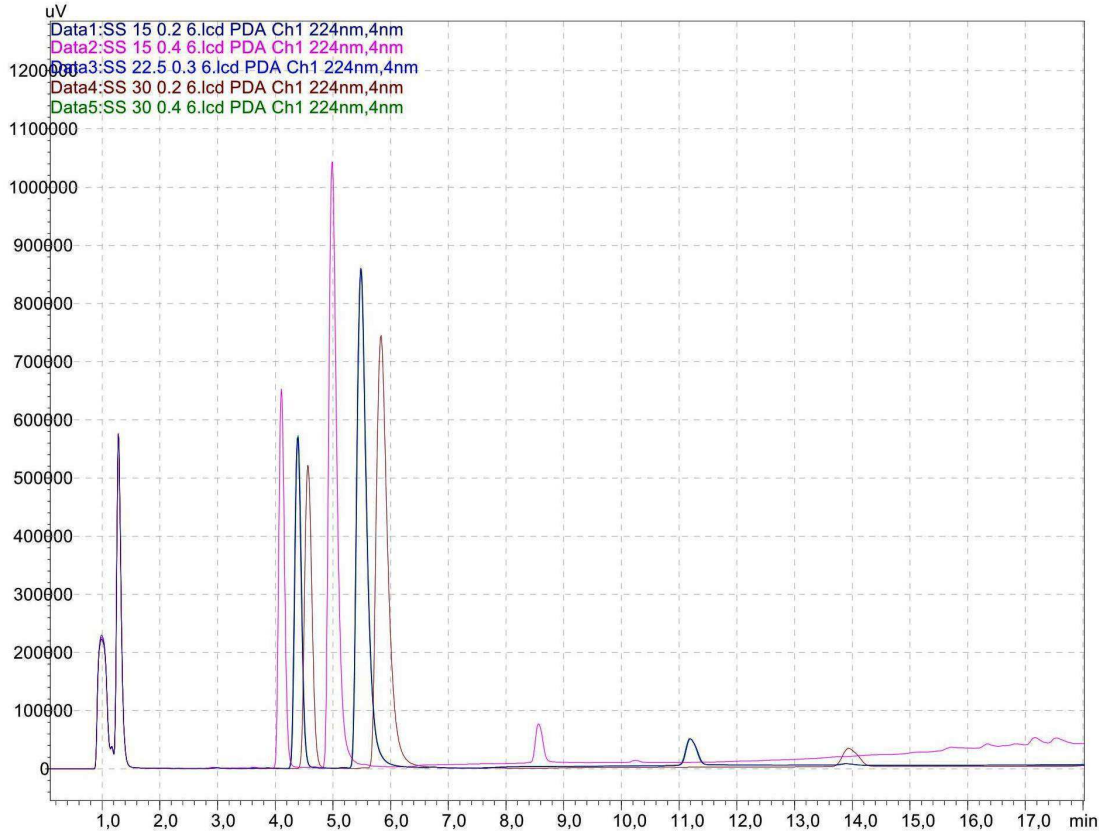
Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	3,912	884657	--
2	PDO	4,891	3475	5,987
3	OXO	9,995	881193	21,979
4	PP	10,240	143124	--

Figure 27-bis. Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH 7.

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

Batch Filename : SIMOG 6.lcb



<Peak Table>

SS 15 0.2 6.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,391	569299	--
2	PDO	5,179	1214	3,730
3	OXO	5,484	859696	1,185
4	PP	11,197	46058	17,054

SS 15 0.4 6.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,107	651232	--
2	PDO	4,662	1587	3,048
3	OXO	4,987	1040315	1,499
4	PP	8,562	66969	14,436

Figure 28. Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH 6.

SS 22.5 0.3 6.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,386	568140	--
2	PDO	5,179	1201	3,723
3	OXO	5,482	857950	1,170
4	PP	11,191	45438	17,059

SS 30 0.2 6.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,568	521464	--
2	PDO	5,542	1132	3,979
3	OXO	5,833	744210	1,206
4	PP	13,937	31193	18,490

SS 30 0.4 6.lcd

PDA Ch1 224nm

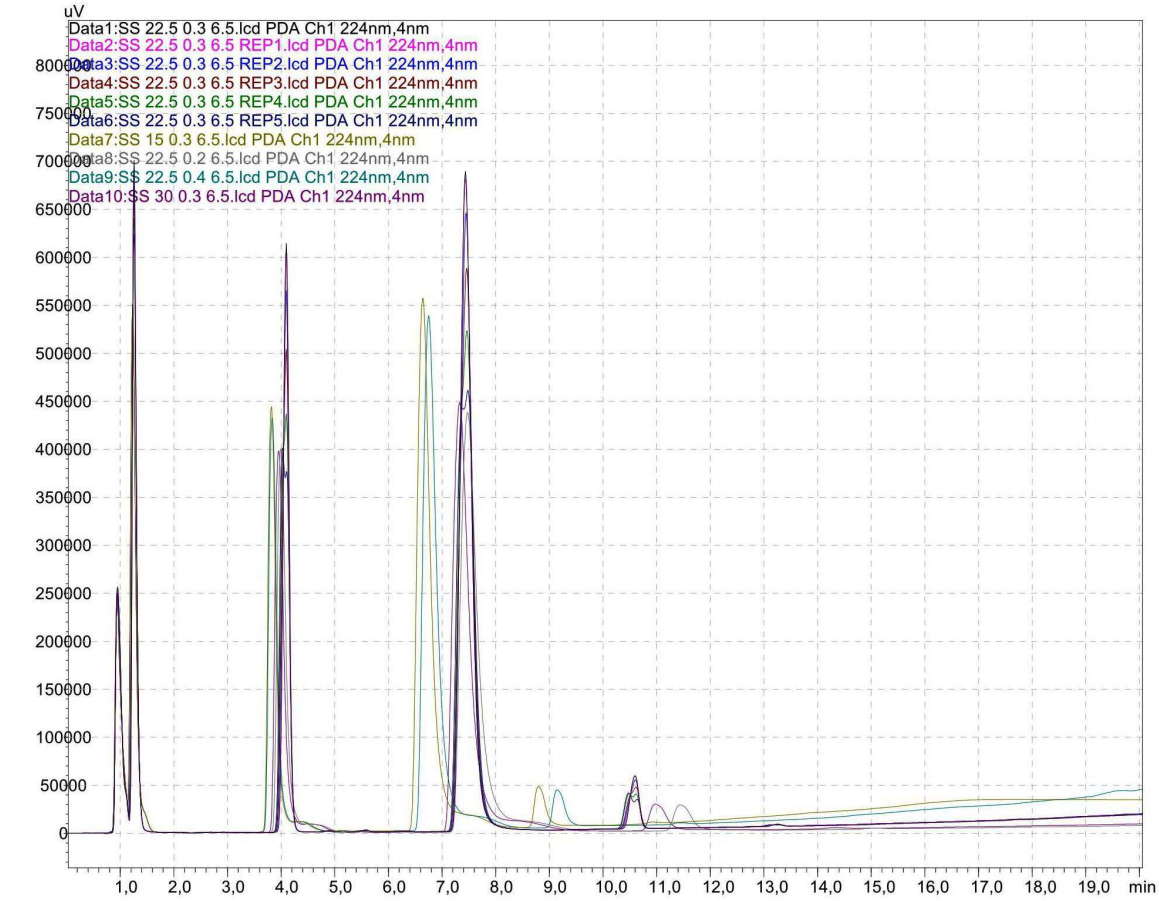
Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,397	572452	--
2	PDO	5,186	1210	3,747
3	OXO	5,490	858155	1,186
4	PP	11,186	46121	17,201

Figure 28-bis. Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH 6.

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

Batch Filename : SIMOG 6.5.lcb



<Peak Table>

SS 15 0.3 6.5.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(USP)
1	MP	3,817	443427	--
2	OXO	6,640	553857	7,843
3	PP	8,797	41975	5,332

SS 22.5 0.2 6.5.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	3,993	399565	--
2	PDO	4,501	887	0,939
3	OXO	7,475	437180	4,409
4	PP	11,435	26737	6,897

Figure 29. Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH 6,5.

SS 22.5 0.4 6.5.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	3,831	431624	--
2	PDO	4,306	1612	1,086
3	OXO	6,750	536198	4,613
4	PP	9,144	39064	5,560

SS 30 0.3 6.5.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	3,952	397382	--
2	PDO	4,489	1543	1,071
3	OXO	7,327	444483	4,537
4	PP	10,975	27279	6,529

SS 22.5 0.3 6.5.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,096	613555	--
2	PDO	4,884	1631	3,726
3	OXO	7,435	687331	8,467
4	PP	10,576	53134	8,794

SS 22.5 0.3 6.5 REP1.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,091	603261	--
2	PDO	4,877	1614	3,665
3	OXO	7,435	679828	8,418
4	PP	10,576	52454	8,731

SS 22.5 0.3 6.5 REP2.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,093	564294	--
2	PDO	4,880	1487	3,396
3	OXO	7,446	644062	7,945
4	PP	10,576	46897	7,940

SS 22.5 0.3 6.5 REP3.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,094	503043	--
2	PDO	4,880	1278	2,842
3	OXO	7,458	586535	6,836
4	PP	10,576	39895	6,784

SS 22.5 0.3 6.5 REP4.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,094	435956	--
2	PDO	4,795	947	2,112
3	OXO	7,463	521383	5,962
4	PP	10,576	33442	5,866

SS 22.5 0.3 6.5 REP5.lcd

PDA Ch1 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,026	400244	--
2	PDO	4,786	979	2,155
3	OXO	7,481	459234	5,536
4	PP	10,576	27760	5,197

Figure 29-bis. Rapport d'analyse des essais d'optimisation avec une phase mobile de pH6,5

Les résultats issus des 20 essais réalisés dans le cadre du plan d'expérience composite centré sont synthétisés et présentés de manière détaillée dans le Tableau 35.

Tableau 35. Résultats du plan d'optimisation

Essai	Tg	Δϕ	pH	Résolution entre MP et PDO (R-MP-PDO)	Résolution entre PDO et OXO (R-PDO-OXO)	Résolution entre OXO et PP (R-OXO-PP)	Temps de rétention du PP (Tr PP)
1	22,5	0,3	6,5	3,726	8,467	8,794	10,576
2	15	0,4	6	3,048	1,499	14,436	8,562
3	15	0,2	7	6,206	22,643	0,000	10,304
4	22,5	0,2	6,5	0,939	4,409	6,897	11,435
5	30	0,4	7	5,987	21,979	0,000	10,24
6	30	0,3	6,5	1,071	4,537	6,529	10,975
7	22,5	0,3	7	6,343	21,670	1,715	11,643
8	30	0,4	6	3,747	1,186	17,201	11,186
9	22,5	0,4	6,5	1,086	4,613	5,560	9,144
10	22,5	0,3	6,5	3,665	8,418	8,731	10,576
11	30	0,2	7	6,463	21,300	2,054	12,491
12	22,5	0,3	6	3,723	1,170	17,059	11,191
13	15	0,4	7	5,388	20,466	0,000	7,927
14	15	0,3	6,5	0,000	7,843	5,332	8,797
15	22,5	0,3	6,5	3,396	7,945	7,940	10,576
16	22,5	0,3	6,5	2,842	6,836	6,784	10,576
17	30	0,2	6	3,979	1,206	18,49	13,937
18	22,5	0,3	6,5	2,112	5,962	5,866	10,576
19	22,5	0,3	6,5	2,155	5,536	5,197	10,576
20	15	0,2	6	3,730	1,185	17,054	11,197

L'analyse des résultats du plan central composite s'est déployée en deux étapes distinctes et complémentaires.

Dans une première phase, l'attention s'est concentrée sur les essais correspondant au plan factoriel complet. Cette approche a permis d'explorer en détail les effets individuels des facteurs, mettant en lumière les influences directes et croisées. Cette approche permet de justifier le choix spécifique des facteurs pour la conception expérimentale. L'analyse a été réalisée à l'aide de Stat-Ease Design Expert v7.

Dans une seconde étape, l'interprétation s'est étendue à l'ensemble des essais. Cette approche globale a été cruciale pour développer un modèle de second degré, offrant une représentation mathématique plus approfondie des relations entre les facteurs et les réponses. La construction

de ce modèle de second ordre a établi les bases essentielles permettant l'optimisation des quatre réponses étudiées, facilitant ainsi la recherche des conditions opérationnelles optimales. L'analyse a été réalisée à l'aide de MINITAB 18.

3.2. Plan factoriel complet

Les résultats issus des 11 essais étudiés dans le cadre du plan d'expérience factoriel complet sont présentés dans le Tableau 36.

Tableau 36. Résultats du plan factoriel complet

Essai	Facteur A	Facteur B	Facteur C	R-MP-PDO	R-PDO-OXO	R-OXO-PP	Tr PP
	Tg(min)	Δϕ	pH				
1	15	0,2	6	3,730	1,185	17,054	11,197
2	30	0,2	6	3,979	1,206	18,490	13,937
3	15	0,4	6	3,048	1,499	14,436	8,562
4	30	0,4	6	3,747	1,186	17,201	11,186
5	15	0,2	7	6,206	22,643	0,000	10,304
6	30	0,2	7	6,463	21,300	2,054	12,491
7	15	0,4	7	5,388	20,466	0,000	7,927
8	30	0,4	7	5,987	21,979	0,000	10,24
9	22,5	0,3	6,5	3,726	8,467	8,794	10,576
10	22,5	0,3	6,5	3,665	8,418	8,731	10,576
11	22,5	0,3	6,5	3,396	7,945	7,940	10,576

3.2.1. Etude des facteurs influençant la résolution entre MP et PDO (R-MP-PDO)

Résultats

A. Modèle mathématique

Le modèle mathématique retenu est un modèle linéaire qui englobe les principaux facteurs ainsi que les interactions du deuxième degré.

La sélection des termes qui entrent dans le calcul du modèle a été faite en se basant sur l'amélioration du R^2 ajusté.

B. Analyse de la variance

Le Tableau 37 donne un résumé de l'analyse de la variance.

Tableau 37. Analyse de la variance (R-MP-PDO, Plan factoriel complet)

Source de variation	SCE	ddl	CM	F-value	p-value
Modèle	12,39	3	4,13	154,30	< 0.0001
A (Tg)	0,4068	1	0,4068	15,19	0,0080
B (Δϕ)	0,6094	1	0,6094	22,76	0,0031
C (pH)	11,38	1	11,38	424,93	< 0.0001
Courbure	3,26	1	3,26	121,86	< 0.0001
Résiduel	0,1606	6	0,0268		
Manque d'ajustement	0,0990	4	0,0247	0,8026	0,6204
Erreur pure	0,0617	2	0,0308		
Variance totale	15,82	10			

C. Effet des facteurs et établissement du modèle

Les effets des facteurs et leur contribution sont présentés dans le Tableau 38.

Tableau 38. Tableau des effets(R-MP-PDO, Plan factoriel complet)

Facteur	Notation	Effet	Pourcentage de contribution
Point central	$\mathbf{a_0}$	**-10,53**	/
A (Tg)	$\mathbf{a_1}$	**+0,03**	2,57
B (Δϕ)	$\mathbf{a_2}$	**-2,76**	3,85
C (pH)	$\mathbf{a_3}$	**+2,38**	71,93

Le modèle est le suivant :

$$\mathbf{R\text{-}MP\text{-}PDO = -10,5 + 0,03\ A - 2,76\ B + 2,38\ C}$$

La Figure 30 présente le graphique demi-normal des résidus, visant à évaluer la normalité des résidus standardisés du modèle. Cette analyse permet de mettre en évidence les effets significatifs du modèle.

Le diagramme de Pareto illustré dans la Figure 31 offre une représentation graphique des effets relatifs des différents facteurs dans le modèle.

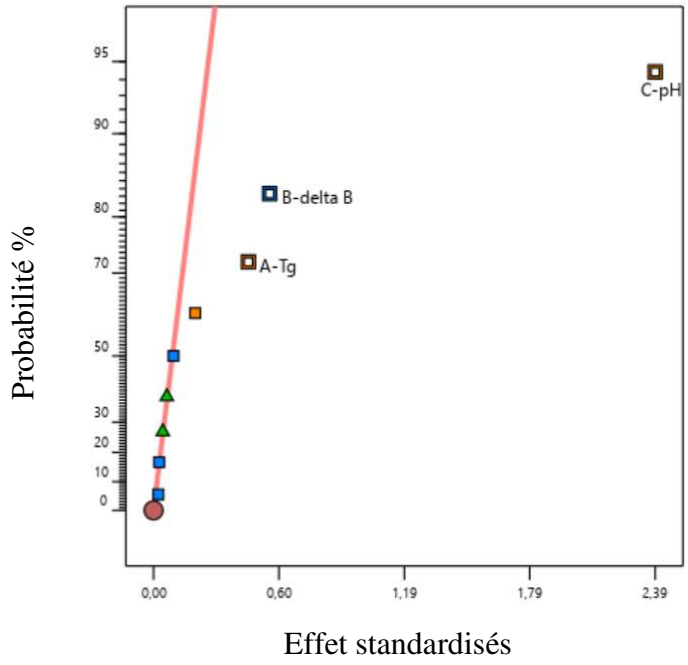


Figure 30. Graphique Demi-Normal(R-MP-PDO, Plan factoriel complet)

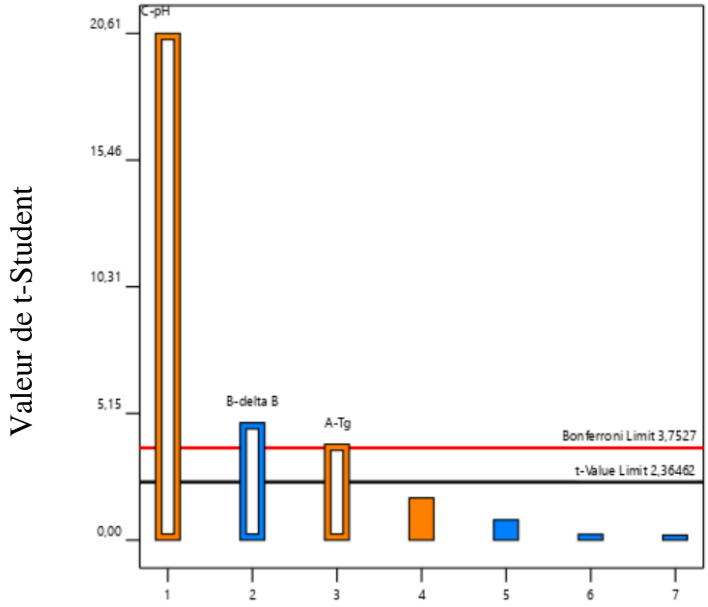


Figure 31. Diagramme de Pareto(R-MP-PDO, Plan factoriel complet)
(4 : AB ; 5 : BC ; 6 : ABC ; 7 : AC)

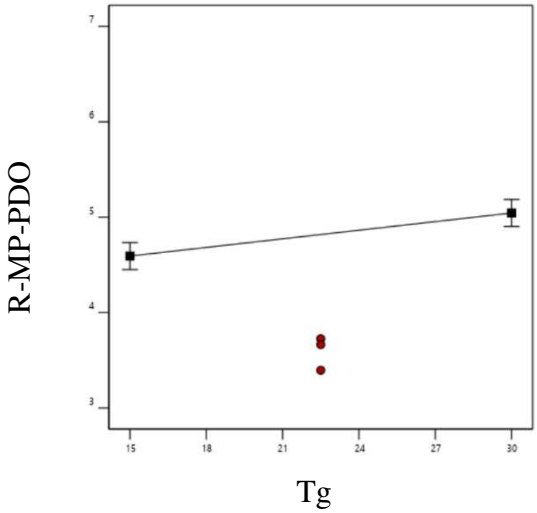


Figure 32. Graphique de l'effet du Tg sur la résolution MP-PDO (Plan factoriel complet)

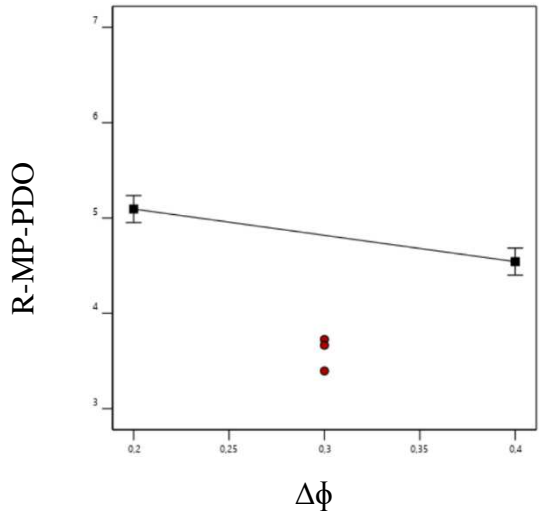


Figure 33. Graphique de l'effet du Δϕ sur la résolution MP-PDO (Plan factoriel complet)

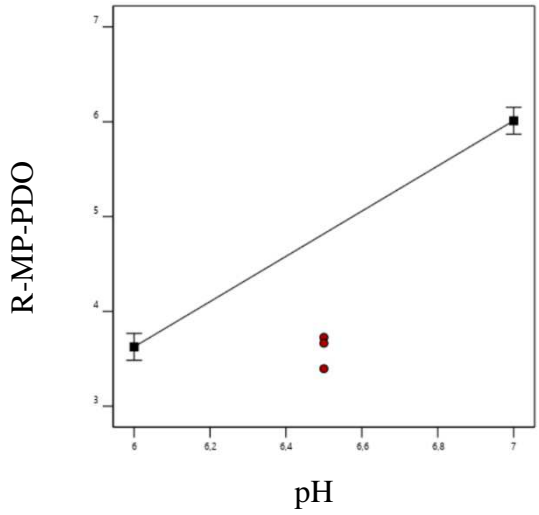


Figure 34. Graphique de l'effet du pH sur la résolution MP-PDO (Plan factoriel complet)

D. Ajustement du modèle

L'ajustement du modèle peut être évalué à l'aide de deux critères résumés dans le Tableau 39.

Tableau 39. Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle (Plan factoriel complet)

Coefficient de détermination	Valeur
R^2	0,987
R^2 ajusté	0,981

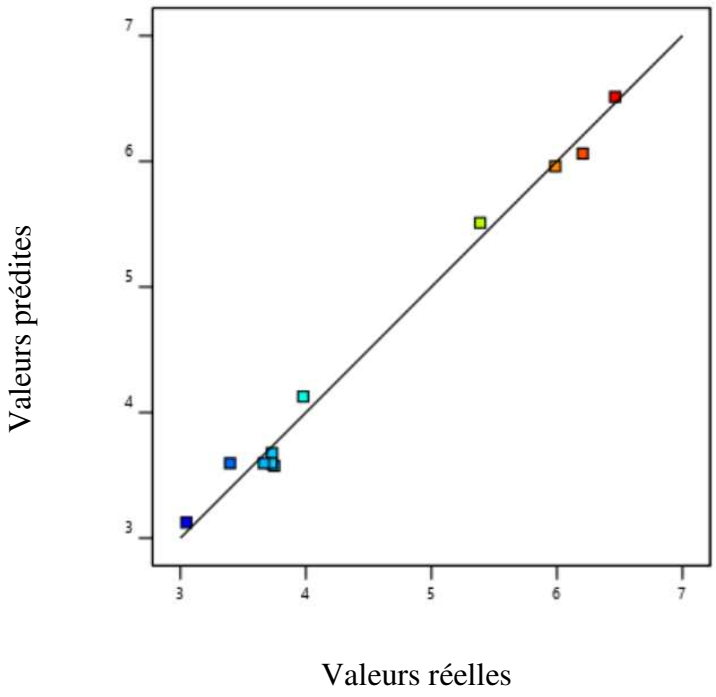


Figure 35. Droite d'ajustement(R-MP-PDO, Plan factoriel complet)

E. Analyse des résidus

La Figure 36 présente les résidus du modèle en fonction des quantiles d'une distribution normale standard.

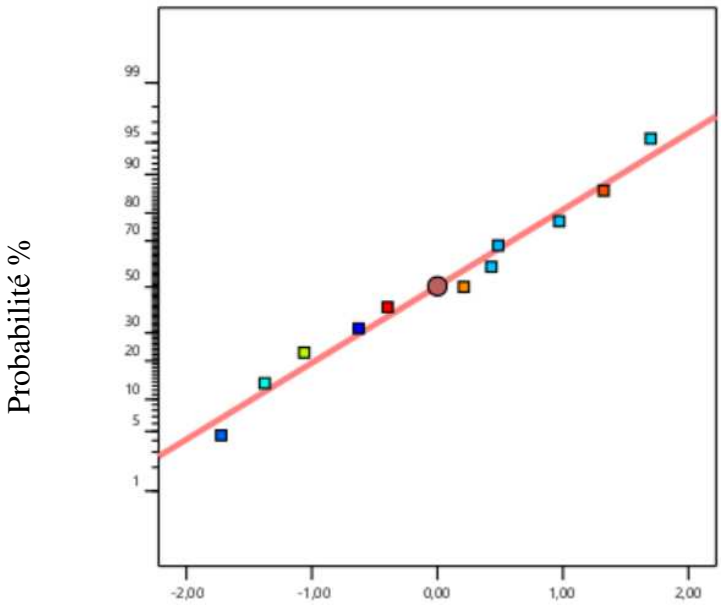


Figure 36. Graphique normal des résidus(R-MP-PDO, Plan factoriel complet)

Discussion :

La valeur F du modèle, établie à 154,30, confirme la significativité du modèle, avec une probabilité inférieure à 0,01% que cette valeur élevée soit attribuable au hasard.

Les valeurs P inférieures à 0,05 indiquent la significativité des termes du modèle, et dans cette situation, les facteurs Tg, $\Delta\phi$ et pH sont significatifs. Les interactions ne sont pas significatives, conduisant à une réduction du modèle pour améliorer ses performances.

L'analyse combinée du diagramme de Pareto et du graphique demi-normal plot permet d'identifier clairement les facteurs significatifs.

Les effets des facteurs Tg et pH sont positifs (+0,03 et +2,38 respectivement), représentant une contribution de 2,57 et 71,93%, respectivement. L'effet du facteur $\Delta\phi$ est négatif (-2,75) comme illustré dans les graphiques des effets sur la résolution MP-PDO.

La valeur P du manque d'ajustement est de 0,6204, montrant que le manque d'ajustement n'est pas significatif. Le modèle s'ajuste efficacement.

Les critères de performance du modèle sont satisfaisants, avec un coefficient de détermination élevé de 0,9872 et un coefficient de détermination ajusté de 0,9808. Ces indicateurs suggèrent une capacité du modèle à expliquer la variance des données et à fournir des prédictions fiables.

Le graphique normal des résidus met en évidence que ces derniers s'alignent approximativement le long de la ligne, suggérant ainsi que leur distribution suit une tendance proche de la normalité.

3.2.2. Etude des facteurs influençant la résolution entre PDO et OXO (R-PDO-OXO)

Résultats :

A. Modèle mathématique

Le modèle mathématique retenu est un modèle linéaire qui englobe les principaux facteurs ainsi que les interactions du deuxième degré.

La sélection des termes qui entrent dans le calcul du modèle a été faite en se basant sur l'amélioration du r^2 ajusté.

B. Analyse de la variance

Le Tableau 40 donne un résumé de l'analyse de la variance.

Tableau 40. Analyse de la variance(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)

Source de variation	SCE	ddl	CM	F-value	p-value
Modèle	826,46	1	826,46	2324,42	< 0.0001
C (pH)	826,46	1	826,46	2324,42	< 0.0001
Courbure	21,74	1	21,74	61,13	< 0.0001
Résiduel	2,84	8	0,3556		
Manque d'ajustement	2,68	6	0,4464	5,37	0,1653
Erreur pure	0,1662	2	0,0831		
Variance totale	851,04	10			

C. Effet des facteurs et établissement du modèle

Les effets des facteurs et leur contribution sont présentés dans le Tableau 41.

Tableau 41. Tableau des effets(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)

Facteur	Notation	Effet	Pourcentage de contribution
Point central	$\mathbf{a_0}$	**-120,70**	/
C (pH)	$\mathbf{a_1}$	**+20,33**	97,11

Le modèle est le suivant :

$$\mathbf{R\text{-}PDO\text{-}OXO = -120,7 + 20,33\ C}$$

La Figure 37 présente le graphique demi-normal des résidus, visant à évaluer la normalité des résidus standardisés du modèle. Cette analyse permet de mettre en évidence les effets significatifs du modèle.

Le diagramme de Pareto illustré dans la Figure 38 offre une représentation graphique des effets relatifs des différents facteurs dans le modèle.

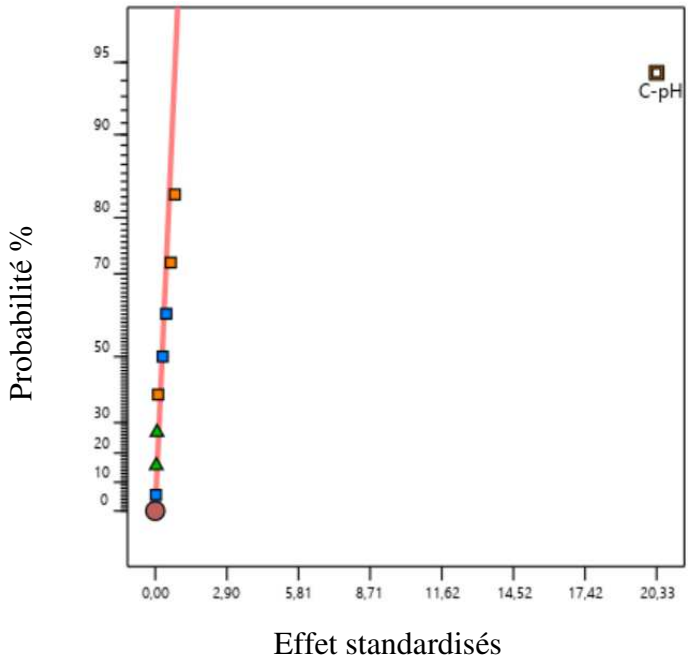


Figure 37. Graphique Demi-Normal(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)

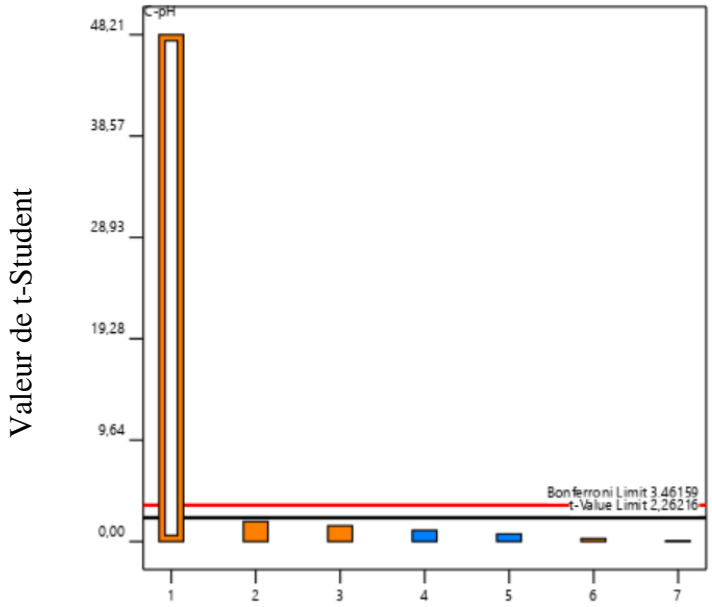


Figure 38. Diagramme de Pareto(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)
(2 : ABC ; 3 : AB ; 4 : BC ; 5 : B ; 6 : AC ; 7 : A)

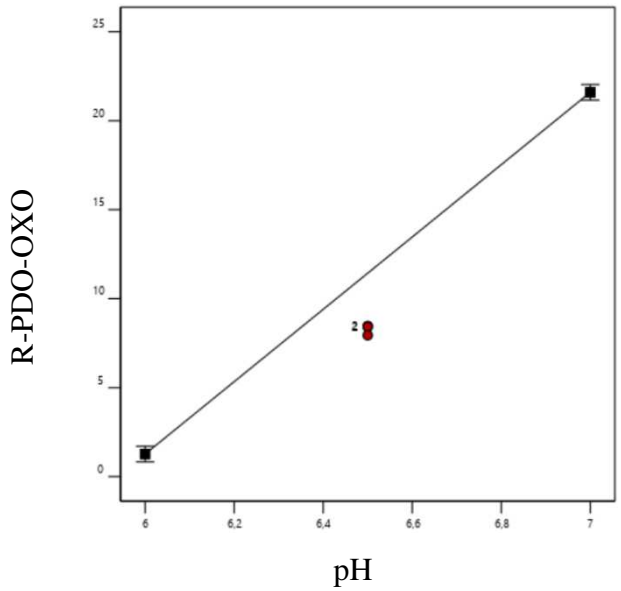


Figure 39. Graphique de l'effet du pH sur la résolution PDO-OXO (Plan factoriel complet)

D. Ajustement du modèle

L'ajustement du modèle peut être évalué à l'aide de trois critères résumés dans le Tableau 42

Tableau 42. Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle

(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)

Coefficient de détermination	Valeur
R^2	0,999
R^2 ajusté	0,999

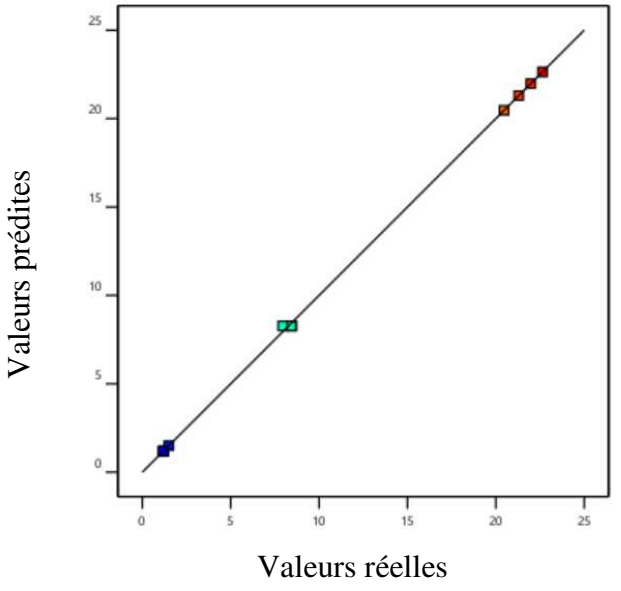


Figure 40. Droite d'ajustement(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)

E. Analyse des résidus

La Figure 41 présente les résidus du modèle en fonction des quantiles d'une distribution normale standard.

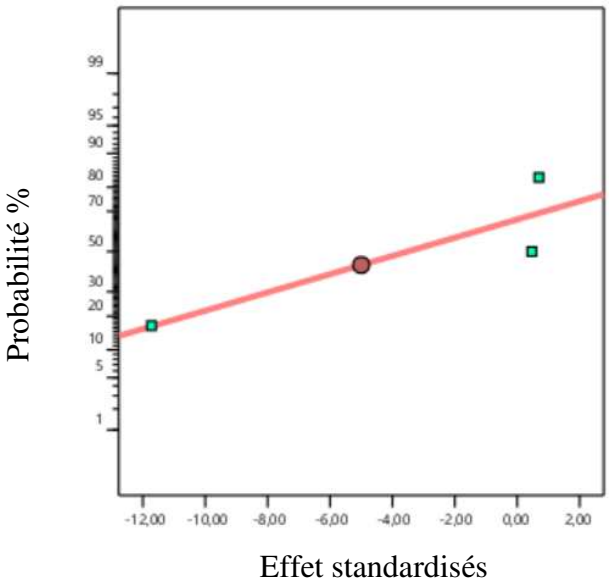


Figure 41. Graphique normal des résidus(R-PDO-OXO, Plan factoriel complet)

Discussion :

La valeur F du modèle, établie à 2324,42, confirme la significativité du modèle, avec une probabilité inférieure à 0,01% que cette valeur élevée soit attribuable au hasard.

Les valeurs P inférieures à 0,05 indiquent la significativité des termes du modèle, et dans cette situation, seul le facteur « pH »est significatif. Les autres facteurs et les interactions ne sont pas significatifs, conduisant à une réduction du modèle pour améliorer ses performances.

L'analyse combinée du diagramme de Pareto et du graphique demi-normal plot permet d'identifier clairement que seul le facteur « pH » est significatif.

L'effet du facteur pH est positif (+20,33) représentant une contribution de 97,11%comme illustré dans le graphique de l'effet du pH sur la résolution PDO-OXO (Figure 39).

La valeur P du manque d'ajustement est de 0,1653, montrant que le manque d'ajustement n'est pas significatif. Le modèle s'ajuste efficacement.

Les critères de performance du modèle sont satisfaisants, avec un coefficient de détermination élevé de 0,9998 et un coefficient de détermination ajusté de 0,9991. Ces indicateurs suggèrent une capacité du modèle à expliquer la variance des données et à fournir des prédictions fiables.

Le graphique normal des résidus met en évidence que ces derniers s'alignent approximativement le long de la ligne, suggérant ainsi que leur distribution suit une tendance proche de la normalité.

3.2.3. Etude des facteurs influençant la résolution entre OXO et PP (R-OXO-PP)

Résultats :

A. Modèle mathématique

Le modèle mathématique retenu est un modèle linéaire qui englobe les principaux facteurs ainsi que les interactions du deuxième degré.

La sélection des termes qui entrent dans le calcul du modèle a été faite en se basant sur l'amélioration du R^2 ajusté.

B. Analyse de la variance

Le Tableau 43 donne un résumé de l'analyse de la variance.

Tableau 43. Analyse de la variance (R-OXO-PP, Plan factoriel complet)

Source de variation	SCE	ddl	CM	F-value	p-value
Modèle	539,52	3	179,84	365,20	< 0.0001
A (Tg)	4,89	1	4,89	9,93	0,0198
B (Δϕ)	4,44	1	4,44	9,02	0,0239
C (pH)	530,19	1	530,19	1076,65	< 0.0001
Courbure	0,0602	1	0,0602	0,1222	0,7387
Résiduel	2,95	6	0,4924		
Manque d'ajustement	2,50	4	0,6254	2,76	0,2831
Erreur pure	0,4530	2	0,2265		
Variance totale	542,54	10			

C. Effet des facteurs et établissement du modèle

Les effets des facteurs et leur contribution sont présentés dans le Tableau 44.

Tableau 44. Tableau des effets(R-OXO-PP, Plan factoriel complet)

Facteur	Notation	Effet	Pourcentage de contribution
Point central	$\mathbf{a_0}$	**+114,37**	/
A (Tg)	$\mathbf{a_1}$	**+0,104**	0,90
B (Δϕ)	$\mathbf{a_2}$	**-7,45**	0,82
C (pH)	$\mathbf{a_3}$	**-16,28**	97,72

Le modèle est le suivant :

R-OXO-PP = +114,37 + 0,104 A – 7,45 B – 16,28 C

La Figure 42 présente le graphique demi-normal des résidus, visant à évaluer la normalité des résidus standardisés du modèle. Cette analyse permet de mettre en évidence les effets significatifs du modèle.

Le diagramme de Pareto illustré dans la Figure 43 offre une représentation graphique des effets relatifs des différents facteurs dans le modèle.

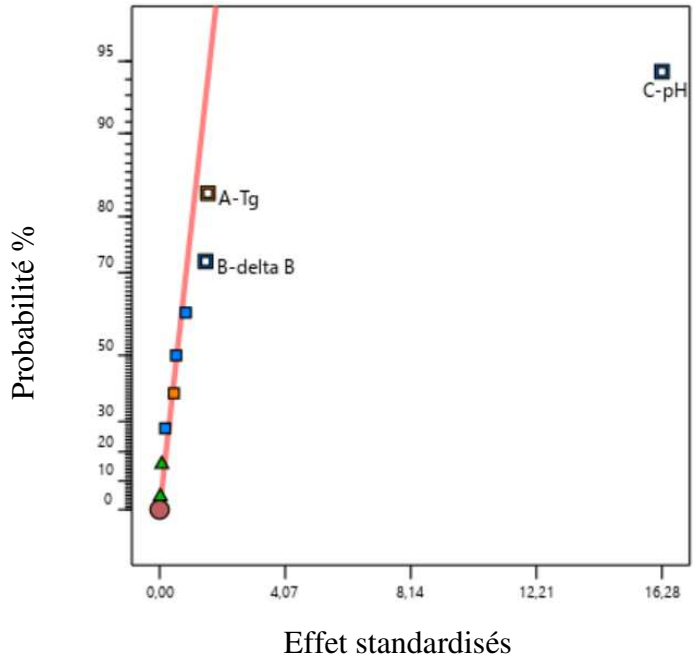


Figure 42. Graphique Demi-Normal(R-OXO-PP, Plan factoriel complet)

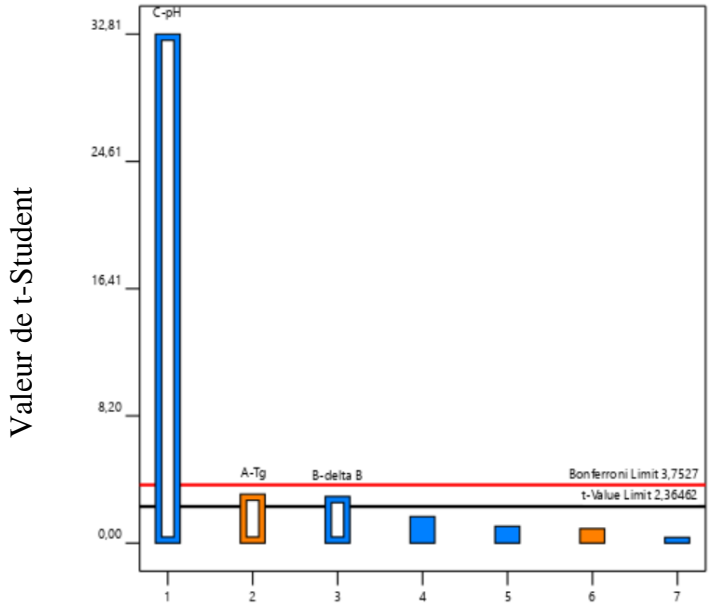


Figure 43. Diagramme de Pareto(R-OXO-PP, Plan factoriel complet)
(4 : ABC ; 5 : AC ; 6 : BC ; 7 : AB)

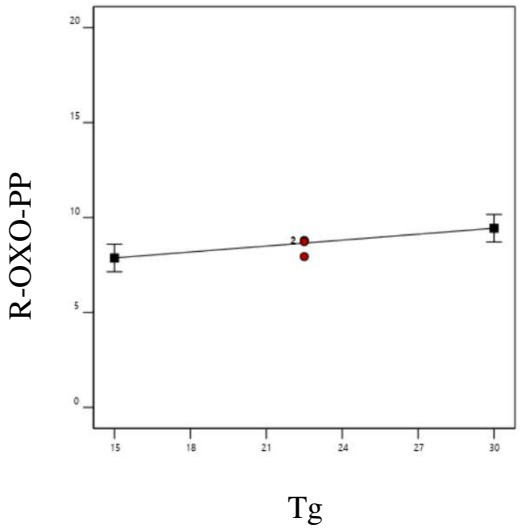


Figure 44. Graphique de l'effet du Tg sur la résolution OXO-PP (Plan factoriel complet)

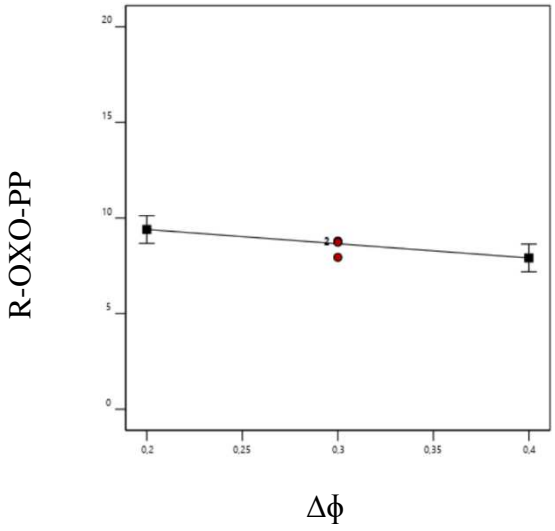


Figure 45. Graphique de l'effet du Δϕ sur la résolution OXO-PP (Plan factoriel complet)

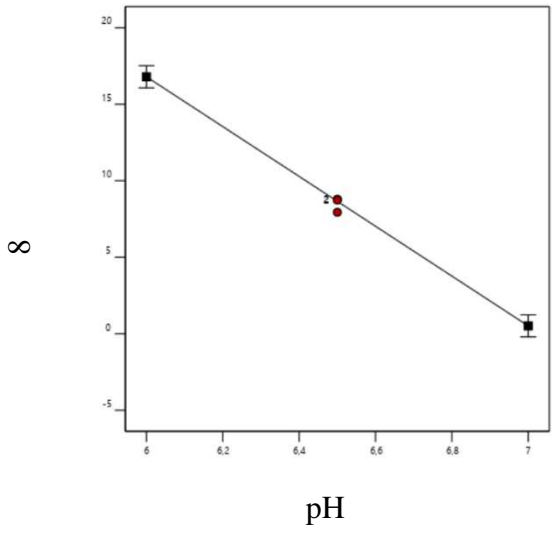


Figure 46. Graphique de l'effet du pH sur la résolution OXO-PP (Plan factoriel complet)

D. Ajustement du modèle

L'ajustement du modèle peut être évalué à l'aide de trois critères résumés dans le Tableau 45.

Tableau 45. Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle (R-OXO-PP, Plan factoriel complet)

Coefficient de détermination	Valeur
R^2	0,9992
R^2 ajusté	0,9962

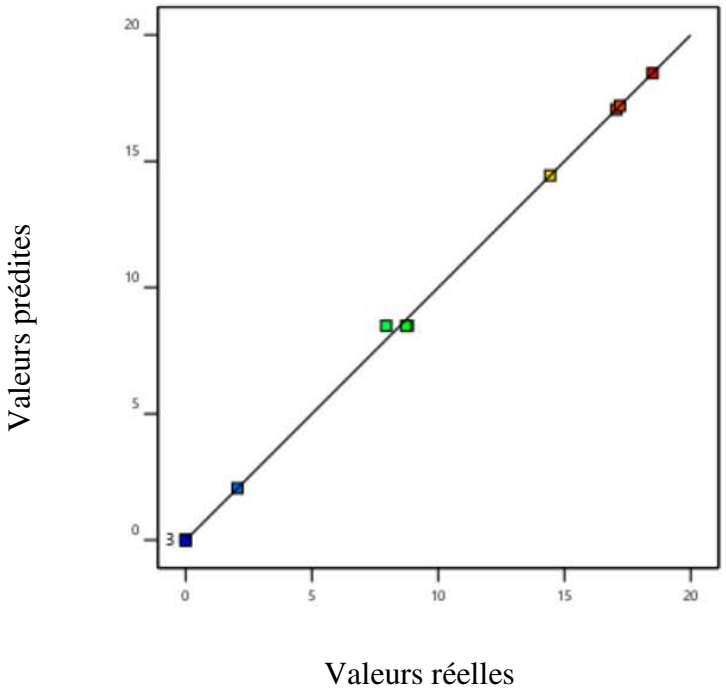


Figure 49. Droite d'ajustement(R-OXO-PP, Plan factoriel complet)

E. Analyse des résidus

La Figure 48 présente les résidus du modèle en fonction des quantiles d'une distribution normale standard.

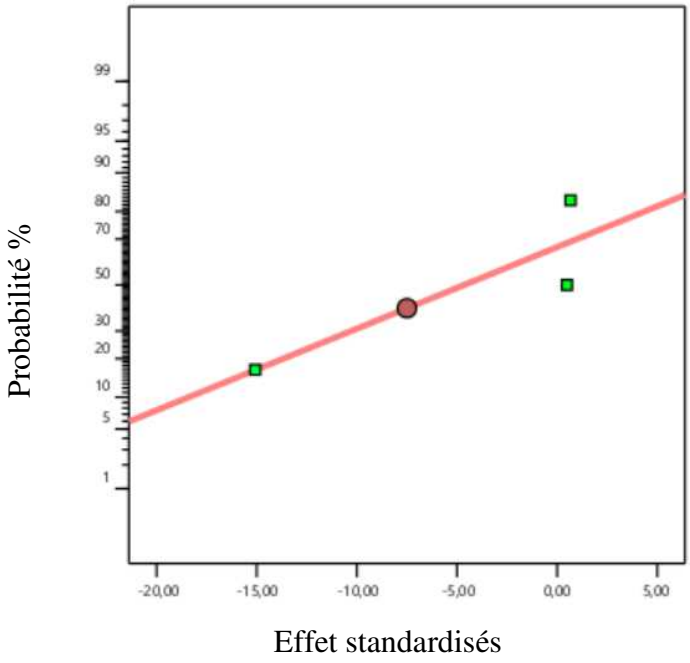


Figure 48. Graphique normal des résidus (R-OXO-PP, Plan factoriel complet)

Discussion :

La valeur F du modèle, établie à 365,20, confirme la significativité du modèle, avec une probabilité inférieure à 0,01% que cette valeur élevée soit attribuable au hasard.

Les valeurs P inférieures à 0,05 indiquent la significativité des termes du modèle, et dans cette situation, les facteurs Tg, $\Delta\phi$ et pH sont significatifs. Les interactions ne sont pas significatives, conduisant à une réduction du modèle pour améliorer ses performances.

L'analyse combinée du diagramme de Pareto et du graphique demi-normal plot permet d'identifier clairement les facteurs significatifs.

Les effets des facteurs $\Delta\phi$ et pH sont négatifs (-7,45 et -16,28 respectivement), représentant une contribution de 0,82 et 97,72%, respectivement. L'effet du facteur Tg est positif (+0,104) comme illustré dans les graphiques des effets sur la résolution OXO-PP.

La valeur P du manque d'ajustement est de 0,2831, montrant que le manque d'ajustement n'est pas significatif. Le modèle s'ajuste efficacement.

Les critères de performance du modèle sont satisfaisants, avec un coefficient de détermination élevé de 0,9992 et un coefficient de détermination ajusté de 0,9962.

Ces indicateurs suggèrent une capacité du modèle à expliquer la variance des données et à fournir des prédictions fiables.

Le graphique normal des résidus met en évidence que ces derniers s'alignent approximativement le long de la ligne, suggérant ainsi que leur distribution suit une tendance proche de la normalité.

3.2.4. Etude des facteurs influençant le temps de rétention du PP (Tr-PP)

Résultats

A. Modèle mathématique

Le modèle mathématique retenu est un modèle linéaire qui englobe les principaux facteurs ainsi que les interactions du deuxième degré.

La sélection des termes qui entrent dans le calcul du modèle a été faite en se basant sur l'amélioration du r^2 ajusté.

B. Analyse de la variance

Le Tableau 46 donne un résumé de l'analyse de la variance.

Tableau 46. Analyse de la variance (Tr-PP, Plan factoriel complet)

Source de variation	SCE	ddl	CM	F-value	p-value
Modèle	26,78	5	5,36	2921,94	< 0.0001
A (Tg)	12,16	1	12,16	6634,29	< 0.0001
B (Δϕ)	12,54	1	12,54	6837,60	< 0.0001
C (pH)	1,92	1	1,92	1047,76	< 0.0001
AC	0,0933	1	0,0933	50,90	0,0020
BC	0,0718	1	0,0718	39,18	0,0033
Courbure	0,0521	1	0,0521	28,41	0,0060
Résiduel	0,0073	4	0,0018		
Manque d'ajustement	0,0073	2	0,0037		
Erreur pure	0,0000	2	0,0000		
Variance totale	26,84	10			

C. Effet des facteurs et établissement du modèle

Les effets des facteurs et leur contribution sont présentés dans le Tableau 47.

Tableau 47. Tableau des effets (Tr-PP, Plan factoriel complet)

Facteur	Notation	Effet	Pourcentage de contribution
Point central	$\mathbf{a_0}$	**+16,64**	/
A (Tg)	$\mathbf{a_1}$	**+0,35**	45,31
B (Δϕ)	$\mathbf{a_2}$	**-24,84**	46,69
C (pH)	$\mathbf{a_3}$	**-0,90**	7,15
AC	$\mathbf{a_{13}}$	**-0,03**	0,35
BC	$\mathbf{a_{23}}$	**+1,90**	0,27

Le modèle est le suivant :

R-Tr-PP = +16,64 + 0,35 A – 24,84 B – 0,90 C – 0,03 AC + 1,90 BC

La Figure 49 présente le graphique demi-normal des résidus, visant à évaluer la normalité des résidus standardisés du modèle. Cette analyse permet de mettre en évidence les effets significatifs du modèle.
Le diagramme de Pareto illustré dans la Figure 50 offre une représentation graphique des effets relatifs des différents facteurs dans le modèle.

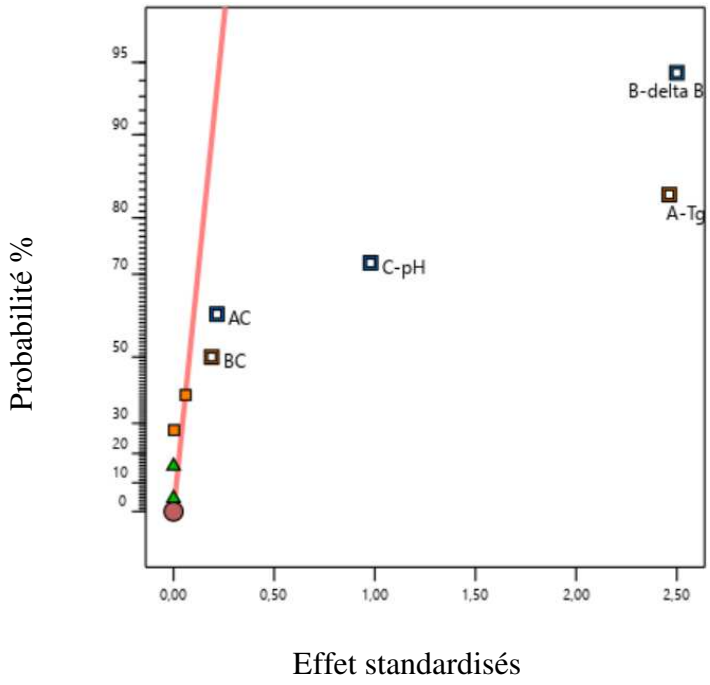


Figure 49. Graphique Demi-Normal (Tr-PP, Plan factoriel complet)

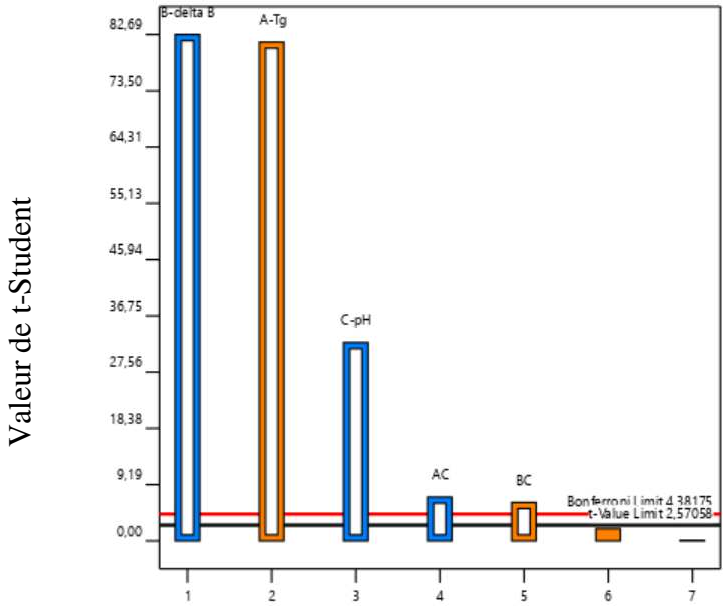


Figure 50. Diagramme de Pareto (Tr-PP, Plan factoriel complet)
(6 : ABC ; 7 : AB)

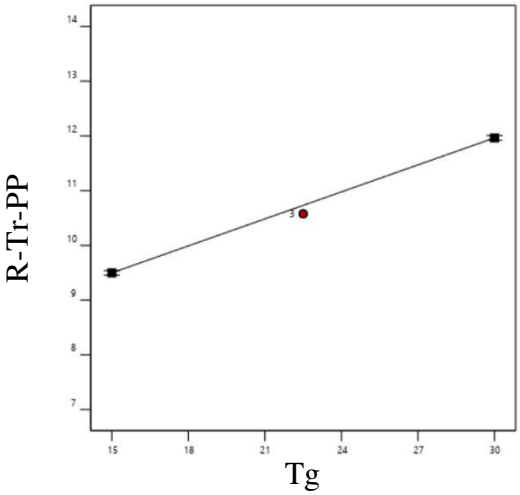


Figure 51. Graphique de l'effet du Tg sur Tr-PP (Plan factoriel complet)

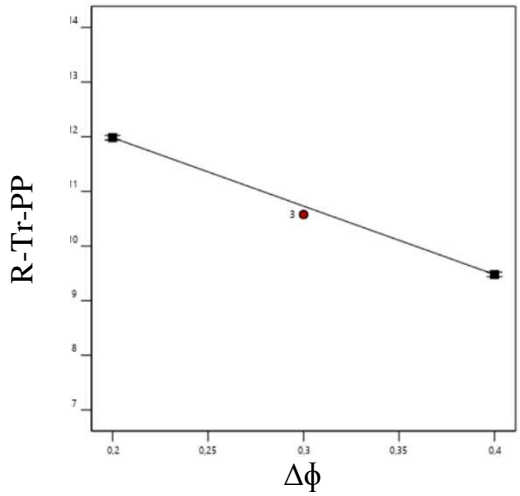


Figure 52. Graphique de l'effet du Δϕ sur Tr-PP (Plan factoriel complet)

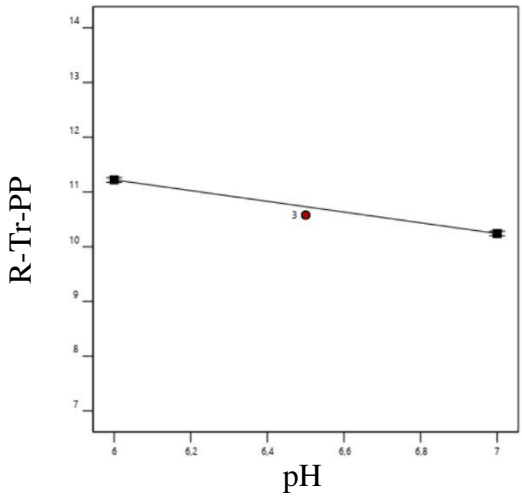


Figure 53. Graphique de l'effet du pH sur Tr-PP (Plan factoriel complet)

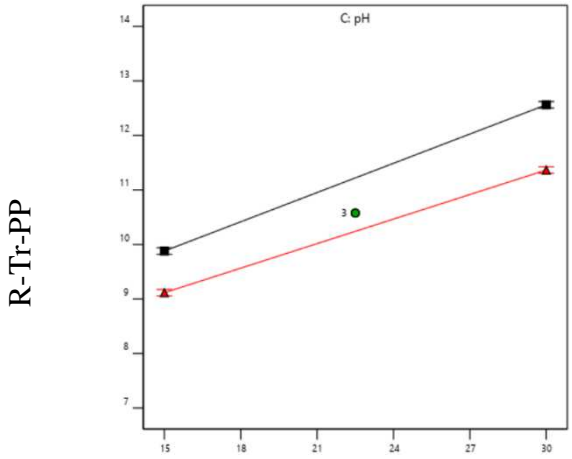


Figure 54. Graphique de l'effet De l'interaction AC sur Tr-PP (Plan factoriel complet)

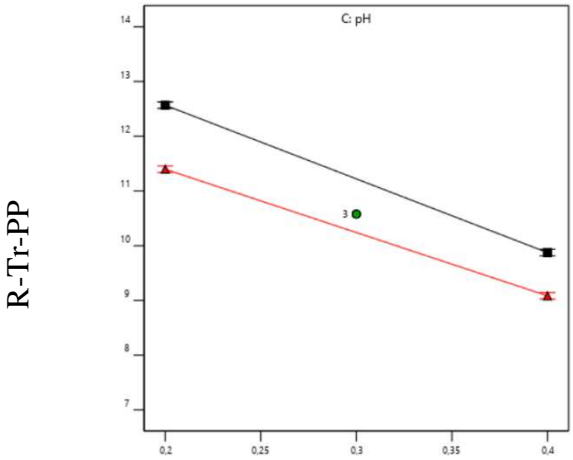


Figure 55. Graphique de l'effet De l'interaction BC sur Tr-PP (Plan factoriel complet)

D. Ajustement du modèle

L'ajustement du modèle peut être évalué à l'aide de deux critères résumés dans le Tableau 48.

Tableau 48. Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle

(Tr-PP, Plan factoriel complet)

Coefficient de détermination	Valeur
R^2	0,999
R^2 ajusté	0,999

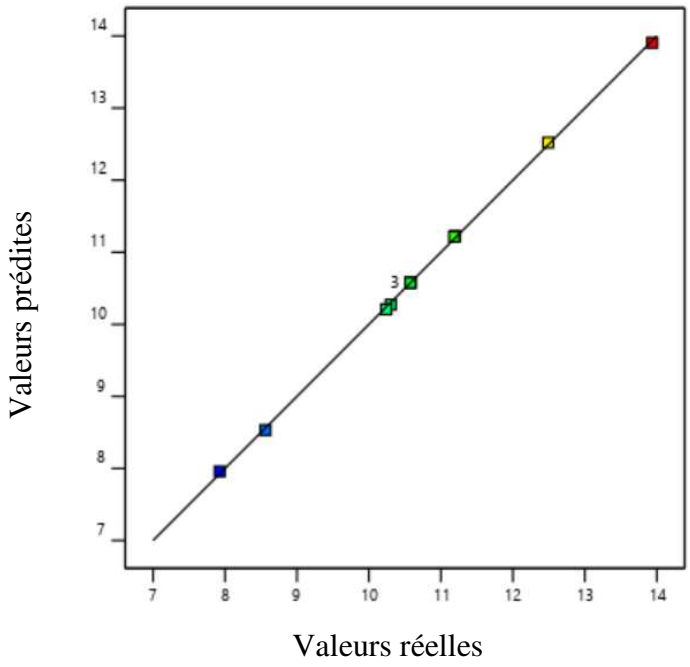


Figure 56. Droite d'ajustement (Tr-PP, Plan factoriel complet)

E. Analyse des résidus

La figure 57 présente les résidus du modèle en fonction des quantiles d'une distribution normale standard.

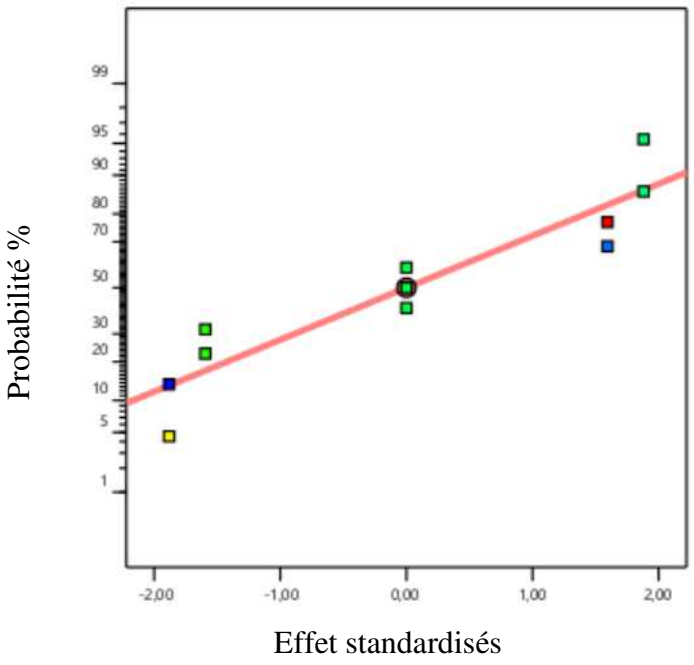


Figure 57. Graphique normal des résidus (Tr-PP, Plan factoriel complet)

Discussion

Les résultats de l'analyse statistique du modèle présentent des éléments clés qui renforcent la validité et la fiabilité des résultats. La valeur F du modèle est de 2921,94, indique une significativité du modèle, avec une probabilité inférieure à 0,01% que cette valeur élevée soit attribuable au hasard. Cette constatation confirme la robustesse de notre modèle par rapport à la variabilité aléatoire.

En examinant les valeurs P, nous identifions plusieurs termes significatifs. Les facteurs Tg, Δϕ et pH, ainsi que les interactions Tg-pH et Δϕ-pH, présentent des valeurs P inférieures à 0,05, soulignant ainsi leur contribution significative au modèle. Cependant, les autres interactions ne dépassent pas ce seuil, suggérant qu'elles ne jouent pas un rôle significatif dans notre analyse.

Une approche de réduction du modèle est ensuite envisagée pour améliorer ses performances, basée sur l'analyse combinée du diagramme de Pareto et du graphique demi-normal plot, qui permettent d'identifier clairement les facteurs significatifs.

En ce qui concerne les effets des facteurs, nous constatons que les facteurs Δϕ, pH et l'interaction Tg-pH ont des effets négatifs, représentant des contributions respectives de 46,69%, 7,15% et 0,35%. D'autre part, les effets du facteur Tg et de l'interaction Δϕ-pH sont positifs, contribuant respectivement à 45,31% et 0,27%. Ces résultats mettent en évidence l'importance de chaque facteur dans la variation des résultats de notre modèle.

Les graphiques illustrant les effets des facteurs et des interactions sur la résolution Tr-PP complètent notre analyse, fournissant une visualisation claire des contributions de chaque variable.

Le manque d'ajustement, non significatif, et les critères de performance élevés, avec un coefficient de détermination de 0,9997 et un coefficient de détermination ajusté de 0,9994, attestent de la capacité du modèle à expliquer la variance des données et à produire des prédictions fiables.

Enfin, l'examen du graphique normal des résidus suggère que la distribution suit une tendance proche de la normalité, renforçant ainsi la validité des résultats et la robustesse du modèle dans la modélisation des données. Ces éléments globaux confirment la pertinence du modèle établi pour comprendre et prédire les relations entre les variables étudiées.

Conclusion

Les résultats des expériences menées sur les effets des facteurs Tg, Δϕ et pH sur différentes réponses (résolution entre MP et PDO, résolution entre PDO et OXO, résolution entre OXO et PP, et temps de rétention du PP) démontrent la pertinence et la robustesse des modèles mathématiques basés sur les plans factoriels complets. Les analyses statistiques ont confirmé la significativité des modèles, avec des valeurs F élevées associées à des p-values très faibles.

Dans le premier plan, portant sur la résolution entre MP et PDO, les facteurs Tg, Δϕ et pH ont été identifiés comme significatifs. Les effets positifs de Tg et pH, ainsi que l'effet négatif de Δϕ, ont été clairement démontrés. Le modèle a montré une excellente capacité à expliquer la variance des données avec des critères de performance élevés.

Le deuxième plan, axé sur la résolution entre PDO et OXO, a souligné l'importance significative du facteur pH. Le modèle a présenté une capacité exceptionnelle à expliquer la variance des données, avec une contribution majeure du facteur pH, comme illustré par son effet positif substantiel.

Dans le troisième plan, portant sur la résolution entre OXO et PP, les facteurs Tg, Δϕ et pH ont été identifiés comme significatifs. Les effets négatifs de Δϕ et pH, ainsi que l'effet positif de Tg, ont été mis en évidence. Le modèle a montré une excellente capacité à expliquer la variance des données avec des critères de performance élevés.

Enfin, le quatrième plan, consacré au temps de rétention du PP, a révélé la contribution significative des facteurs Tg, Δϕ et pH, ainsi que des interactions Tg-pH et Δϕ-pH. Le modèle a montré une remarquable capacité à expliquer la variance des données avec des critères de performance élevés.

En conclusion, les résultats suggèrent que les modèles basés sur les plans factoriels complets sont adaptés pour comprendre et prédire les relations entre les variables et les réponses étudiées. Ces résultats justifient le choix des variables. Dans la suite de ce travail, l'utilisation d'un plan central composite avec les mêmes variables permettra d'optimiser les réponses et de connaître les conditions optimales de l’analyse.

3.3. Plan central composite

3.3.1. Optimisation de la résolution entre MP et PDO (R-MP-PDO)

Résultats

A. Modèle mathématique

Le modèle mathématique retenu est un modèle quadratique qui englobe les principaux facteurs, les termes quadratiques ainsi que les interactions du deuxième degré.

La sélection des termes pas à pas qui entrent dans le calcul du modèle a été faite en se basant sur l'amélioration du R^2 ajusté.

B. Analyse de la variance

Le Tableau 49 donne un résumé de l'analyse de la variance.

Tableau 49. Analyse de la variance (R-MP-PDO, Plan Central Composite)

Source de variation	SCE	ddl	CM	F-value	p-value
Modèle	57,53	4	14,38	18,29	< 0.0001
A (Tg)	0,8266	1	0,8266	1,05	0,3214
C (pH)	14,79	1	14,79	18,81	0,0006
A^2 (Tg * Tg)	3,76	1	3,76	4,79	0,0449
C^2 (pH * pH)	37,27	1	37,27	47,42	< 0.0001
Résiduel	11,79	15	0,7861		
Manque d'ajustement	9,14	10	0,9140	1,72	0,2849
Erreur pure	2,65	5	0,5304		
Variance totale	69,32	19			

C. Effet des facteurs et établissement du modèle

Les effets des facteurs et leur contribution sont présentés dans le Tableau 50.

Tableau 50. Tableau des effets (R-MP-PDO, Plan Central Composite)

Source	Contribution
Modèle	82,99%
Linéaires	22,52%
Tg	1,19%
pH	21,33%
Carré	60,46%
Tg* Tg	6,69%
pH*pH	53,77%
Erreur	17,01%
Inadéquation de l'ajustement	13,19%
Erreur pure	3,83%

L'équation de régression du modèle est la suivante :

R-MP-PDO = 552,67 + 0,91 Tg(min) - 175,04 pH - 0,02 Tg(min)*Tg(min) + 13,65 pH*pH

Le diagramme de Pareto illustré dans la Figure 58 offre une représentation graphique des effets relatifs des différents facteurs dans le modèle.

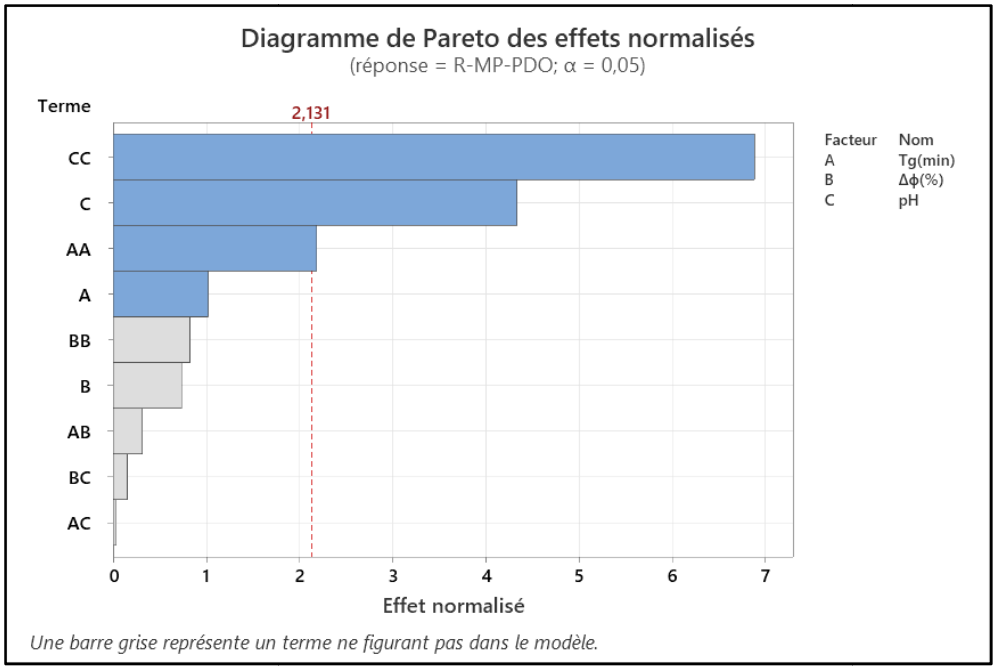


Figure 58. Diagramme de Pareto (R-MP-PDO, Plan central composite)

Le graphique de contour présenté dans la Figure 59 illustre la résolution R-MP-PDO en fonction du pH et de Tg, avec une variation de Δϕ de 0,3.

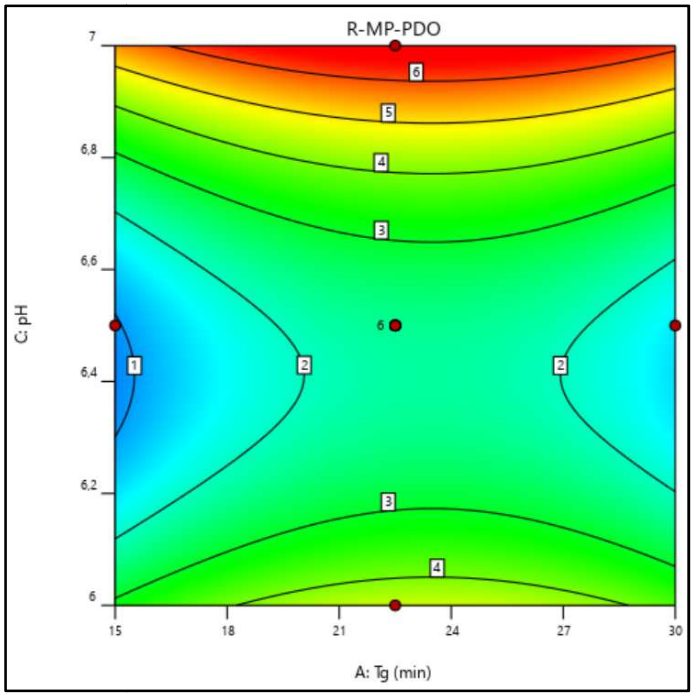


Figure 59. Graphique de contour de la R-MP-PDO en fonction du pH et Tg (Δϕ = 0,3)

La Figure 60 est une représentation visuelle tridimensionnelle qui met en évidence la variation de la résolution R-MP-PDO en fonction du pH et Tg.

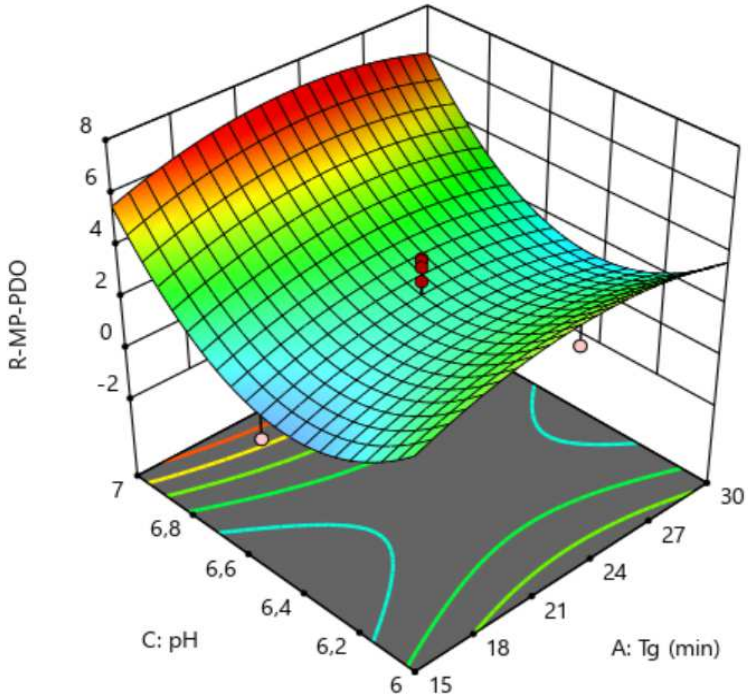


Figure 60. Diagramme de surface de R-MP-PDO en fonction du pH et Tg ($\Delta\phi = 0,3$)

C. Ajustement du modèle

L'ajustement du modèle peut être évalué à l'aide de deux critères résumés dans le Tableau 51.

Tableau 51. Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle

(R-MP-PDO, Plan central composite)

Coefficient de détermination	Valeur
R^2	0,830
R^2 ajusté	0,785

E. Analyse des résidus

La Figure 61 présente les résidus du modèle en fonction des quantiles d'une distribution normale standard.

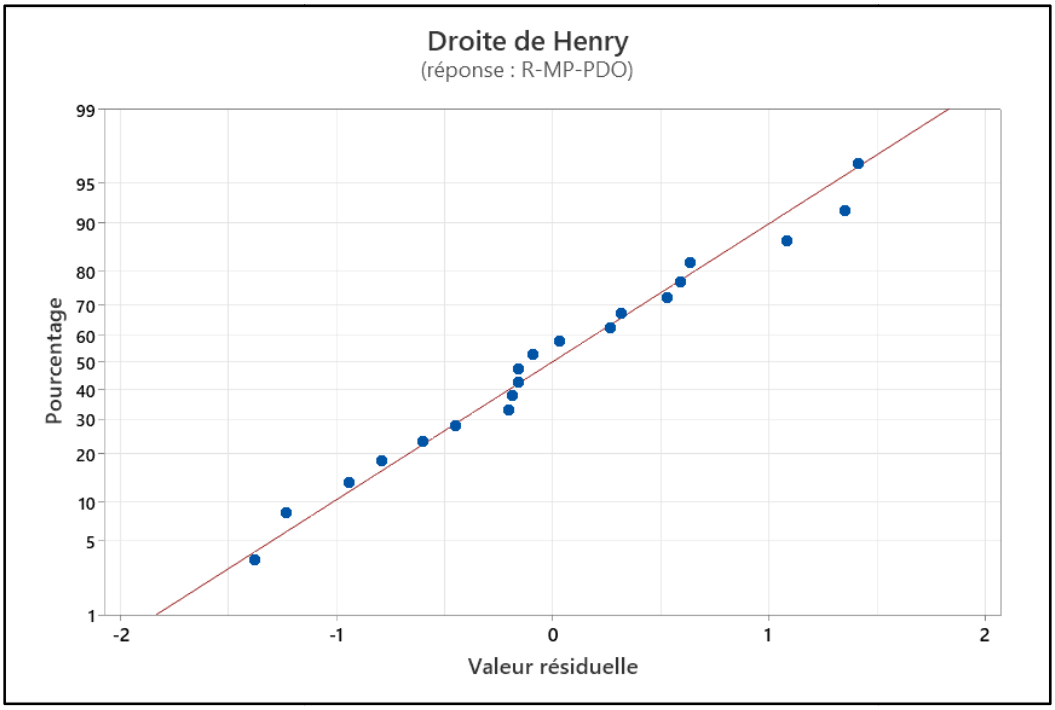


Figure 61. Droite de Henry (R-MP-PDO, Plan central composite)

Discussion :

La valeur F du modèle, établie à 18,29, et une valeur de P inférieure à 0,05 confirment la significativité du modèle.

Les valeurs P inférieures à 0,05 indiquent la significativité des termes du modèle. Dans cette situation, le facteur principal pH et les termes quadratiques Tg^2 et pH^2 sont significatifs. Le facteur Tg(min) est retenu dans le modèle malgré sa valeur P de 0,321 (supérieure à 0,05) car son terme quadratique Tg(min)*Tg(min) est retenu. Les autres facteurs et interactions ne sont pas significatifs, ce qui conduit à une réduction du modèle pour améliorer ses performances.

L'analyse combinée du diagramme de Pareto permet d'identifier clairement les facteurs significatifs. Les effets des termes pH et Tg(min)*Tg(min) sont négatifs, tandis que les effets des termes pH*pH et Tg(min) sont positifs. Les diagrammes de surface et le graphique de contour illustrent la variation de la réponse en fonction de ces facteurs.

La valeur P de l'Inadéquation de l'ajustement est de 0,285, ce qui montre que le manque d'ajustement n'est pas significatif. Le modèle s'ajuste efficacement. Les critères de performance du modèle sont acceptables, avec un coefficient de détermination élevé de

0,8299 et un coefficient de détermination ajusté de 0,7845. Ces indicateurs suggèrent une capacité du modèle à expliquer la variance des données et à fournir des prédictions fiables.
La droite de Henry met en évidence que les résidus s'alignent approximativement le long de la ligne, suggérant ainsi que leur distribution suit une tendance proche de la normalité.

3.3.2. Optimisation de la résolution entre PDO et OXO (R-PDO-OXO)

Résultats

A. Modèle mathématique

Le modèle mathématique retenu est un modèle quadratique qui englobe les principaux facteurs, les termes quadratiques ainsi que les interactions du deuxième degré.

La sélection des termes pas à pas qui entrent dans le calcul du modèle a été faite en se basant sur l'amélioration du R^2 ajusté.

B. Analyse de la variance

Le Tableau 52 donne un résumé de l'analyse de la variance.

Tableau 52. Analyse de la variance (R-PDO-OXO, Plan Central Composite)

Source de variation	SCE	ddl	CM	F-value	p-value
Modèle	1160,26	2	580,13	362,20	< 0.0001
C (pH)	1036,57	1	1036,57	647,16	< 0.0001
C² (pH * pH)	123,69	1	123,69	77,23	< 0.0001
Résiduel	27,23	17	1,60		
Manque d'ajustement	19,15	12	1,60	0,9879	0,5480
Erreur pure	8,08	5	1,62		
Variance totale	1187,49	19			

C. Effet des facteurs et établissement du modèle

Les effets des facteurs et leur contribution sont présentés dans le Tableau 53.

Tableau 53. Tableau des effets (R-PDO-OXO, Plan Central Composite)

Source	Contribution
Modèle	97,71%
Linéaires	87,29%
pH	87,29%
Carré	10,42%
pH*pH	10,42%
Erreur	2,29%
Inadéquation de l'ajustement	1,61%
Erreur pure	0,68%

Equation de régression du modèle es la suivante :

R-PDO-OXO = 714,67– 238,28 pH + 19,90 pH*pH

Le diagramme de Pareto illustré dans la Figure 62 offre une représentation graphique des effets relatifs des différents facteurs dans le modèle.

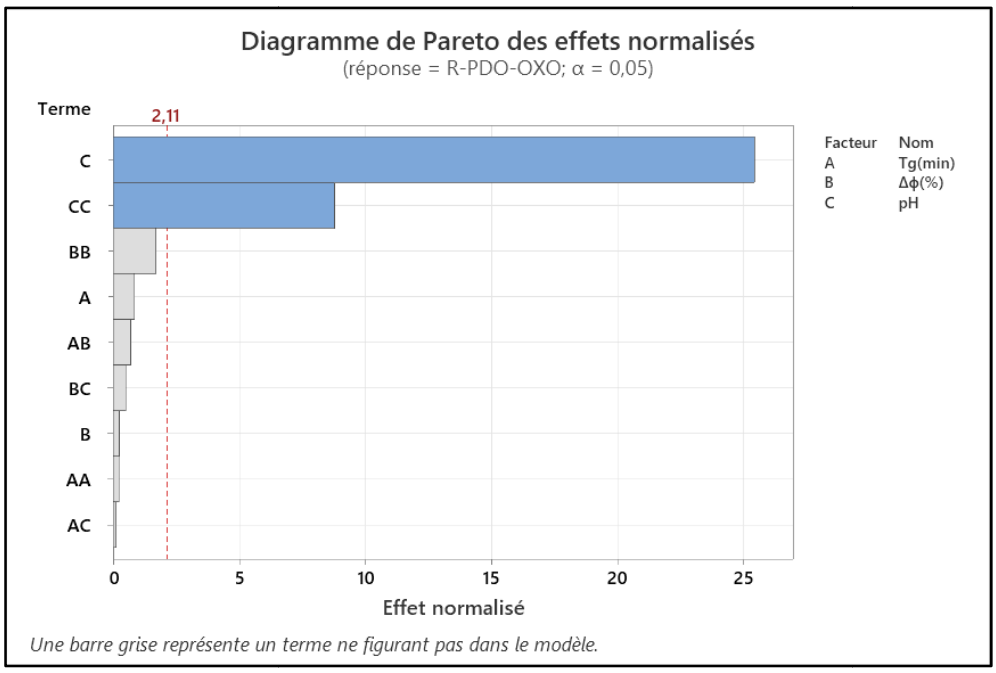


Figure 62. Diagramme de Pareto (R-PDO-OXO, Plan central composite)

Les graphiques de contour présentés dans la Figure 63 illustrent la variation de la résolution R-PDO-OXO en fonction du pH.

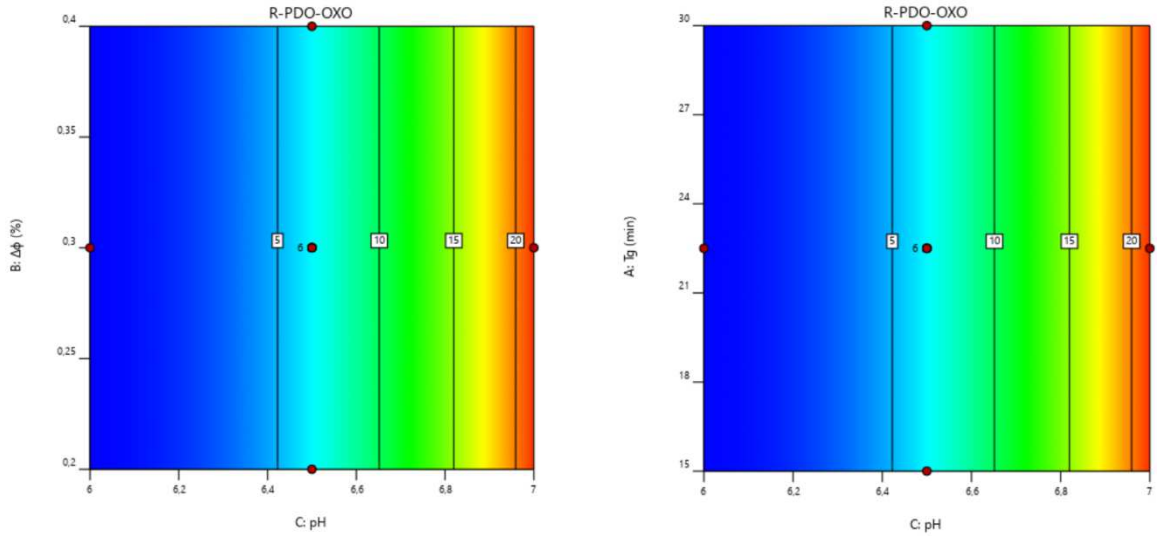


Figure 63. Graphiques de contour de R-PDO-OXO en fonction du pH
(à droite Δϕ = 0,3 ; à gauche Tg = 22,5 min)

La Figure 64 présente des représentations tridimensionnelles qui mettent en évidence la variation de la résolution R-PDO-OXO en fonction pH.

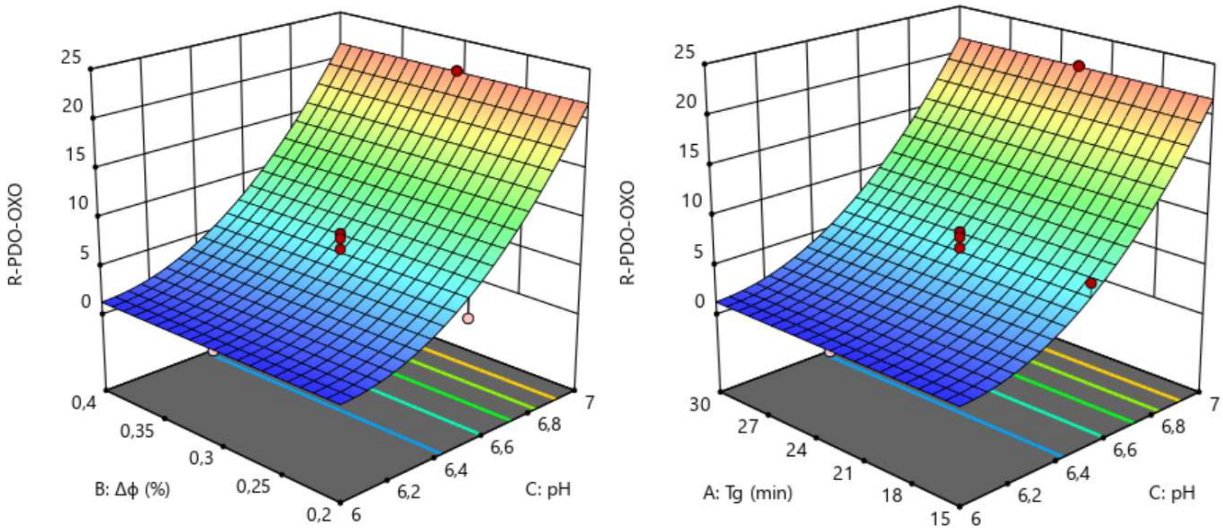


Figure 64. Diagrammes de surface de la résolution R-PDO-OXO en fonction du pH
(à droite $\Delta\phi$ = 0,3 ; à gauche Tg = 22,5 min)

C. Ajustement du modèle

L'ajustement du modèle peut être évalué à l'aide de deux critères résumés dans le tableau ci-dessous

Tableau 54. Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle
(R-PDO-OXO, Plan central composite)

Coefficient de détermination	Valeur
R^2	0,977
R^2 ajusté	0,974

E. Analyse des résidus

La Figure 65 présente les résidus du modèle en fonction des quantiles d'une distribution normale standard.

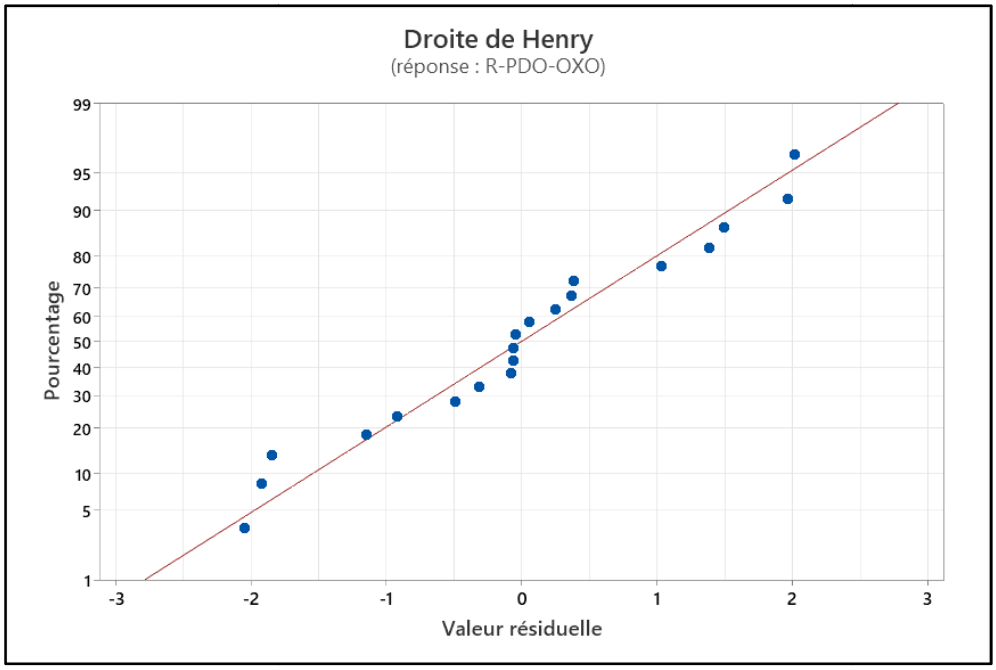


Figure 65. Droite de Henry (R-PDO-OXO, Plan central composite)

Discussion

La valeur F du modèle, établie à 362,20, et une valeur de P inférieure à 0,05 confirment la significativité du modèle.

Les valeurs P inférieures à 0,05 indiquent la significativité des termes du modèle. Dans cette situation, un seul facteur est significatif, le pH et son terme quadratique pH*pH. Les autres facteurs et interactions ne sont pas significatifs, ce qui conduit à une réduction du modèle pour améliorer ses performances.

L'effet du facteur pH est négatif, tandis que l'effet du terme pH*pH est positif. L'analyse combinée du diagramme de Pareto permet d'identifier clairement ces facteurs significatifs. Les diagrammes de surface et les graphiques de contour illustrent la variation de la réponse en fonction du pH.

La valeur P de l'inadéquation de l'ajustement est de 0,548, ce qui montre que le manque d'ajustement n'est pas significatif. Le modèle s'ajuste efficacement. Les critères de performance du modèle sont acceptables, avec un coefficient de détermination élevé de 0,9771et un coefficient de détermination ajusté de 0,9744. Ces indicateurs suggèrent une capacité du modèle à expliquer la variance des données et à fournir des prédictions fiables.

La droite de Henry met en évidence que les résidus s'alignent approximativement le long de la ligne, suggérant ainsi que leur distribution suit une tendance proche de la normalité.

3.3.3. Optimisation de la résolution entre OXO et PP (R-OXO-PP)

Résultats :

A. Modèle mathématique

Le modèle mathématique retenu est un modèle quadratique qui englobe les principaux facteurs, les termes quadratiques ainsi que les interactions du deuxième degré.

La sélection des termes pas à pas qui entrent dans le calcul du modèle a été faite en se basant sur l'amélioration du R^2 ajusté.

B. Analyse de la variance

Le Tableau 55 donne un résumé de l'analyse de la variance.

Tableau 55. Analyse de la variance (R-OXO-PP, Plan Central Composite)

Source de variation	SCE	ddl	CM	F-value	p-value
Modèle	668,32	2	334,16	194,19	< 0.0001
C (pH)	647,56	1	647,56	376,32	< 0.0001
C^2 (pH * pH)	20,77	1	20,77	12,07	0,0029
Résiduel	29,25	17	1,72		
Manque d'ajustement	17,86	12	1,49	0,6530	0,7479
Erreur pure	11,39	5	2,28		
Variance totale	697,58	19			

C. Effet des facteurs et établissement du modèle

Les effets des facteurs et leur contribution sont présentés dans le Tableau 56.

Tableau 56. Tableau des effets (R-OXO-PP, Plan Central Composite)

Source	Contribution
Modèle	95,81%
Linéaires	92,83%
pH	92,83%
Carré	2,98%
pH*pH	2,98%
Erreur	4,19%
Inadéquation de l'ajustement	2,56%
Erreur pure	1,63%

L'équation de régression du modèle est la suivante :

$$\textbf{R-OXO-PP} = 455{,}78 - 122{,}06\ pH + 8{,}15\ pH*pH$$

Le diagramme de Pareto illustré dans la figure 66 offre une représentation graphique des effets relatifs des différents facteurs dans le modèle.

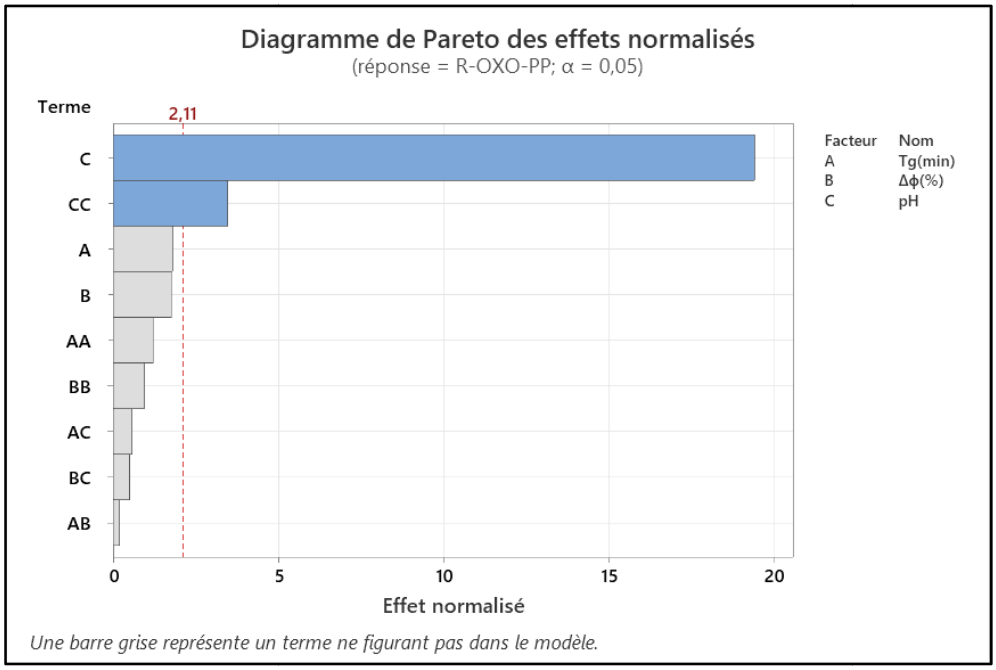


Figure 66. Diagramme de Pareto (R-OXO-PP, Plan central composite)

Les graphiques de contour présentés dans la figure 67 illustrent la variation de la résolution R-OXO-PP en fonction du pH.

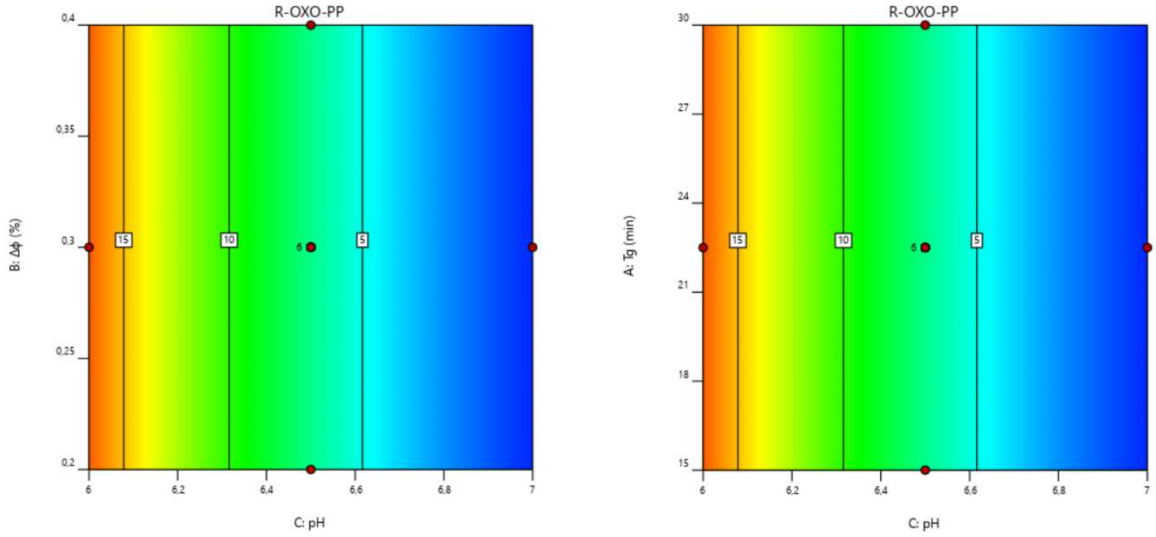


Figure 67. Graphiques de contour de la résolution R-OXO-PP en fonction du pH
(à droite $\Delta\phi$ = 0,3 ; à gauche Tg = 22,5 min)

La figure 68 présente des représentations tridimensionnelles qui mettent en évidence la variation de la résolution R-OXO-PP en fonction pH.

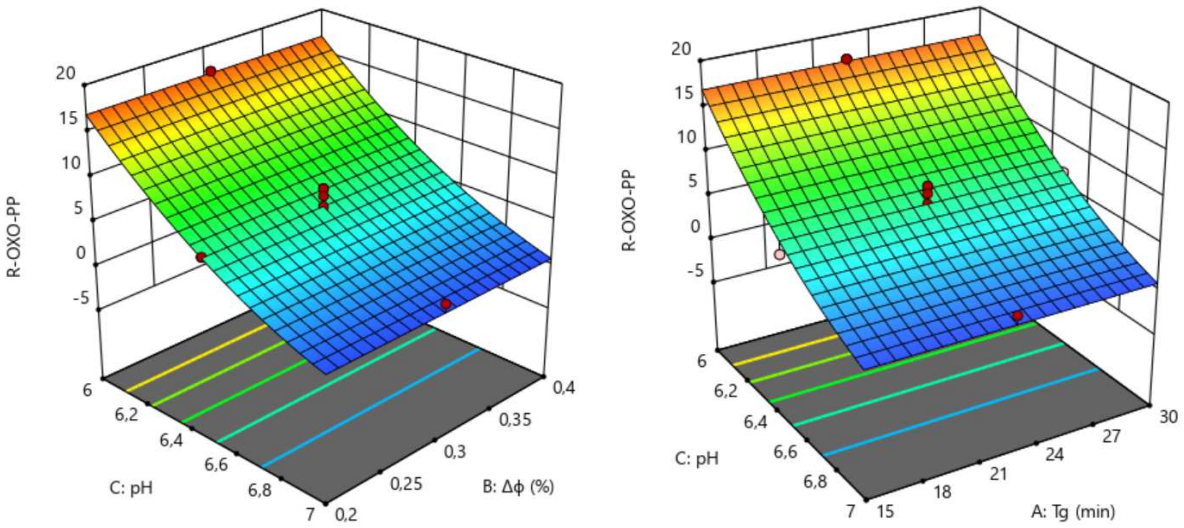


Figure 68. Diagrammes de surface de la résolution R-OXO-PP en fonction du pH
(à droite $\Delta\phi$ = 0,3 ; à gauche Tg = 22,5 min)

C. Ajustement du modèle

L'ajustement du modèle peut être évalué à l'aide de deux critères résumés dans le tableau ci-dessous

Tableau 57. Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle
(R-OXO-PP, Plan central composite)

Coefficient de détermination	Valeur
R^2	0,958
R^2 ajusté	0,953

E. Analyse des résidus

La Figure 69 présente les résidus du modèle en fonction des quantiles d'une distribution normale standard.

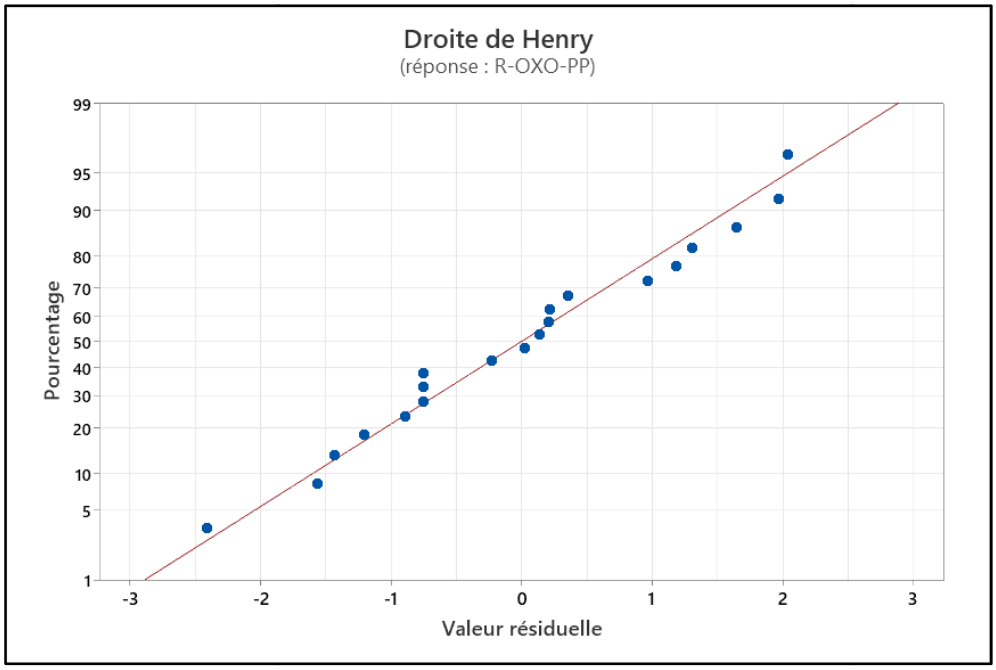


Figure 69. Droite de Henry (R-OXO-PP, Plan central composite)

Discussion

La valeur F du modèle, établie à 194,19, et une valeur de P inférieure à 0,05 confirment la significativité du modèle.

Les valeurs P inférieures à 0,05 indiquent la significativité des termes du modèle. Dans cette situation, un seul facteur est significatif, le pH et son terme quadratique pH*pH. Les autres facteurs et interactions ne sont pas significatifs, ce qui conduit à une réduction du modèle pour améliorer ses performances.

L'effet du facteur pH est négatif, tandis que l'effet du terme pH*pH est positif. L'analyse combinée du diagramme de Pareto permet d'identifier clairement ces facteurs significatifs. Les diagrammes de surface et les graphiques de contour illustrent la variation de la réponse en fonction du pH.

La valeur P de l'inadéquation de l'ajustement est de 0,748, ce qui montre que le manque d'ajustement n'est pas significatif. Le modèle s'ajuste efficacement. Les critères de performance du modèle sont acceptables, avec un coefficient de détermination élevé de 0,9581 et un coefficient de détermination ajusté de 0,9531. Ces indicateurs suggèrent une capacité du modèle à expliquer la variance des données et à fournir des prédictions fiables.

La droite de Henry met en évidence que les résidus s'alignent approximativement le long de la ligne, suggérant ainsi que leur distribution suit une tendance proche de la normalité.

3.3.4. Optimisation du temps de rétention du PP (Tr-PP)

Résultats

A. Modèle mathématique

Le modèle mathématique retenu est un modèle quadratique qui englobe les principaux facteurs, les termes quadratiques ainsi que les interactions du deuxième degré.

La sélection des termes pas à pas qui entrent dans le calcul du modèlea été faite en se basant sur l'amélioration du R^2 ajusté.

B. Analyse de la variance

Le Tableau 58 donne un résumé de l'analyse de la variance.

Tableau 58. Analyse de la variance (Tr-PP, Plan Central Composite)

Source de variation	SCE	ddl	CM	F-value	p-value
Modèle	33,39	5	6,68	79,86	< 0.0001
A (Tg)	14,50	1	14,50	173,40	< 0.0001
B (Δϕ)	15,14	1	15,14	181,06	< 0.0001
C (pH)	1,20	1	1,20	14,38	0,0020
A^2 (Tg * Tg)	1,36	1	1,36	16,29	0,0012
C^2 (pH * pH)	2,47	1	2,47	29,54	< 0.0001
Résiduel	1,17	14	0,0836		
Manque d'ajustement	1,17	9	0,1301		
Erreur pure	0,0000	5	0,0000		
Variance totale	34,56	19			

C. Effet des facteurs et établissement du modèle

Les effets des facteurs et leur contribution sont présentés dans le Tableau 59.

Tableau 59. Tableau des effets (Tr-PP, Plan Central Composite)

Source	Contribution
Modèle	96,61%
Linéaires	89,24%
Tg	41,95%
Δϕ	43,81%
pH	3,48%
Carré	7,37%
Tg*Tg	0,23%
pH*pH	7,15%
Erreur	3,39%
Inadéquation de l'ajustement	3,39%
Erreur pure	0,00%

L'équation de régression du modèle est la suivante :

$$\textbf{Tr-PP} = 157{,}70 + 0{,}68\ Tg - 12{,}31\Delta\phi - 46{,}38\ pH - 0{,}01 Tg*Tg + 3{,}51\ pH*pH$$

Le diagramme de Pareto illustré dans la Figure 70 offre une représentation graphique des effets relatifs des différents facteurs dans le modèle.

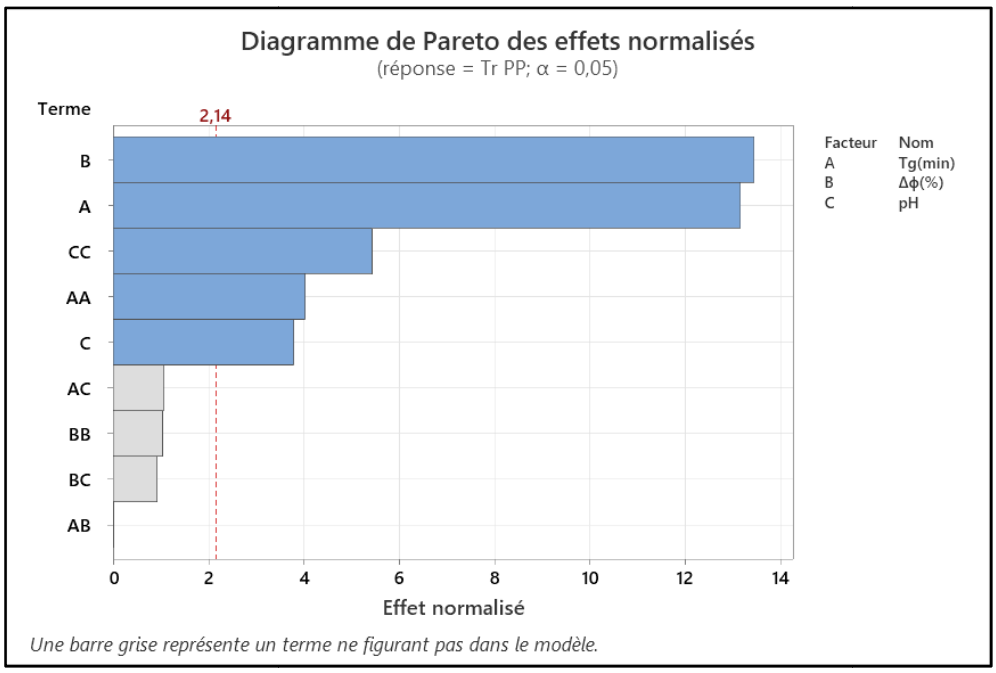


Figure 70. Diagramme de Pareto (Tr-PP, Plan central composite)

Les graphiques de contour présentés dans la figure 71 illustrent la variation de Tr-PP en fonction des trois facteurs Tg, Δϕ et pH.

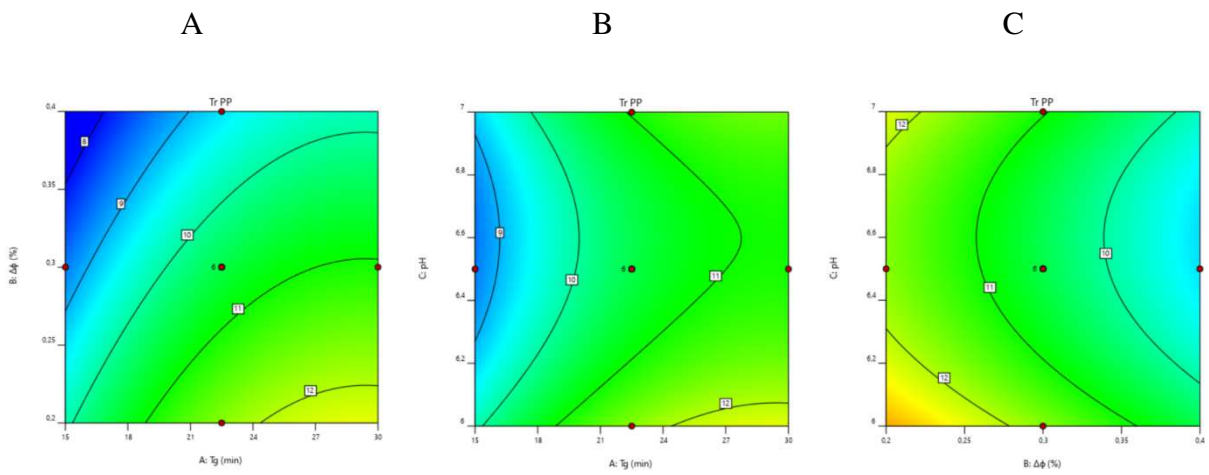


Figure 71. Graphiques de contour illustrant la variation du Tr-PP en fonction Tg, Δϕ et pH.

La figure 72 est une représentation visuelle tridimensionnelle qui met en évidence la variation de la résolution du Tr-PP en fonction des trois facteurs Tg, Δϕ et pH.

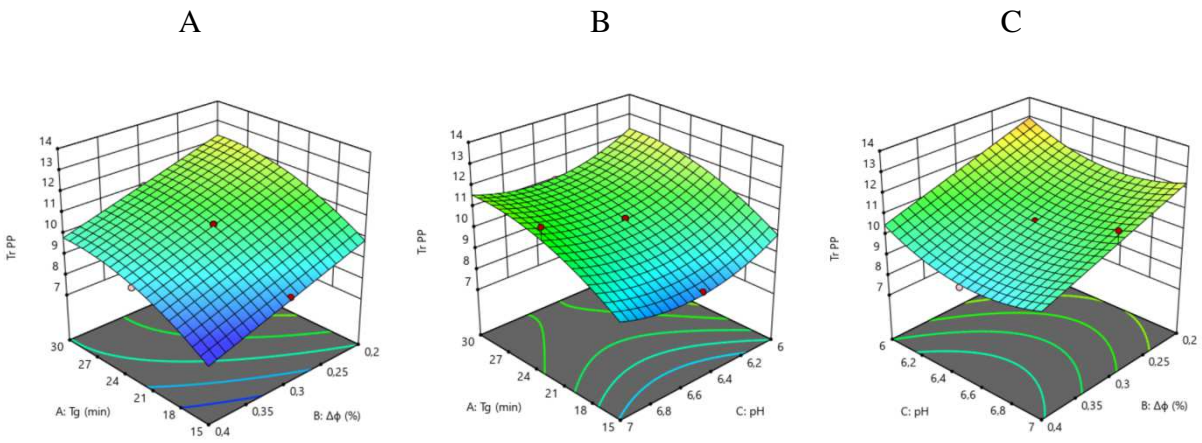


Figure 72. Diagrammes de surface illustrant la variation du Tr-PP en fonction Tg, Δϕ et pH.

C. Ajustement du modèle

L'ajustement du modèle peut être évalué à l'aide de deux critères résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 60. Grandeurs caractéristiques de l'ajustement du modèle
(Tr-PP, Plan central composite)

Coefficient de détermination	Valeur
R^2	0,966
R^2 ajusté	0,954

E. Analyse des résidus

La figure 73 présente les résidus du modèle en fonction des quantiles d'une distribution normale standard.

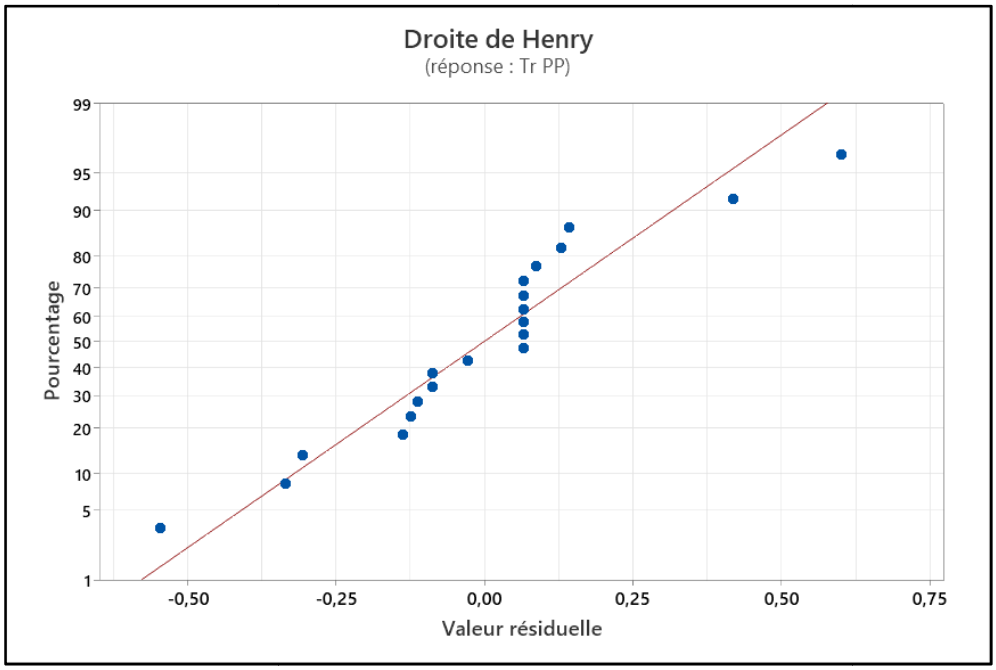


Figure 73. Droite de Henry (Tr-PP, Plan central composite)

Discussion

La valeur F du modèle, établie à 79,86, et une valeur de P inférieure à 0,05 confirment la significativité du modèle.

Les valeurs P inférieures à 0,05 indiquent la significativité des termes du modèle. Dans cette situation, les trois facteurs principaux (Tg, $\Delta\phi$ et pH) sont significatifs ainsi que les termes quadratiques Tg*Tg et pH*pH. Les autres facteurs et interactions ne sont pas significatifs, ce qui conduit à une réduction du modèle pour améliorer ses performances.

Les effets des facteurs $\Delta\phi$, pH et du terme quadratique Tg*Tg sont négatifs, tandis que l'effet du terme Tg et du terme quadratique pH*pH sont positifs. L'analyse combinée du diagramme de Pareto permet d'identifier clairement ces facteurs significatifs. Les diagrammes de surface et les graphiques de contour illustrent la variation de la réponse en fonction du pH.

L'inadéquation de l'ajustement n'est pas calculée parce que l'erreur est nulle, ce qui montre que le manque d'ajustement n'est pas significatif. Le modèle s'ajuste efficacement. Les critères de performance du modèle sont acceptables, avec un coefficient de détermination élevé de

0,9661et un coefficient de détermination ajusté de 0,9540. Ces indicateurs suggèrent une capacité du modèle à expliquer la variance des données et à fournir des prédictions fiables.

La droite de Henry met en évidence que les résidus s'alignent approximativement le long de la ligne, suggérant ainsi que leur distribution suit une tendance proche de la normalité.

Conclusion

La synthèse des discussions sur l'optimisation des quatre réponses révèle des patterns communs et des distinctions significatives entre les modèles étudiés.

Tout d'abord, l'évaluation de la significativité des modèles, mesurée par la valeur F et la valeur P, confirme dans chaque cas la pertinence des modèles.

En analysant les effets des facteurs significatifs, il est possible de noter des tendances récurrentes. Dans plusieurs cas, l'effet du pH est négatif, tandis que les termes quadratiques associés sont positifs, indiquant une réponse non linéaire à cette variable. Cette tendance est illustrée de manière visuelle à travers les diagrammes de Pareto, les diagrammes de surface et les graphiques de contour.

Les indicateurs de performance des modèles, tels que le coefficient de détermination (R^2) et le coefficient de détermination ajusté, témoignent de la capacité des modèles à expliquer la variance des données et à fournir des prédictions fiables. Dans tous les cas, ces indicateurs atteignent des niveaux acceptables, renforçant la validité des modèles.

En conclusion, l'ensemble des résultats démontre des modèles significatifs et bien ajustés.

3.4. Optimisation des réponses

Les modèles obtenus lors des étapes précédentes sont valides et peuvent être utilisés pour optimiser les réponses étudiées (R-MP-PDO, R-PDO-OXO, R-OXO-PP et Tr-PP). Une étude de désirabilité a été entreprise pour optimiser ces quatre réponses.

Étant donné que la résolution MP-PDO présente la plage la moins étendue dans le domaine expérimental, allant de 0 à un maximum de 6,463, la valeur cible a été fixée à R-MP-PDO=6.

Le temps de rétention de PP varie entre 7,9 min et 13,9 min. Le Tr-PP a été fixé à une valeur moyenne de 12 min.

Les deux réponses R-OXO-PP et R-PDO-OXO dépendent toutes deux uniquement du facteur pH. Ces deux réponses évoluent de manière contradictoire : à pH 7, le temps de rétention de l'OXO augmente et se rapproche de celui du PP, avec un maximum de R-PDO-OXO de 22.643 et un minimum de R-OXO-PP de 0,000. À l'inverse, à pH 6, le temps de rétention de l'OXO diminue et se rapproche de celui du PDO, avec un maximum de R-OXO-PP de 18,490 et un minimum de R-PDO-OXO de 1,170. Pour ces raisons, l'une des deux résolutions doit être fixée à une valeur minimale acceptable. Le choix a été de fixer R-OXO-PP à une valeur de 5 et R-PDO-OXO à une valeur de 15.

Les résultats de l'étude de désirabilité avec les valeurs de réponses choisies sont les suivants :

Tableau 61. Paramètres des réponses

Réponse	Objectif	Inférieur	Cible	Supérieur
Tr PP	Cible	7,927	12,000	13,937
R-OXO-PP	Cible	0,000	5,000	18,490
R-PDO-OXO	Cible	1,170	15,000	22,643
R-MP-PDO	Cible	0,000	6,000	6,463

Tableau 62. Facteurs optimaux

Tg (min)	Δϕ	pH
23,788	0,206	6,818

Tableau 63. Résultats de l'étude de désirabilité

Tg (min)	Δϕ	pH	R-MP-PDO	R-PDO-OXO	R-OXO-PP	Tr PP	Désirabilité
23,788	0,206	6,818	4,489	14,950	2,467	11,990	77,83 %

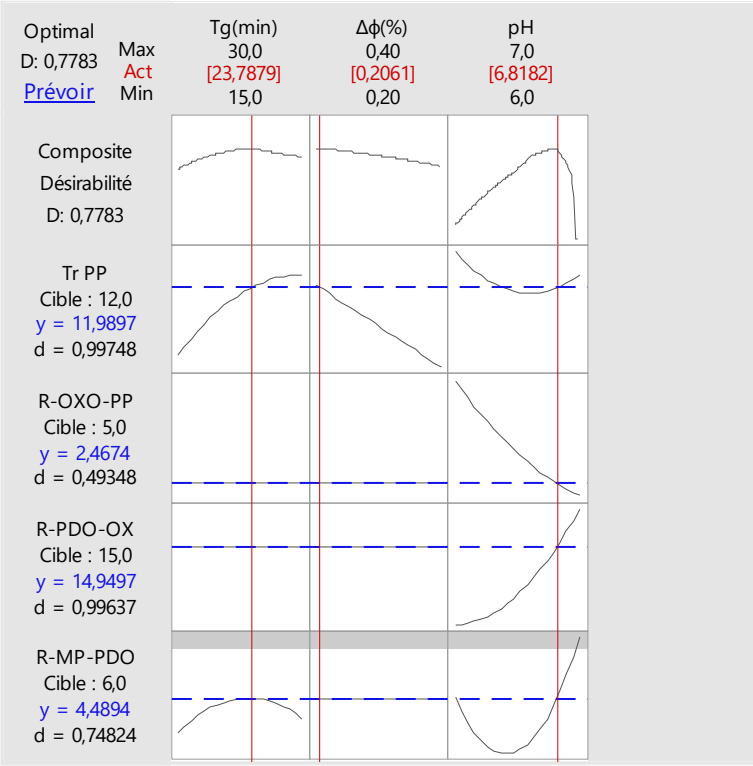


Figure 74. Digramme d'optimisation

Discussion

La désirabilité de 77,83 % indique que les paramètres analysés dans cette étude ont atteint un niveau optimal, ce qui signifie que les réponses R-MP-PDO, R-PDO-OXO, R-OXO-PP et Tr-PP ont été configurées selon les critères définis pour atteindre leurs valeurs les plus souhaitables.

Les paramètres sélectionnés, à savoir un Tg de 23,788 minutes, Δϕ de 0,206, et un pH de 6,818, ont conduit à des valeurs de résolution acceptables, avec R-MP-PDO évalué à 4,489, R-PDO-OXO à 14,950, et R-OXO-PP à 2,467. Ces résultats dépassent la valeur seuil de 2, considérée comme satisfaisante pour les analyses de routine.

Il convient de souligner que ces paramètres, bien que dérivés de modèles valides, nécessitent une validation expérimentale en laboratoire pour confirmer leur applicabilité dans des conditions réelles. La réalisation de tests pratiques renforcera la fiabilité des résultats et assurera la robustesse des paramètres optimaux identifiés

3.5. Validation du modèle d'optimisation

Les paramètres sélectionnés dans l'étape de l'optimisation sont un Tg de 23,788 minutes, $\Delta\phi$ de 0,206, et un pH de 6,818.

Afin de faciliter la préparation de la phase mobile et l'ajustement des paramètres de la méthode, les valeurs optimales choisies ont été arrondies : Tg de 23 minutes, $\Delta\phi$ de 0,2, et un pH de 6,8. Cette approche pragmatique vise à rendre la mise en œuvre de la méthode plus pratique. Ces paramètres nécessitent une validation expérimentale au laboratoire pour confirmer leur applicabilité dans des conditions réelles.

3.5.1. Valeurs prédites par les modèles

Les valeurs prédites des réponses (R-MP-PDO, R-PDO-OXO, R-OXO-PP et Tr-PP) par les modèles en utilisant les facteurs optimaux (Tg = 23 minutes, $\Delta\phi$ = 0,2 et pH = 6,8) sont présentées dans le Tableau 64.

Tableau 64. Prévisions des réponses avec les facteurs optimaux

Réponses	Valeurs prédites	Intervalle de prévision à 95%
R-MP-PDO	4,289	(2,268; 6,309)
R-PDO-OXO	14,356	(11,568; 17,143)
R-OXO-PP	2,668	(-0,221; 5,558)
Tr PP	11,927	(11,236; 12,619)

3.5.2. Analyse de l'échantillon

Trois (3) injections d'un placébo chargé de 100 % OXO et 0,2 % PDO ont été réalisés en utilisant les facteurs optimaux (Tg(min) = 23, $\Delta\phi$ = 0,2, et pH=6,8) et les conditions chromatographiques décrites dans le Tableau 33.

Les résultats de l'analyse (Figure 75) sont synthétisés dans le Tableau 65.

Tableau 65. Résultats expérimentaux de la validation du modèle d'optimisation

Solutions	R-MP-PDO	R-PDO-OXO	R-OXO-PP	Tr PP
1	4,145	12,004	2,675	12,409
2	4,070	11,617	2,539	12,385
3	4,069	11,588	2,498	12,377
Moyenne	4,095	11,736	2,571	12,390
Ecart type	0,044	0,232	0,093	0,017

3.5.3. Comparaison des résultats

Le Tableau 66 représente une comparaison entre les valeurs prédites par les modèles et les valeurs obtenues expérimentalement.

Tableau 66. Comparaison entre les valeurs prédites par le modèle d'optimisation et les valeurs expérimentales

Réponses	Valeurs prédites	Intervalle de prévision à 95%	Valeurs expérimentales
R-MP-PDO	4,289	(2,268; 6,309)	4,095
R-PDO-OXO	14,356	(11,568; 17,143)	11,736
R-OXO-PP	2,668	(-0,221; 5,558)	2,571
Tr PP	11,927	(11,236; 12,619)	12,390

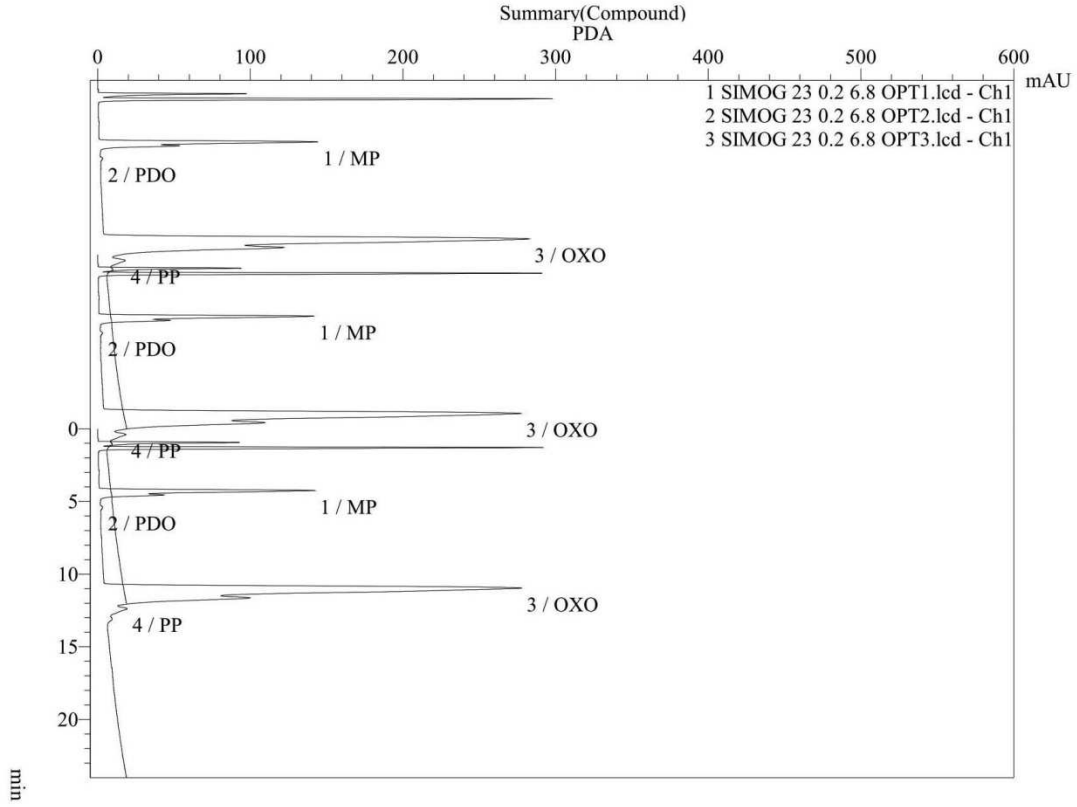
Discussion

Les quatre réponses sont incluses dans l'intervalle de prévision à 95%. Ce qui indique la cohérence entre la modélisation et l'expérience réelle, témoignant ainsi de sa validité.

En conclusion, cette démarche méthodique de validation, couvrant la prévision du modèle, l'analyse expérimentale, et la comparaison des résultats, confirme la robustesse du modèle d'optimisation établi. La capacité du modèle à anticiper avec précision les réponses du système dans des conditions optimales suggère qu'il peut être appliqué en toute confiance pour guider les choix de conditions expérimentales et d'optimisation dans des situations similaires.

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

Method Filename : SIMOG 23 0.2 6.8 OPT.lcm
Batch Filename : SIMO OPT FINAL 6.8.lcb



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: MP

Title	Ret. Time	Area	Resolution(EP)
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	4,246	1291238	--
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	4,245	1335826	--
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	4,242	1394708	--

ID#2 Compound Name: PDO

Title	Ret. Time	Area	Resolution(EP)
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	5,393	8006	4,145
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	5,392	7728	4,070
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	5,388	7344	4,069

ID#3 Compound Name: OXO

Title	Ret. Time	Area	Resolution(EP)
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	10,932	5522713	12,004
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	10,945	5782900	11,617
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	10,964	5935143	11,588

ID#4 Compound Name: PP

Title	Ret. Time	Area	Resolution(EP)
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	12,409	124002	2,675
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	12,385	114751	2,539
SIMOG 23 0.2 6.8 OI	12,377	103146	2,498

Figure 75. Rapport d'analyse du placébo chargé analysé selon conditions chromatographiques optimales (Tg(min) = 23, $\Delta\phi$ = 0,2, et pH=6,8)

3.6. Dédoublement des pics chromatographiques (peak splitting)

Constat

Un constat a été fait concernant les dernières injections des essais d'optimisation. Un dédoublement des pics apparaît et s'accentue avec le temps, comme le montre la Figure 76.

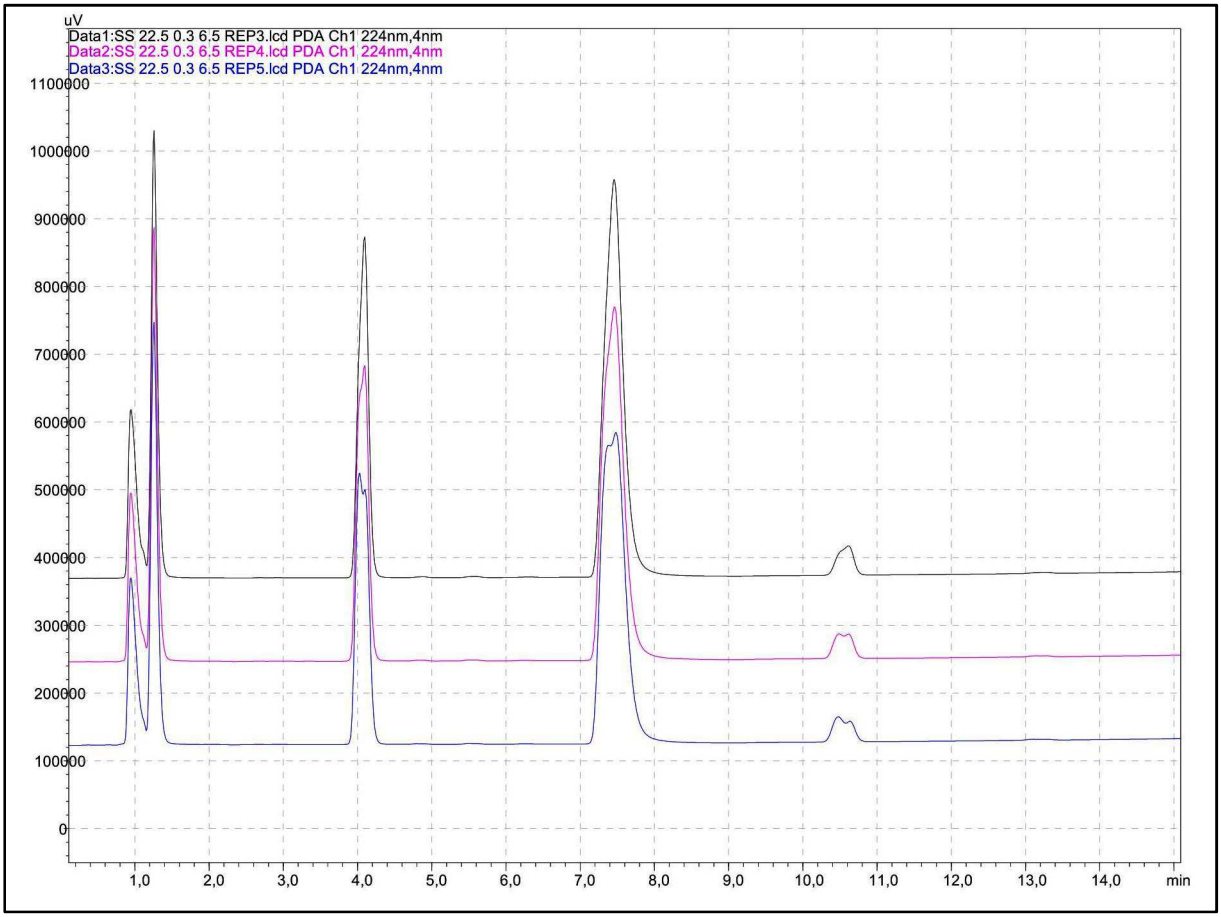


Figure 76. Dédoublement des pics (peaks splitting)

On observe que ce phénomène touche tous les pics du chromatogramme. Le diagnostic sera orienté vers une cause physique du problème, selon John Dolan [86]. Une origine significative est l'obstruction physique sur le frittage de la colonne. Le frittage, généralement un disque poreux qui sépare la phase stationnaire de la colonne de l'entrée, peut rencontrer des problèmes tels que des particules, des résidus d'échantillon ou des composés précipités qui s'accumulent au fil du temps. Cette obstruction perturbe le flux normal de la phase mobile et conduit à la division des pics rencontrés.

Causes

Les causes possibles de la formation de particules solides qui se déposent sur le disque de la colonne sont les suivantes :

1. Précipitation des sels du tampon utilisé dans la phase mobile

Pour la phase mobile utilisée dans ce travail, à 40 % de méthanol, la concentration du tampon phosphate est de 30 mM dans l'ensemble de la phase, sachant que la solubilité du phosphate de potassium dans une phase contenant 40 % de méthanol est supérieure à 50 mM.

À 80 % de méthanol, la concentration du tampon phosphate dans l'ensemble de la phase est de 10 mM. La solubilité du phosphate de potassium dans une phase contenant 80 % de méthanol est de 15 mM [94].

Le phosphate de potassium à 50 mM dans le tampon ne précipite pas sur toute l'étendue du gradient utilisé de 40 % à 80 % de méthanol [94].

Cependant, au moment où les solvants sont mélangés, le méthanol à 100 % entre en contact avec un tampon de 50 mM, une précipitation peut se produire. Cela peut entraîner des problèmes, ou le précipité peut se redissoudre rapidement, en fonction des caractéristiques spécifiques de la conception de l'équipement [95].

2. Précipitation des composés de la solution échantillon, sachant que notre échantillon est trop chargé (dilution de 3 ml du sirop dans 10 ml) [96].

Action corrective

En cas de division des pics, des actions correctives deviennent impératives. Une stratégie efficace est la régénération en sens inverse. Cela implique de modifier temporairement la direction du flux pour déloger ou dissoudre les particules accumulées sur le frittage. En inversant le flux, la phase mobile peut éliminer les impuretés, restaurant l'intégrité de la colonne [96].

De plus, l'utilisation d'une direction inverse de la colonne en utilisant un faible débit (0,5 ml/min) pendant une longue période peut aider à déloger et éliminer les matériaux obstruant [97].

Actions préventives

Plusieurs actions préventives ont été prises pour éviter l'apparition de ce problème, à savoir :

1. Diminuer la concentration du tampon phosphate de 50 mM à 40 mM comme marge de sécurité, malgré qu'à 50 mM théoriquement, il n'y avait pas de problème de précipitation.

2. Éviter le contact entre le méthanol à 100 % et le tampon [95].

3. Filtration de la solution échantillon sur un filtre seringue de 0,2 µm au lieu du filtre standard de 0,45 µm [96].

4. Prévision d'installation d'un filtre en ligne [96].

Ces mesures ont été testées dans la section suivante.

3.7. Amélioration finale de la Méthode

Pour évaluer l'efficacité des mesures correctives et préventives mises en place contre le dédoublement des pics, un échantillon a été analysé avec les modifications suivantes :

- **Filtration de l'échantillon :** L'échantillon a été filtré à l'aide d'un filtre seringue de 0,2 µm au lieu de filtre conventionnel de 0,45 µm.

- **Concentration du tampon phosphate :** Le tampon phosphate de potassium, ajusté à un pH de 6,8, a une concentration de 40 mM au lieu de 50mM.

- **Préparation de la phase mobile :** La phase mobile a été préparée avec la solution A (méthanol) et la solution B (30% méthanol et 70% tampon). Le gradient de 40% à 60% de méthanol a été réalisé selon le Tableau 68 en évitant le contact direct des solvants purs.

Tableau 67. Gradient variante 1 de 40% à 60% de méthanol

Temps	Solution A %	Solution B %
0	14	86
23	43	57
28	43	57
29	14	86
34	14	86

Se basant sur les résultats précédents, où le Tr PP est d'environ 12,4 min tandis que le temps d'analyse est de 23 min, un allongement des temps de rétention a été envisagé tout en conservant la pente du gradient obtenue par optimisation. Cette approche devrait, théoriquement, améliorer les résultats analytiques et renforcer la robustesse de la méthode.

Pour vérifier cette hypothèse, deux autres gradients ont été évalués :

- Le gradient variante 2 de 35% à 55 % de méthanol (Tableau 68)
- Le gradient variante 3 de 30 % à 50 % de méthanol (Tableau 69)

Tableau 68. Gradient variante 2 de 35% à 55% de méthanol

Temps	Solution A %	Solution B %
0	7	93
23	36	64
28	36	64
29	7	93
34	7	93

Tableau 69. Gradient variante 3 de30% à 50% de méthanol

Temps	Solution A %	Solution B %
0	0	100
23	29	71
28	29	71
29	0	100
34	0	100

La Figure 77 montre l'effet des gradients 40% à 60% Méthanol (Variante 1), 35% à 55% Méthanol (Variante 2) et 30% à 50% Méthanol (Variante 3), sur la qualité de la séparation et le temps d'analyse

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report



<Peak Table>

VAR1REP1.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,689	807700	--
2	PDO	6,014	3301	7,333
3	OXO	11,784	635540	20,287
4	PP	13,638	78963	5,392

VAR1REP2.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	4,680	814015	--
2	PDO	6,002	3255	7,357
3	OXO	11,779	643012	20,450
4	PP	13,613	79307	5,368

Figure 77. Rapport d'analyses des gradients : 40% à 60% Méthanol (Variante 1), 35% à 55% Méthanol (Variante 2) et 30% à 50% Méthanol (Variante 3)

VAR2REP1.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	6,089	669114	--
2	PDO	8,274	2666	9,790
3	OXO	15,127	553021	20,375
4	PP	17,827	69519	6,811

VAR2REP2.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	6,197	695098	--
2	PDO	8,380	2719	10,165
3	OXO	15,196	562323	20,795
4	PP	17,864	69898	6,835

VAR3REP1.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	8,122	568234	--
2	PDO	11,497	2201	12,736
3	OXO	19,259	498516	20,343
4	PP	22,674	62436	7,745

VAR3REP2.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Name	Ret. Time	Height	Resolution(EP)
1	MP	8,244	584214	--
2	PDO	11,609	2211	12,992
3	OXO	19,337	504491	20,541
4		22,256	2184	--
5	PP	22,714	64774	--

Figure 77- bis. Rapport d'analyses des gradients: 40% à 60% Méthanol (Variante 1), 35% à 55% Méthanol (Variante 2) et 30% à 50% Méthanol (Variante 3)

Les résultats des 3 gradients montrent que :

- Le gradient de 40% à 60% Méthanol témoigne de l'efficacité des mesures prises pour corriger le problème de dédoublement des pics.

- Pour le gradient de 30% à 50% Méthanol, le Tr PP est de 22,7 min, se rapprochant du temps d'analyse de 23 min. Ce gradient est à exclure.

- Pour le gradient de 35% à 55% Méthanol, le Tr PP est de 17,845 min, un temps raisonnable, avec une nette amélioration de la résolution entre MP, PDO, OXO et PP par rapport au gradient de 40% à 60% Méthanol (Tableau 70).

Tableau 70. Comparaison entre les gradients variante 1 et 2

	Gradient variante 1 de 40% à 60% Méthanol	**Gradient variante 2 de 35% à 55% Méthanol**
Tr PP	13,625 min	17,845 min
R-MP-PDO	7,345	9,977
R-PDO-OXO	20,368	20,585
R-OXO-PP	5,380	6,823

En conclusion, un gradient de 35% à 55% Méthanol sera retenu. Cette conclusion est étayée par une approche rigoureuse de comparaison entre les différents gradients, prenant en compte des paramètres cruciaux tels que la résolution entre les pics, le temps d'analyse.

4. Conclusion

La méthodologie adoptée pour optimiser la méthode de dosage des impuretés dans le produit fini a reposé sur l'utilisation d'un plan d'expérience composite centré. L'analyse des résultats obtenus a démontré une concordance significative entre les données pratiques et les prévisions du modèle statistique, validant ainsi ce dernier.

Suite à l'identification d'un problème de dédoublement des pics, des ajustements ont été apportés à l'optimum initial afin de remédier à cette problématique. Les mesures correctives, telles que la régénération en sens inverse de la colonne, ont été mises en œuvre avec succès pour éliminer les obstacles physiques sur le frittage de la colonne.

Dans une démarche d'amélioration continue, une dernière étape a été entreprise pour accroître davantage la résolution entre les différents composés, renforçant ainsi la robustesse globale de la méthode. Les résultats obtenus ont été analysés avec soin, et un gradient de 35% à 55% de méthanol a été retenu comme optimum final.

En somme, l'approche méthodologique utilisée a permis d'aboutir à une méthode de dosage des substances apparentées dans notre produit fini. Le Tableau 71 détaille les paramètres optimaux et les conditions expérimentales finales qui garantissent une analyse fiable et robuste.

Tableau 71. Méthode optimisée du dosage des impuretés

<table>
<tr><td>Solution Echantillon</td><td colspan="2">Diluer 3 ml de l'échantillon à 10 ml avec la solution B.
Filtrer avec filtre seringue en nylon de 0,2 µm</td></tr>
<tr><td>Tampon 40 mM</td><td colspan="2">Dissoudre 5,44 gr de dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 et 1,5 ml de Triéthylamine TEA dans 900 ml d'eau ultra-pure, régler le pH à 6,80 avec une solution de potassium hydroxyde KOH et ajuster le niveau à 1000 ml avec l'eau ultra-pure.</td></tr>
<tr><td>Solution A</td><td colspan="2">Méthanol</td></tr>
<tr><td>Solution B</td><td colspan="2">30% méthanol et 70% tampon</td></tr>
<tr><td>Phase mobile</td><td colspan="2">Mode gradient
<table>
<tr><th>Temps min</th><th>Solution A %</th><th>Solution B %</th></tr>
<tr><td>0</td><td>7</td><td>93</td></tr>
<tr><td>23</td><td>36</td><td>64</td></tr>
<tr><td>28</td><td>36</td><td>64</td></tr>
<tr><td>29</td><td>7</td><td>93</td></tr>
<tr><td>34</td><td>7</td><td>93</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td rowspan="3">Colonne</td><td>Dimensions</td><td>▪ Longueur L = 10 cm
▪ Diamètre Ø = 4,6 mm</td></tr>
<tr><td>Phase stationnaire</td><td>▪ Gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie (3,5 µm)
▪ Taille des pores = 100 Å</td></tr>
<tr><td>Fabricant</td><td>▪ Waters Symmetry C18</td></tr>
<tr><td>Température</td><td colspan="2">40°C</td></tr>
<tr><td>Débit</td><td colspan="2">1,0 ml/mn</td></tr>
<tr><td>Détection</td><td colspan="2">DAD à 224nm</td></tr>
<tr><td>Volume d'injection</td><td colspan="2">20µl</td></tr>
</table>

II. Validation de la méthode de dosage des impuretés

1. Introduction

La validation analytique revêt une importance cruciale dans le processus de développement et d'application des méthodes d'analyse. Son objectif principal est de fournir des preuves substantielles démontrant que la procédure analytique atteint ses objectifs. Ces objectifs sont définis par un ensemble adapté de caractéristiques et de critères de performance qui peuvent varier en fonction de la finalité de la procédure analytique et de la technologie analytique sélectionnée.

Notre méthode de dosage des substances apparentées dans le sirop OXO, classée comme « IMPURITY Quantitative Test », est soumise à une évaluation approfondie basée sur les critères définis par l'ICH Q2(R2). Ces critères incluent l'intervalle de mesure, la spécificité, la linéarité, l'exactitude, la précision et la limite de quantification.

En parallèle avec l'approche traditionnelle reposant sur des paramètres prédéfinis pour garantir la conformité aux normes internationalement reconnues, une approche innovante basée sur le profil d'exactitude est également employée, élargissant ainsi la perspective de la validation.

Il est important de noter que l'étude de dégradation forcée, effectuée précédemment, a révélé l'absence d'impuretés spécifiques. Par conséquent, les impuretés non spécifiques sont quantifiées par un étalonnage en externe avec un standard de substance active, et les paramètres de validation sont évalués à l'aide d'échantillons dopés par la substance active à des teneurs représentatives de ces impuretés.

Cette validation analytique approfondie renforce considérablement la confiance dans les résultats obtenus lors de l'analyse d'échantillons, assurant ainsi la fiabilité et la précision de la méthode des impuretés dans notre produit fini.

2. Matériels et méthodes

2.1. Intervalle de mesure (range)

La dose journalière maximale du produit fini OXO est établie à 10 ml, à administrer quatre fois par jour, ce qui équivaut à une quantité totale de 14,80 mg.

En conformité avec les directives du guide ICH Q3B(R2) sur les impuretés dans les nouveaux produits pharmaceutiques, des critères et des limites généraux ont été établis pour les impuretés organiques. Ces critères comprennent :

- Une limite d'exclusion de l'ordre de 0,1% [7]
- Une limite d'identification de l'ordre de 0,2% [7]
- Une limite de qualification de 0,5% [7]

L'intervalle de mesure des méthodes de dosage des impuretés couvre la plage allant de la limite d'exclusion 0,1% jusqu'à 120% de la spécification [1,58]. Il est important de noter qu'à ce stade de l'étude, une spécification précise n'est pas encore disponible.

Bien que l'étude de dégradation forcée n'ait révélé aucune impureté spécifique, la certitude totale demeure en suspens jusqu'à la réalisation de l'étude de stabilité formelle. Par mesure de précaution, la décision a été prise d'élargir l'intervalle de mesure de la limite d'exclusion à celle de la qualification, passant ainsi de 0,1% à 0,5%.

Il est essentiel de noter que, compte tenu de la concentration de la substance active (SA) dans la solution échantillon à injecter, établie à 0,111 mg/ml (résultant d'une dilution de 3 ml de sirop dans 10 ml), l'intervalle de mesure utilisé dans cette validation sera compris entre 0,11 µg/ml et 0,55 µg/ml.

2.2. Préparation des solutions

2.2.1. Solution tampon pH 6,8

La solution tampon a été préparée en dissolvant 5,44 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) et 1,5 mL de triéthylamine (TEA) dans 900 mL d'eau ultra-pure. Le pH a été ajusté à 6,80 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH), et le volume a été complété à 1000 mL avec de l'eau ultra-pure

2.2.2. Diluant

Le diluant a été composé de 30 % de méthanol et de 70 % de la solution tampon pH 6,8.

2.2.3. Solution standard stock

La solution standard stock a été préparée en dissolvant 11 mg d'OXO et 11 mg de PDO dans 5 ml d'acétonitrile, puis en ajustant le volume à 100 ml avec la solution B (30% méthanol et 70% tampon 40 mM à pH 6,8). La densité de la solution a été mesurée.

Il est à noter que la PDO a été ajoutée uniquement pour établir le système de conformité et vérifier le pouvoir séparateur de la méthode.

2.2.4. Solution du Placebo

Une solution Placebo contenant l'ensemble des excipients a été préparée. La composition quantitative du placébo ne sera pas divulguée dans ce travail pour des raisons de confidentialité.

Un volume adéquat de placebo, soit 2 litres, a été préparé pour couvrir les trois jours de la phase de validation.

2.2.5. Solutions de la série d'étalonnage

Trois niveaux de concentration ont été préparés :

- **ST 0,2 %** correspondant à une concentration de 0,22 µg/ml.
- **ST 0,4 %** correspondant à une concentration de 0,44 µg/ml.
- **ST 0,5 %** correspondant à une concentration de 0,55 µg/ml.

La préparation de ces solutions a été faite comme suit :

- **ST 0,2 %** : un volume de 200 µL de la solution standard stock a été pesé dans une fiole de 100 mL, le volume a été ajusté à 100 mL avec le diluant. La concentration exacte de la solution a été calculée en utilisant la densité.
- **ST 0,4 %** : un volume de 400 µL de la solution standard stock a été pesé dans une fiole de 100 mL, le volume a été ajusté à 100 mL avec le diluant. La concentration exacte de la solution a été calculée en utilisant la densité.
- **ST 0,5 %** : un volume de 500 µL de la solution standard stock a été pesé dans une fiole de 100 mL, le volume a été ajusté à 100 mL avec le diluant. La concentration exacte de la solution a été calculée en utilisant la densité.

Trois séries d'étalonnage indépendantes ont été réalisées, à raison d'une série par jour.
Les solutions des séries d'étalonnage ont été filtrées à l'aide d'un filtre seringue en nylon de 0,2 µm avant injection.
Le protocole de la préparation est représenté dans le Tableau 72.

Tableau 72. Préparation de la série de calibration

Niveaux de concentration	Solutions de validation	Volume de la solution standard stock (µL)	Volume du diluant (mL)	Concentration de la solution d'étalonnage
ST 0,2%	SC1	200	qsp 100	0,22 µg/ml
ST 0,4%	SC2	400	qsp 100	0,44 µg/ml
ST 0,5%	SC3	500	qsp 100	0,55 µg/ml

2.2.6. Solutions de la série de validation

Cinq niveaux de concentration de placebo chargé ont été sélectionnés pour la série de validation:

- **Placebo chargé à 0,1 %** correspondant à une concentration de 0,37 µg/ml.
- **Placebo chargé à 0,2 %** correspondant à une concentration de 0,74 µg/ml.
- **Placebo chargé à 0,3 %** correspondant à une concentration de 1,11 µg/ml.
- **Placebo chargé à 0,4 %** correspondant à une concentration de 1,48 µg/ml.
- **Placebo chargé à 0,5 %** correspondant à une concentration de 1,85 µg/ml.

La préparation de ces placebos chargés s'est effectuée comme suit :

- **Placebo chargé à 0,1 % :** un volume de 336 µL de la solution standard stock a été pesée dans une fiole de 100 mL, le volume a été ajusté à 100 mL avec le placébo. La concentration exacte de la solution a été calculée en utilisant la densité.
- **Placebo chargé à 0,2 % :** un volume de 673 µL de la solution standard stock a été pesée dans une fiole de 100 mL, le volume a été ajusté à 100 mL avec le placébo. La concentration exacte de la solution a été calculée en utilisant la densité.
- **Placebo chargé à 0,3 % :** un volume de 1009 µL de la solution standard stock a été pesée dans une fiole de 100 mL, le volume a été ajusté à 100 mL avec le placébo. La concentration exacte de la solution a été calculée en utilisant la densité.

- **Placebo chargé à 0,4 % :** un volume de 1345 µL de la solution standard stock a été pesée dans une fiole de 100 mL, le volume a été ajusté à 100 mL avec le placébo. La concentration exacte de la solution a été calculée en utilisant la densité.
- **Placebo chargé à 0,5 % :** un volume de 1682 µL de la solution standard stock a été pesée dans une fiole de 100 mL, le volume a été ajusté à 100 mL avec le placébo. La concentration exacte de la solution a été calculée en utilisant la densité.

À partir de ces placébos chargés, les solutions de la sérié de validation (SV) ont été préparées. Un volume de 3 mL de chaque solution de placébo chargé a été dilué à 10 mL avec le diluant

Pour les placebos chargés à 0,1%, 0,2%, 0,4%, et 0,5%, trois solutions de validation indépendantes ont été préparées pour chaque niveau.

Trois séries de validation indépendantes ont été réalisées, à raison d'une série par jour.

Les solutions des séries de validation ont été filtrées à l'aide d'un filtre seringue en nylon de 0,2 µm avant injection.

Le protocole de la préparation est représenté dans le Tableau 73.

Tableau 73. Préparation de la Série de validation

Niveaux de concentration	Solutions de validation	Volume de la solution standard stock (µL)/ 100 ml placébo	Dilution	Concentration de la solution de validation
SS 0,1%	SV1	336	3 mL/10 mL (diluant)	0,111 µg/ml
SS 0,2%	SV2	673	3 mL/10 mL (diluant)	0,222 µg/ml
SS 0,3%	SV3	1009	3 mL/10 mL (diluant)	0,333 µg/ml
SS 0,4%	SV4	1345	3 mL/10 mL (diluant)	0,444 µg/ml
SS 0,5%	SV5	1682	3 mL/10 mL (diluant)	0,555 µg/ml

Au final, pour chaque série de validation, les 13 solutions de validation ont été obtenues : SS0,1%-1, SS0,1%-2, SS0,1%-3, SS0,2%-1, SS0,2%-2, SS0,2%-3, SS0,3%, SS0,4%-1, SS0,4%-2, SS0,4%-3, SS0,5%-1, SS0,5%-2, et SS0,5%-3.

2.3. Conditions Chromatographiques

Les conditions chromatographiques qui ont été utilisées, sont présentées dans le Tableau 74.

Tableau 74. Conditions chromatographiques utilisées dans la validation

<table>
<tr><td>Solution A</td><td colspan="2">Méthanol</td></tr>
<tr><td>Solution B</td><td colspan="2">30% méthanol et 70% tampon pH 6,8</td></tr>
<tr><td>Phase mobile</td><td colspan="2">Mode gradient
<table><tr><th>Temps min</th><th>Solution A %</th><th>Solution B %</th></tr><tr><td>0</td><td>7</td><td>93</td></tr><tr><td>23</td><td>36</td><td>64</td></tr><tr><td>28</td><td>36</td><td>64</td></tr><tr><td>29</td><td>7</td><td>93</td></tr><tr><td>34</td><td>7</td><td>93</td></tr></table></td></tr>
<tr><td rowspan="3">Colonne</td><td>Dimensions</td><td>▪ Longueur L = 10 cm
▪ Diamètre Ø = 4,6 mm</td></tr>
<tr><td>Phase stationnaire</td><td>▪ Gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie (3,5 µm)
▪ Taille des pores = 100 Å</td></tr>
<tr><td>Fabricant</td><td>▪ Waters Symmetry C18</td></tr>
<tr><td>Température</td><td colspan="2">40°C</td></tr>
<tr><td>Débit</td><td colspan="2">1,0 ml/mn</td></tr>
<tr><td>Détection</td><td colspan="2">DAD à 224nm</td></tr>
<tr><td>Volume d’injection</td><td colspan="2">20µl</td></tr>
</table>

2.4. Mode opératoire

La séquence d'analyse a été établie de la manière suivante :

- Au début, un minimum de 3 injections du ST 0,2% ont été effectuées pour vérifier la répétabilité du système et pour être utilisées dans la quantification par un étalonnage en externe.
- Ensuite, les injections des solutions d'étalonnage ont suivi, suivies par celles des solutions de validation.
- À la fin de la séquence, une réinjection de la solution ST 0,2% a été réalisée pour vérifier la stabilité des solutions.

Cette séquence a été analysée selon la méthode détaillée dans le Tableau 74.

Cette opération a été répétée sur deux autres jours en utilisant de nouvelles séries de validation et d'étalonnage.

Le deuxième jour, l'analyse a été effectuée sur une autre HPLC de la même marque.

Le troisième jour, l'analyse a été réalisée en changeant le manipulateur.

2.5. Critères à valider

2.5.1. Spécificité-sélectivité

La spécificité-sélectivité d'une méthode séparative telle que la HPLC a été démontrée par la séparation physique de la substance active (SA) des autres composants tels que les impuretés de synthèse, les produits de dégradation et les excipients.

En plus, la pureté des pics de différents composants a été vérifiée pour évaluer la possibilité de co-élution.

2.5.2. Linéarité des Réponses

La relation linéaire entre la concentration introduite (vraie) et la réponse du détecteur (aire du pic) a été étudiée sur les séries d'étalonnage et de validation.

La validité de la fonction linéaire a été confirmée par les éléments suivants :

1. La significativité statistique de l'association entre la concentration introduite et la réponse du détecteur a été évaluée par un test ANOVA.
2. L'ajustement du modèle aux données a été validé en calculant le coefficient de détermination R^2.
3. La significativité statistique de la pente a été vérifiée.
4. La distribution normale des valeurs résiduelles a été vérifiée.

Une comparaison entre les deux droites de régression d'étalonnage et de validation a été réalisée en :

1. Comparant les pentes pour explorer un éventuel effet matrice.
2. Comparant les ordonnées à l'origine pour explorer la spécificité.

2.5.3. Limite inférieure de l'intervalle

L'approche basée sur le rapport signal/bruit (S/N) a été utilisé pour la détermination de la limite de quantification, car elle est pertinente pour les procédures analytiques présentant du bruit de fond (Cas HPLC).

Pour les méthodes de dosage des impuretés, il est impératif que la limite de quantification (LOQ) soit inférieure ou égale au seuil d'exclusion, qui est de 0,1% dans notre cas.

Afin de valider cette exigence, le rapport signal/bruit (S/N) du pic d'OXO dans la solution de validation à 0,1% a été calculé sur les trois jours de validation.

Conformément aux normes, ce rapport signal/bruit (S/N) doit être supérieur ou égale à 10.

2.5.4. Justesse et Fidélité

La Justesse et la Fidélité de la méthode ont été réalisée sur 12 déterminations couvrant l'intervalle de mesure spécifiée [0,1%-0,5%] pour la procédure, comprenant 4 niveaux de concentrations (0,10%, 0,2%, 0,4%, et 0,5%), avec 3 répétitions chacune.

La méthode de quantification qui a été utilisée pour le calcul des concentrations, était un étalonnage externe à un seul point. Le niveau de concentration **ST 0,2%** a été choisi comme un standard.

La Justesse et la Fidélité ont été évaluées de deux manières :

- en combinaison (profile d'exactitude)
- indépendante, chacune (Justesse et la Fidélité) avec un critère d'acceptation prédéfini.

A. Profil d'exactitude

La méthodologie suivante a été adoptée pour déterminer le profil d'exactitude :

- Calcul des réponses alignées.
- Obtention des prédictions inverses.
- Évaluation des critères de validation.
- Détermination des intervalles de tolérance.
- Établissement des limites de quantification basses (LLOQ) et hautes (ULOQ).

B. Justesse

Les résultats des 12 déterminations ont été exprimés en Indice de recouvrement (IR) afin de permettre la comparaison des concentrations variables tant entre les niveaux que à l'intérieur du même niveau.

Pour évaluer la justesse, l'homogénéité des variances entre les niveaux de concentration a été évaluée, suivi de l'homogénéité des moyennes par niveau de concentration.

Enfin, l'indice de recouvrement par niveau de concentration (IR) et l'indice de recouvrement moyen (IRM) ont été calculés.

C. Fidélité

En ce qui concerne la fidélité, les variances intra-jour et inter-jour ont été évaluées par la méthode du maximum de vraisemblance restreint [60].

La répétabilité et la précision intermédiaire ont été exprimées par les coefficients de variation RSD.

2.5.5. Stabilité des solutions

La stabilité des solutions a été évaluée en examinant la variabilité de l'aire du pic d'OXO dans la solution d'étalonnage ST 0,2%, tant au début qu'à la fin de la séquence.

Cette évaluation de stabilité a été testée sur une période de trois jours de validation.

En fin de compte, une durée de stabilité a été déterminée.

2.5.6. Système de conformité

Le système de conformité en HPLC, partie intégrante du processus de validation, garantit la fiabilité de la méthode et assure la qualité des résultats. Il comprend divers facteurs et critères à vérifier dans chaque analyse pour s'assurer de l'intégrité du processus analytique et répondre aux normes réglementaires. Avant l'exploitation des données de la validation, les paramètres de ce système de conformité ont été vérifiés chaque jour :

- Répétabilité des injections : L'écart type relatif RSD de la surface du pic dû à l'OXO, déterminé sur un minimum de 3 injections de la solution standard, ne doit pas dépasser 10,0% [98].

- Résolution : Doit être au minimum de 2,0 [62].

- Facteur de symétrie du pic dû à l'OXO dans le chromatogramme de la solution standard : Doit être compris entre 0,8 et 1,8 selon la monographie 2.2.46. de la Ph Eur 11 (Annexe 7).

- Rapport signal/bruit (S/N) : Doit être d'au moins 10 pour le pic dû à l'oxo dans le chromatogramme obtenu avec une solution à un niveau de concentration correspondant à la limite d'exclusion, selon la monographie 2.2.46. de la Ph Eur 11 (Annexe 7).

Une fois la validité de la méthode assurée, ces critères d'acceptation des tests de conformité du système ont été affinés en utilisant les données de validation.

3. Résultats et discussion

3.1. Vérification de la conformité du système

3.1.1. Répétabilité

Au premier jour, les aires du pic attribuable à l'OXO, déterminées à partir des 4 injections de la solution standard 0,2%, étaient les suivantes : 22,127, 23,862, 21,663, et 23,607 (Figure 80). L'écart type relatif RSD de ces aires était de 4,75 %.

Au deuxième jour, les aires du pic attribuable à l'OXO, déterminées sur les 4 injections de la solution standard 0,2%, étaient les suivantes : 23,452, 23,144, 23,836, et 22,309 (Figure 81). L'écart type relatif RSD de ces aires était de 2,80 %.

Au troisième jour, les aires du pic attribuable à l'OXO, déterminées sur les 3 injections de la solution standard 0,2%, étaient les suivantes : 19,651, 19,142, et 19,974 (Figure 82). L'écart type relatif RSD de ces aires était de 2,14 %.

Les valeurs du RSD sur les 3 jours sont inférieures à 10 %

3.1.2. Facteur de symétrie

Au premier jour, les valeurs du facteur de symétrie du pic dû à l'OXO dans les 4 chromatogrammes de la solution standard 0,2% étaient les suivantes : 1,222, 1,136, 1,136 et 1,124.

Au deuxième jour, les valeurs du facteur de symétrie du pic dû à l'OXO dans les 4 chromatogrammes de la solution standard 0,2% étaient les suivantes : 1,455, 1,310, 1,364 et 1,307.

Au troisième jour, les valeurs du facteur de symétrie du pic dû à l'OXO dans les chromatogrammes de la solution standard 0,2% étaient les suivantes : 1,302, 0,977 et 1,454.

Sur les 3 jours de validation, le facteur de symétrie (tailing factor) est toujours inclus dans l'intervalle de 0,8 à 1,8.

3.2. Spécificité-sélectivité

La Figure 78 qui présente une comparaison entre les chromatogrammes du diluant, de la solution de calibration et de la solution de validation, met en évidence une bonne séparation des différents composants, à savoir :

- OXO (substance active)
- PDO (impureté de synthèse)
- MP (excipient)
- PP (excipient)

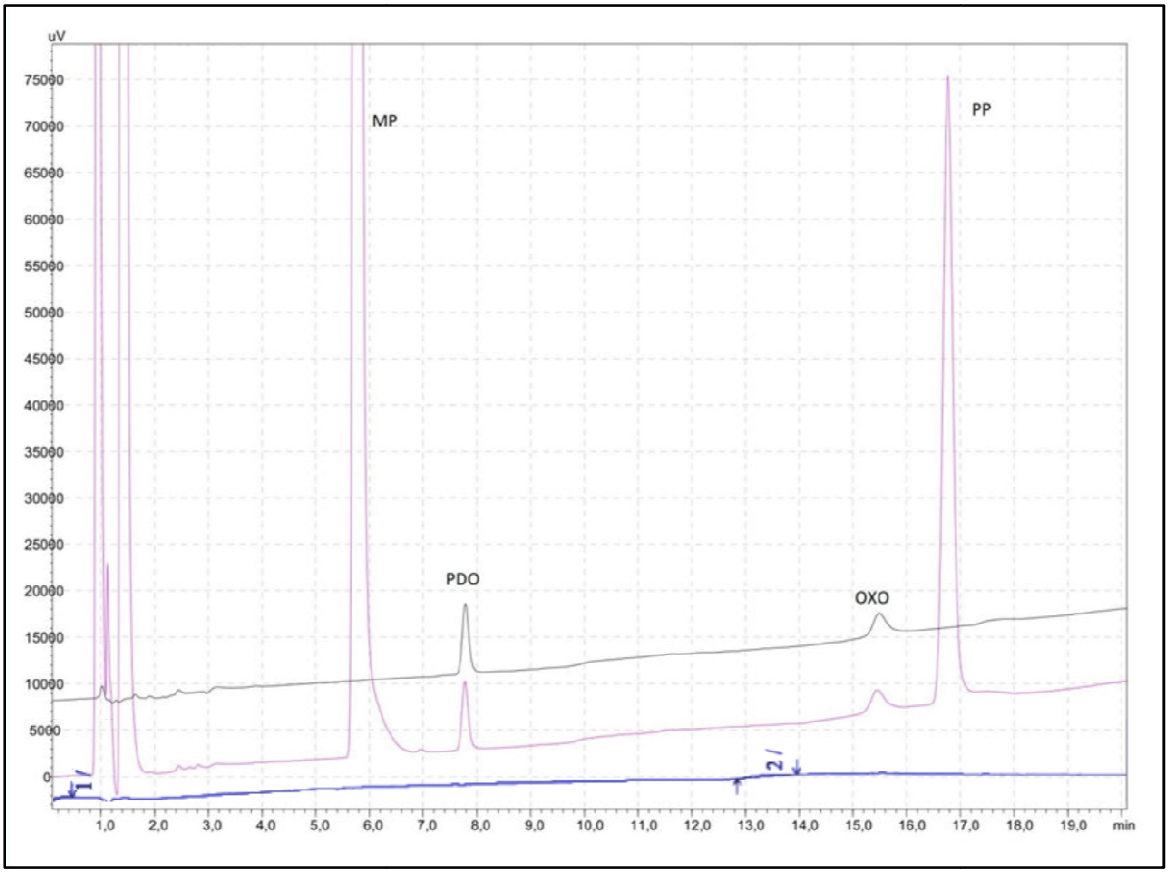
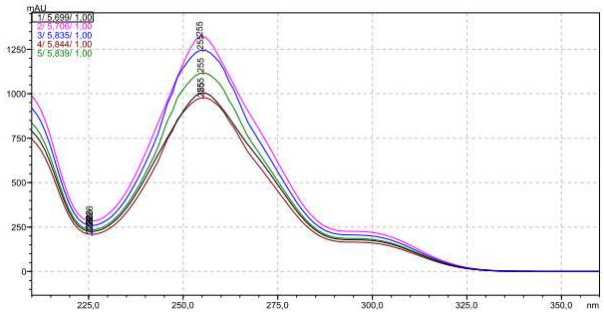


Figure 78. Chromatogrammes comparatifs : diluant (en bleu), solution de calibration (en noir), solution de validation (en rouge)

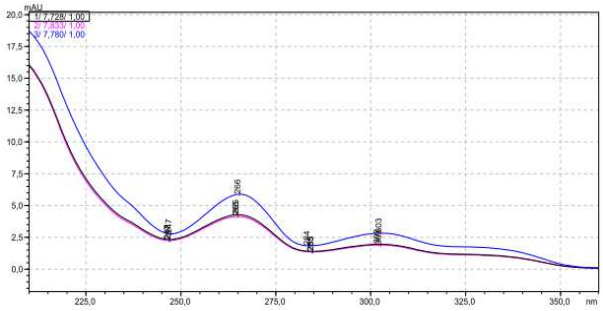
Aucun pic est observé dans le chromatogramme du diluant au temps de rétention des quatre substances (OXO, PDO, MP et PP).

La Figure 79, illustrant la superposition des spectres au début, au milieu et à la fin des pics (OXO, PDO, MP et PP) de la solution de validation, met en évidence la pureté de ces pics.

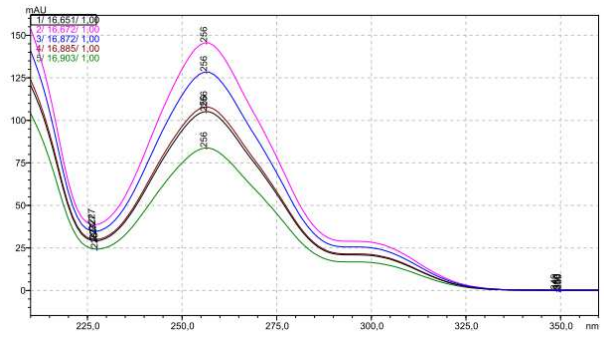
MP



PDO



PP



OXO

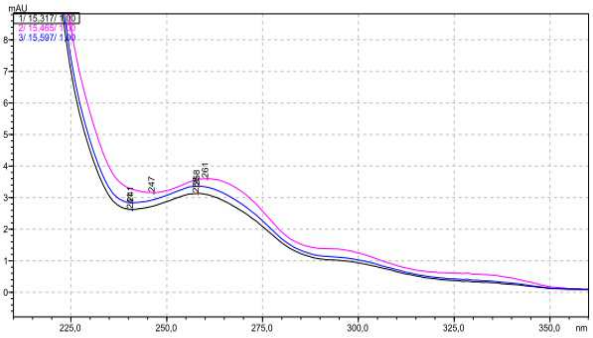


Figure 79. Pureté des pics OXO, PDO, MP et PP

Cette méthode démontre ainsi sa capacité à distinguer et à séparer les éventuels interférents présents dans ce produit.

En conclusion, la méthode de dosage des substances apparentées se révèle sélective.

3.3. Linéarité des Réponses

3.3.1. Linéarité des Réponses sur le principe actif seul

Les résultats des trois séries d'étalonnage (Figures 80, 81 et 82) ont été résumés dans les Tableaux 75, 76 et 77.

Tableau 75. Résultats de la série d'étalonnage (jour 1)

Jour	Niveau de concentration	Concentration standard en µg/ml	Air ST/1000
J1	ST 0,2%	0,281	22,815
J1	ST 0,4%	0,447	36,693
J1	ST 0,5%	0,577	45,297

Tableau 76. Résultats de la série d'étalonnage (jour 2)

Jour	Niveau de concentration	Concentration standard en µg/ml	Air ST/1000
J2	ST 0,2%	0,274	23,185
J2	ST 0,4%	0,419	34,362
J2	ST 0,5%	0,577	46,928

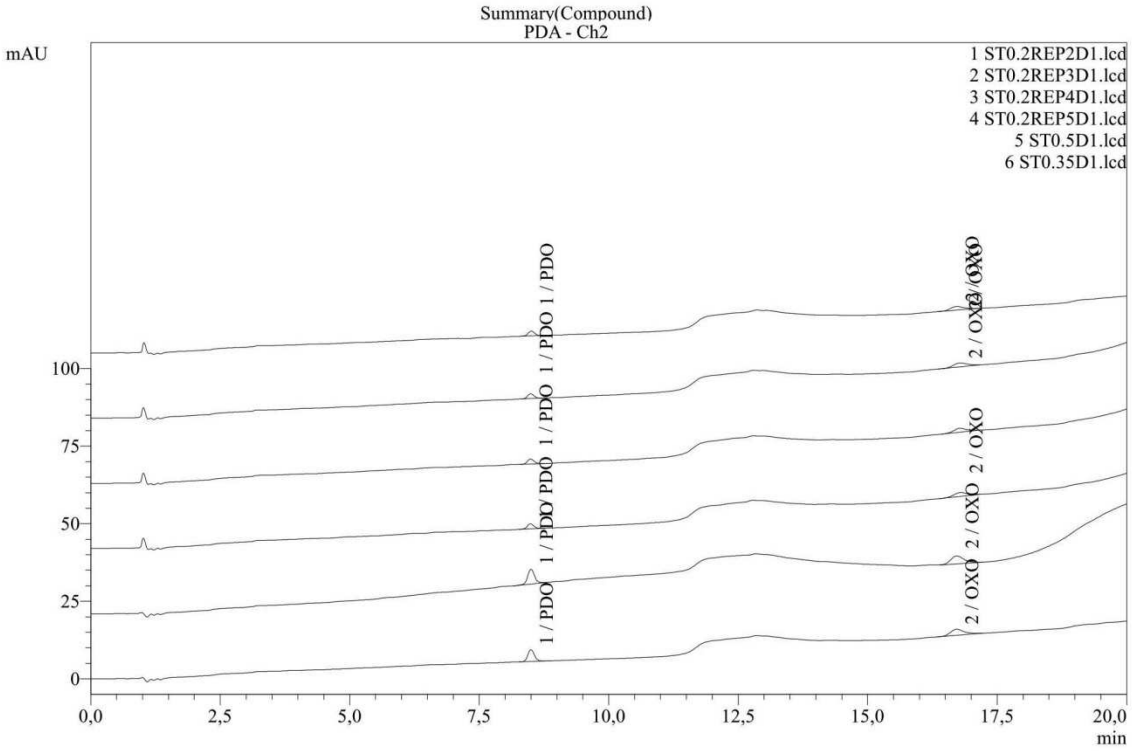
Tableau 77. Résultats de la série d'étalonnage (jour 3)

Jour	Niveau de concentration	Concentration standard en µg/ml	Air ST/1000
J3	ST 0,2%	0,2144	19,589
J3	ST 0,4%	0,379	32,922
J3	ST 0,5%	0,549	47,746

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

Method Filename : SIMO.lcm
Batch Filename : VALI D1.lcb



<< PDA >>

ID#2 Compound Name: OXO

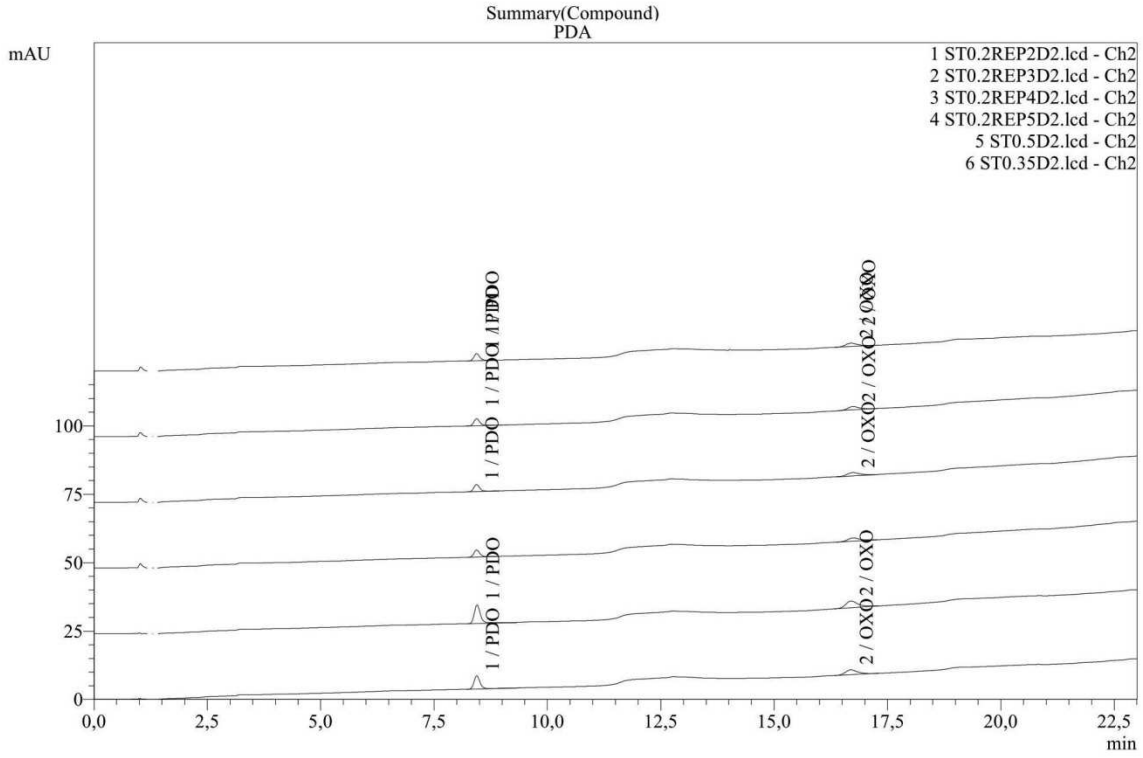
Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor	S/N	Resolution(EP)	Number of Theoretical Plate(EP)
ST0.2REP2D1.lcd	16,720	22127	1,222	47,84	23,402	19802
ST0.2REP3D1.lcd	16,784	23862	1,136	28,56	23,308	19048
ST0.2REP4D1.lcd	16,784	21663	1,136	43,27	24,321	22282
ST0.2REP5D1.lcd	16,795	23607	1,124	39,70	23,255	18861
ST0.5D1.lcd	16,720	45297	1,271	51,14	23,962	21684
ST0.35D1.lcd	16,714	36693	1,319	58,65	23,476	20221

Figure 80. Rapport d'analyse de la série d'étalonnage au jour 1

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

Method Filename : SIMO.lcm
Batch Filename : VAL D2.lcb



<< PDA >>

ID#2 Compound Name: OXO

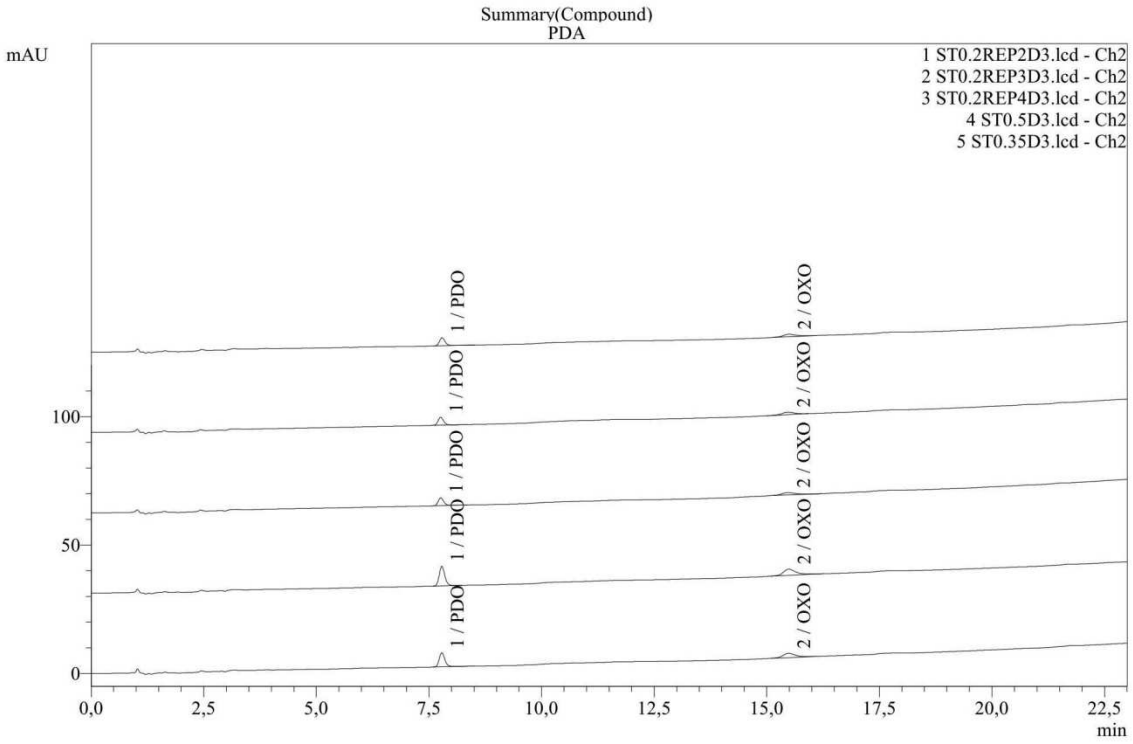
Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor	S/N	Resolution(EP)	Number of Theoretical Plate(EP)
ST0.2REP2D2.lcd	16,688	23452	1,455	63,46	23,286	19493
ST0.2REP3D2.lcd	16,741	23144	1,310	82,50	23,455	19833
ST0.2REP4D2.lcd	16,731	23836	1,364	95,08	23,021	18766
ST0.2REP5D2.lcd	16,741	22309	1,307	71,16	23,369	19548
ST0.5D2.lcd	16,694	46928	1,422	120,44	23,406	20018
ST0.35D2.lcd	16,688	34362	1,372	96,55	23,156	19376

Figure 81. Rapport d'analyse de la série d'étalonnage au jour 2

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

Method Filename : SIMO.lcm
Batch Filename : VAL D3.lcb



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: OXO

Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor	S/N	Resolution(EP)	Number of Theoretical Plate(EP)
ST0.2REP2D3.lcd	15,493	19651	1,320	107,02	21,260	15125
ST0.2REP3D3.lcd	15,472	19142	0,977	69,00	21,218	14907
ST0.2REP4D3.lcd	15,472	19974	1,454	34,72	21,140	14735
ST0.5D3.lcd	15,486	47746	1,501	260,52	21,986	16631
ST0.35D3.lcd	15,483	32922	1,368	82,75	21,567	15747

Figure 82. Rapport d'analyse de la série d'étalonnage au jour 3

L'étude de la linéarité de la fonction de réponse des 3 séries d'étalonnage a donnée les résultats suivants :

Analyse de régression : C ST en µg/ml en fonction de Air ST /1000

Analyse de variance

Source	DL	Contribution	Valeur F	Valeur de p
Régression	1	98,35%	418,05	0,000
Air ST /1000	1	98,35%	418,05	0,000
Erreur	7	1,65%		
Total	8	100,00%		

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,0188170	98,35%	98,12%	96,96%

Coefficients

Terme	Coeff	Coef ErT	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p
Constante	-0,0185	0,0220	(-0,0705; 0,0336)	-0,84	0,430
Air ST/1000	0,012545	0,000614	(0,011094; 0,013996)	20,45	0,000

Equation de régression

C ST en µg/ml = -0,0185 + 0,012545 Air ST /1000

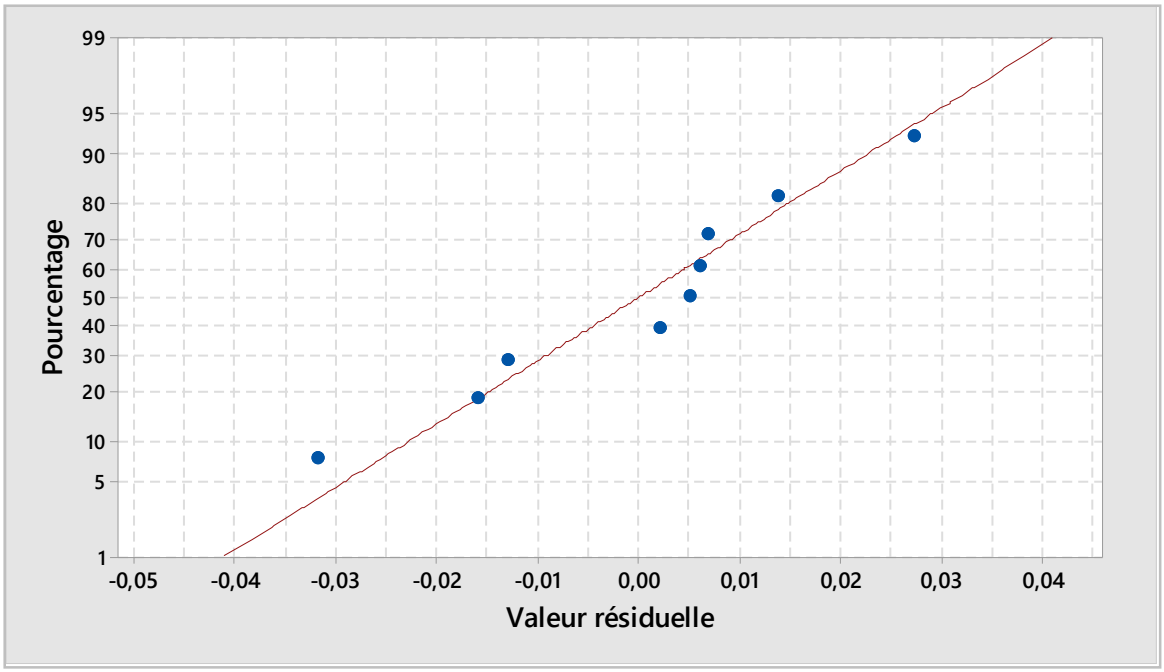


Figure 83. Droite de Henry (séries d'étalonnage)

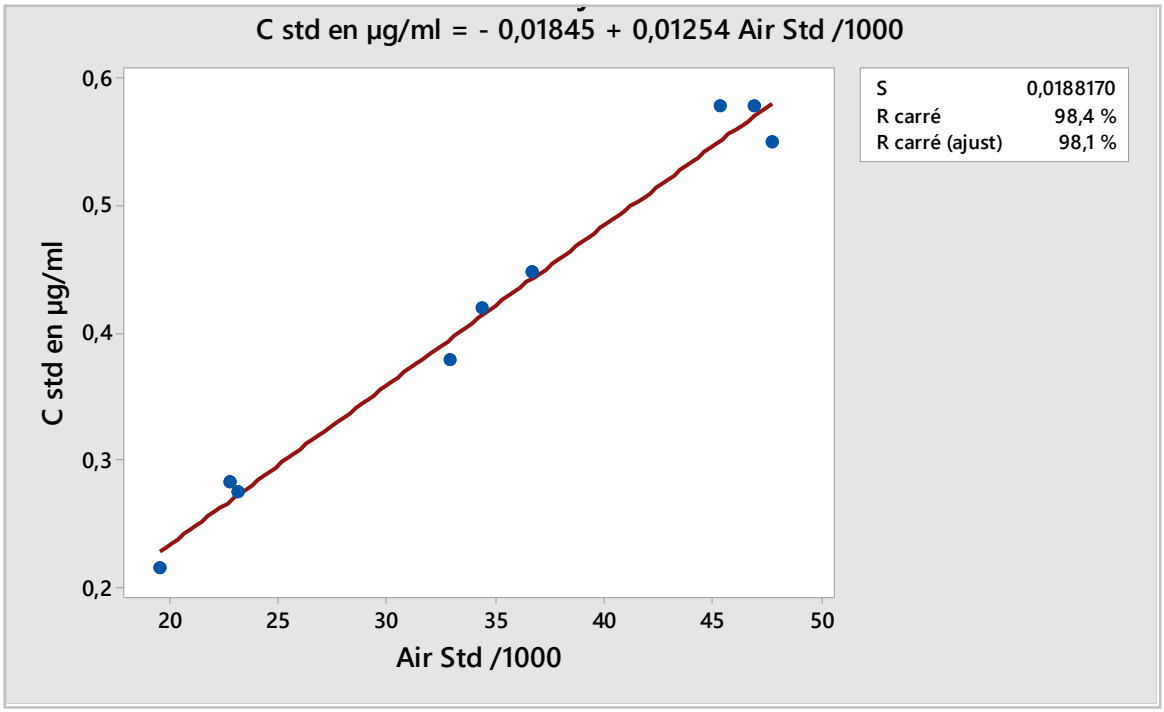


Figure 84. Droite d'ajustement (séries d'étalonnage)

Les étapes suivantes ont été entreprises pour examiner et discuter les résultats statistiques de l'analyse de régression :

- **Détermination si l'association entre la réponse et le terme est statistiquement significative** : Pour déterminer si l'association entre la réponse et chacun des termes du modèle est statistiquement significative, la valeur de p du terme est comparée à la seuil de signification pour évaluer l'hypothèse nulle. L'hypothèse nulle est que le coefficient du terme est égal à zéro, ce qui indique qu'il n'existe aucune association entre le terme et la réponse. En général, un seuil de signification (noté alpha ou α) de 0,05 fonctionne bien. Un seuil de signification de 0,05 indique un risque de 5% de conclure à tort qu'il existe une association.

  La valeur de p du terme Aire ST/1000 (0,000) est inférieure ou égale au seuil de signification de 0,05, on peut conclure qu'il existe une association statistiquement significative entre la variable de réponse C ST (µg/ml) et le terme (Aire ST/1000).

- **Détermination de l'ajustement du modèle aux données :** Le R^2 est le pourcentage de variation dans la réponse qui est expliquée par le modèle. Plus la valeur de R^2 est élevée, plus l'ajustement offert par le modèle est bon. Le R^2 se situe toujours entre 0 % et 100 %.

  La valeur de R^2, mesurée à 0,9835, dépasse le critère d'acceptation fixé par plusieurs références [25,98,99], qui stipulent une R^2 supérieure à 0,98.

- **Coefficients de régression :** Si la valeur de p d'un coefficient est inférieure au seuil de signification choisi, par exemple 0,05, la relation entre le prédicteur et la réponse est statistiquement significative. Si la valeur de p d'un coefficient est supérieur au seuil de signification choisi, la relation entre le prédicteur et la réponse est statistiquement non significative (comparable au zéro)

  La valeur moyenne de la pente, établie à 0,012545, est accompagnée d'une analyse statistique approfondie. En effet, la valeur de P associée au terme "pente" est remarquablement basse, se chiffrant à 0,000, ce qui est inférieur à la valeur seuil de 0,05.

Cette constatation indique que la pente est statistiquement significative et qu'elle diffère de zéro.

Cette conclusion est également étayée par l'intervalle de confiance à 95% de la pente, déterminé à être (0,011094; 0,013996), où aucune de ces valeurs n'inclut zéro. Ce qui confirme la validité de droite de régression.

La moyenne de l'ordonnée à l'origine, établie à -0,0185, a été soumise à une analyse statistique approfondie. La valeur de P associée au terme "pente" est de 0,430, dépassant le seuil de 0,05, indiquant ainsi que l'ordonnée à l'origine n'est pas statistiquement significative et ne diffère pas de zéro.

Cette conclusion est renforcée par l'intervalle de confiance à 95% de l'ordonnée à l'origine, mesuré entre -0,0705 et 0,0336, où la valeur zéro est incluse.

En conséquence, ces résultats suggèrent que la méthode utilisée est spécifique.

- **Détermination si le modèle vérifie les hypothèses de l'analyse :** Les graphiques des valeurs résiduelles permettent de déterminer si le modèle est adapté et si les hypothèses de l'analyse sont vérifiées. Si elles ne le sont pas, il se peut que le modèle ne soit pas ajusté aux données et vous devez être prudent lors de l'interprétation des résultats.

  La droite de Henry (Figure 83) suit approximativement une ligne droite, ce qui suggère que les valeurs résiduelles présentent une distribution normale. Cela confirme les hypothèses de l'analyse.

3.3.2. Linéarité des Réponses sur le placébo chargé

Les résultats des trois séries d'étalonnage (Figures 85, 86 et 87) ont été résumés dans les Tableaux 78, 79 et 80.

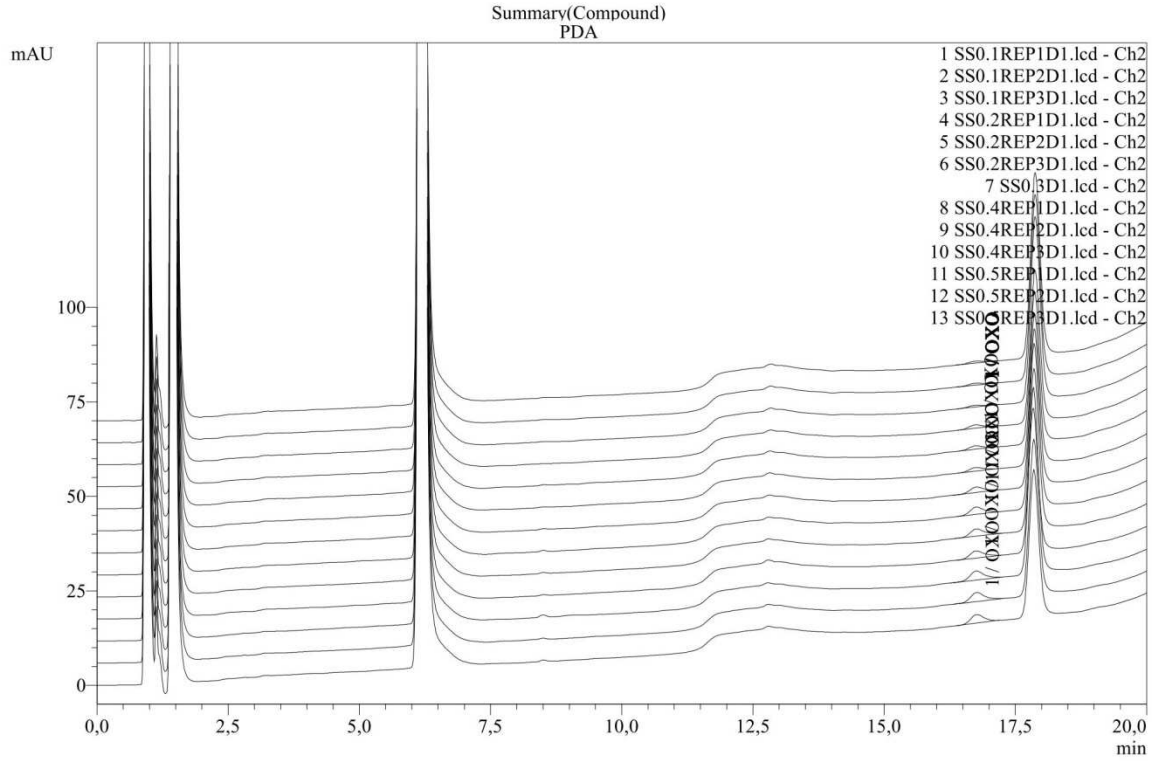
Tableau 78. Résultats de la série de validation (Jour 1)

JOUR	Niveau de concentration	Concentration introduite (µg/ml)	Aire ECH	Aire ECH /1000
J1	SS 0,1%-1	0,108	9367	9,367
J1	SS 0,1%-2	0,117	9756	9,756
J1	SS 0,1%-3	0,118	10031	10,031
J1	SS 0,2%-1	0,213	15956	15,956
J1	SS 0,2%-2	0,217	17459	17,459
J1	SS 0,2%-3	0,216	16447	16,447
J1	SS 0,3%	0,329	27104	27,104
J1	SS 0,4%-1	0,441	35348	35,348
J1	SS 0,4%-2	0,440	35931	35,931
J1	SS 0,4%-3	0,441	36594	36,594
J1	SS 0,5%-1	0,547	44809	44,809
J1	SS 0,5%-2	0,552	45199	45,199
J1	SS 0,5%-3	0,551	41535	41,535

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

Method Filename : SIMO 1.lcm
Batch Filename : VALI D1.lcb



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: OXO

Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
SS0.1REP1D1.lcd	16,773	9367	1,107	16499
SS0.1REP2D1.lcd	16,763	9756	1,120	16288
SS0.1REP3D1.lcd	16,766	10031	1,144	15917
SS0.2REP1D1.lcd	16,741	15956	1,125	20193
SS0.2REP2D1.lcd	16,752	16447	1,175	20262
SS0.2REP3D1.lcd	16,752	17459	1,173	19190
SS0.3D1.lcd	16,763	27104	1,185	19908
SS0.4REP1D1.lcd	16,757	35348	1,239	19969
SS0.4REP2D1.lcd	16,763	35931	1,255	19480
SS0.4REP3D1.lcd	16,753	36594	1,282	19043
SS0.5REP1D1.lcd	16,754	44809	1,302	19840
SS0.5REP2D1.lcd	16,765	45199	1,327	20049
SS0.5REP3D1.lcd	16,766	41535	1,188	20085

Figure 85. Rapport d'analyse de la série de validation au jour 1

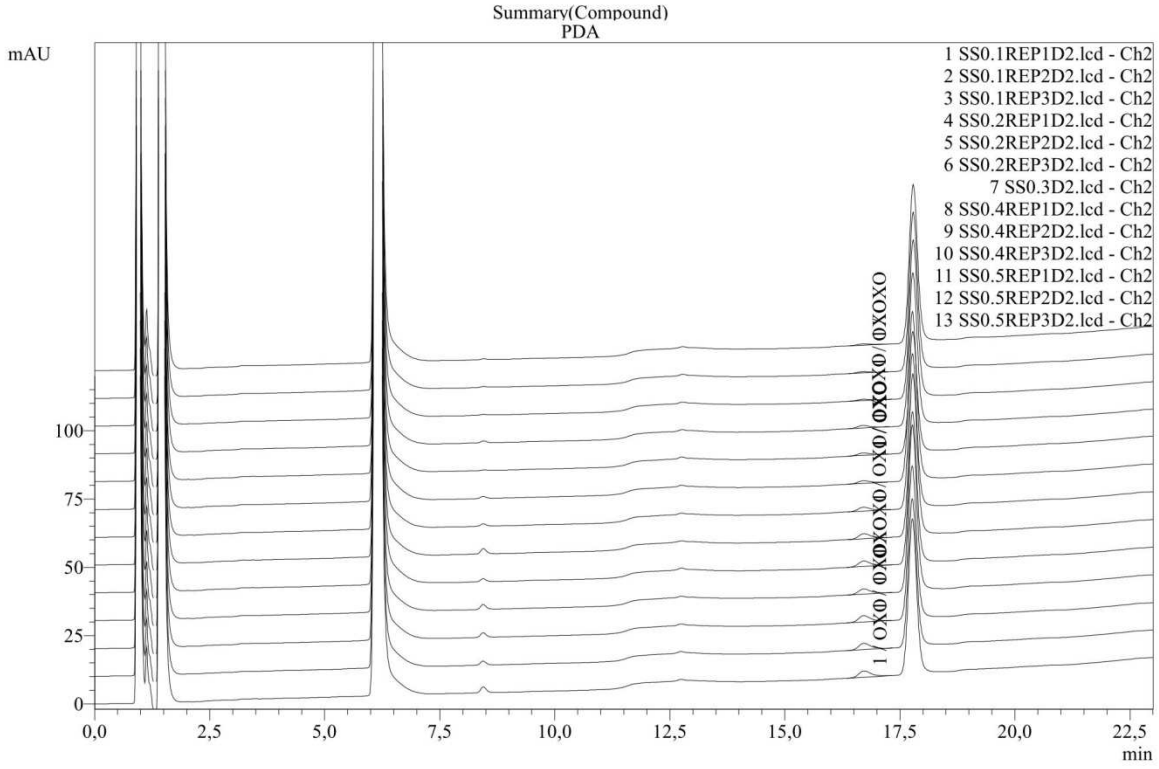
Tableau 79. Résultats de la série de validation (Jour 2)

JOUR	Niveau de concentration	Concentration introduite (µg/ml)	Aire éch	Aire éch /1000
J2	SS 0,1%-1	0,108	9772	9,772
J2	SS 0,1%-2	0,109	9626	9,626
J2	SS 0,1%-3	0,114	9988	9,988
J2	SS 0,2%-1	0,216	18414	18,414
J2	SS 0,2%-2	0,216	18003	18,003
J2	SS 0,2%-3	0,220	18266	18,266
J2	SS 0,3%	0,323	26631	26,631
J2	SS 0,4%-1	0,440	34993	34,993
J2	SS 0,4%-2	0,471	38211	38,211
J2	SS 0,4%-3	0,443	36052	36,052
J2	SS 0,5%-1	0,550	43601	43,601
J2	SS 0,5%-2	0,551	44481	44,481
J2	SS 0,5%-3	0,547	44169	44,169

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

Method Filename : SIMO.lcm
Batch Filename : VAL D2.lcb



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: OXO

Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
SS0.1REP1D2.lcd	16,709	9772	1,368	16835
SS0.1REP2D2.lcd	16,709	9626	1,341	17005
SS0.1REP3D2.lcd	16,706	9988	1,428	16620
SS0.2REP1D2.lcd	16,699	18414	1,376	18707
SS0.2REP2D2.lcd	16,709	18003	1,335	18696
SS0.2REP3D2.lcd	16,709	18266	1,309	19205
SS0.3D2.lcd	16,709	26631	1,423	19552
SS0.4REP1D2.lcd	16,720	34993	1,363	19951
SS0.4REP2D2.lcd	16,714	38211	1,392	19718
SS0.4REP3D2.lcd	16,720	36052	1,376	19759
SS0.5REP1D2.lcd	16,713	43601	1,372	20067
SS0.5REP2D2.lcd	16,720	44481	1,372	19785
SS0.5REP3D2.lcd	16,722	44169	1,373	19927

Figure 86. Rapport d'analyse de la série de validation au jour 2

Tableau 80. Résultats de la série de validation (Jour 3)

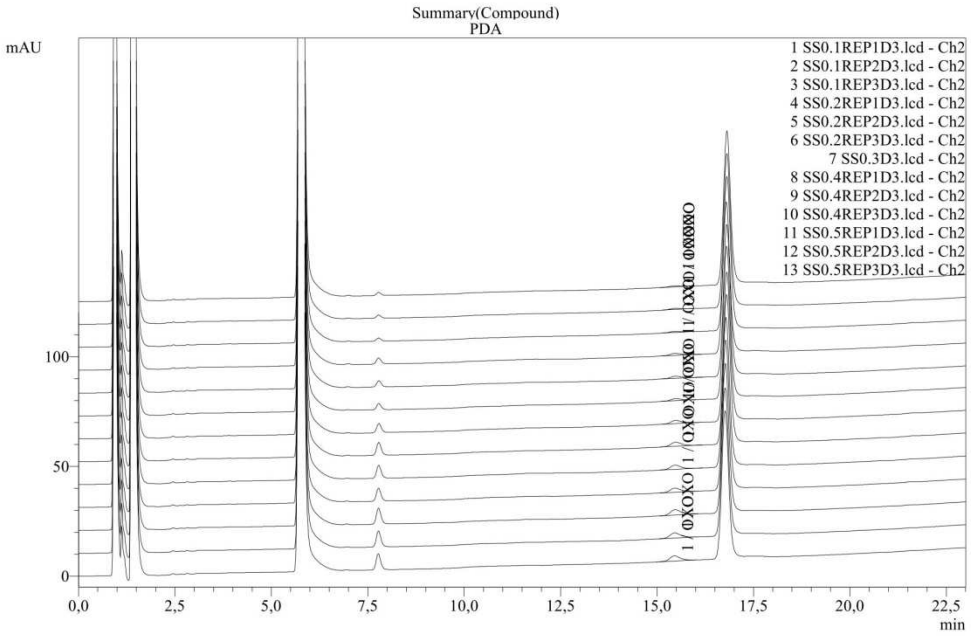
JOUR	Niveau de concentration	Concentration introduite (µg/ml)	Aire éch	Aire éch /1000
J3	SS 0,1%-1	0,108	9541	9,541
J3	SS 0,1%-2	0,1025	9592	9,592
J3	SS 0,1%-3	0,108	9321	9,321
J3	SS 0,2%-1	0,215	20073	20,073
J3	SS 0,2%-2	0,217	21683	21,683
J3	SS 0,2%-3	0,215	19619	19,619
J3	SS 0,3%	0,324	30108	30,108
J3	SS 0,4%-1	0,435	38171	38,171
J3	SS 0,4%-2	0,434	38225	38,225
J3	SS 0,4%-3	0,435	37598	37,598
J3	SS 0,5%-1	0,547	47515	47,515
J3	SS 0,5%-2	0,543	44980	44,98
J3	SS 0,5%-3	0,543	46223	46,223

28/01/2024 17:10:02 Page 1 / 1

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

Method Filename : SIMO.lcm
Batch Filename : VAL D3.lcb



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: OXO

Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Number of Theoretical Plate(EP)
SS0.1REP1D3.lcd	15,483	9541	0,975	15315
SS0.1REP2D3.lcd	15,482	9592	1,072	15227
SS0.1REP3D3.lcd	15,482	9321	1,035	15543
SS0.2REP1D3.lcd	15,472	20073	1,400	15416
SS0.2REP2D3.lcd	15,483	21683	1,447	14562
SS0.2REP3D3.lcd	15,483	19619	1,203	15726
SS0.3D3.lcd	15,483	30108	1,488	15733
SS0.4REP1D3.lcd	15,483	38171	1,404	15827
SS0.4REP2D3.lcd	15,467	38255	1,400	16106
SS0.4REP3D3.lcd	15,461	37598	1,321	15913
SS0.5REP1D3.lcd	15,466	47515	1,336	16305
SS0.5REP2D3.lcd	15,452	44980	1,279	16324
SS0.5REP3D3.lcd	15,451	46223	1,199	16063

Figure 87. Rapport d'analyse de la série de validation au jour 3

L'étude de la linéarité de la fonction de réponse des 3 séries de validation a donné les résultats suivants :

Analyse de régression : C introduite (µg/ml) en fonction .de l'Aire ECH/1000

Analyse de variance

Source	DL	Contribution	Valeur F	Valeur de p
Régression	1	98,87%	3227,72	0,000
Aire ECH /1000	1	98,87%	3227,72	0,000
Erreur	37	1,13%		
Total	38	100,00%		

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,0183011	98,87%	98,84%	98,76%

Coefficients

Terme	Coeff	Coef ErT	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p
Constante	-0,00937	0,00664	(-0,02282; 0,00407)	-1,41	0,166
Aire ECH /1000	0,012324	0,000217	(0,011884; 0,012763)	56,81	0,000

Equation de régression

C introduite (µg/ml) = -0,00937 + 0,012324 Aire ECH /1000

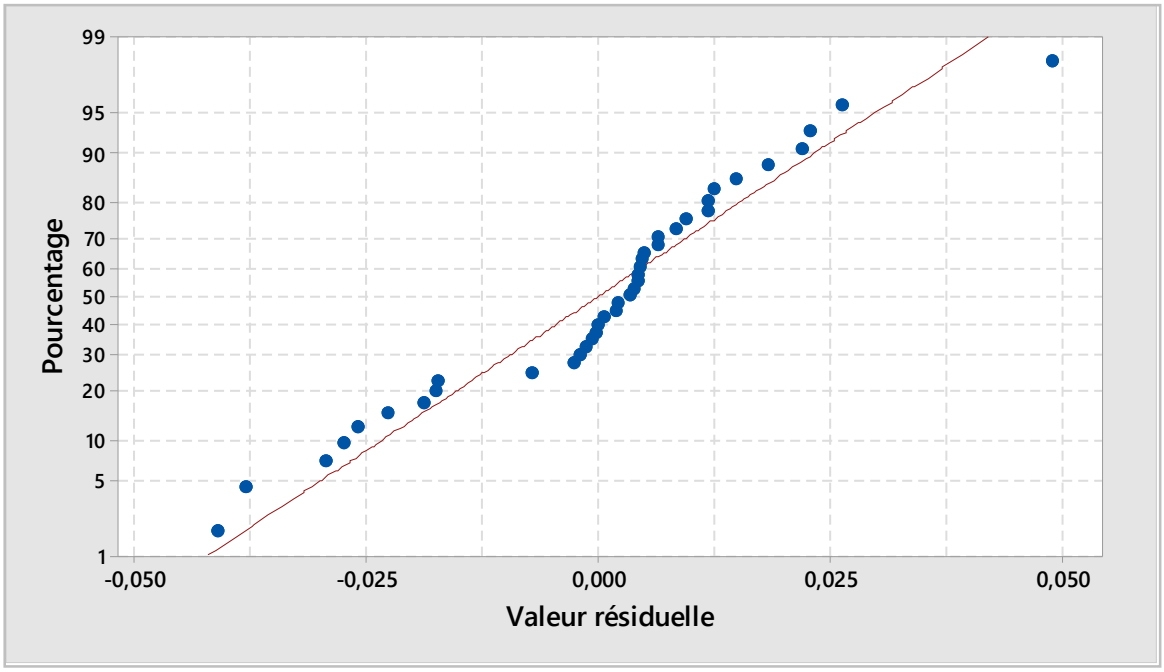


Figure 88. Droite de Henry (séries de validation)

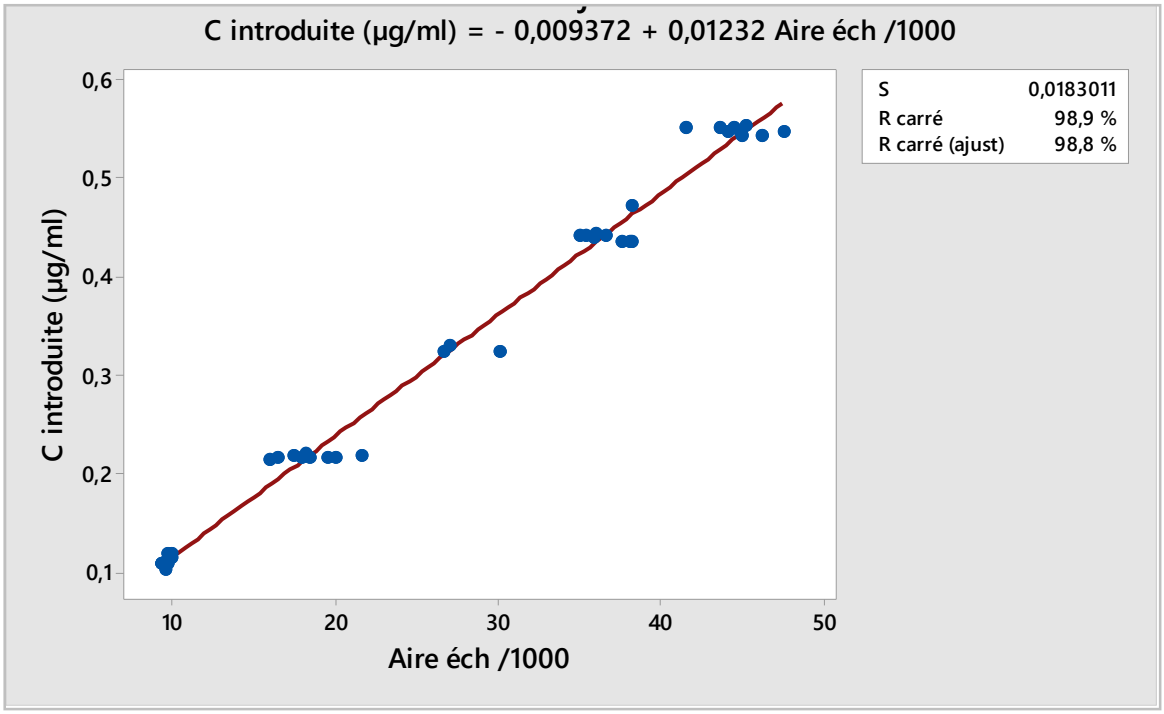


Figure 89. Droite d'ajustement (séries de validation)

Les étapes suivantes ont été entreprises pour examiner et discuter les résultats statistiques de l'analyse de régression :

- **Détermination si l'association entre la réponse et le terme est statistiquement significative** : Pour déterminer si l'association entre la réponse et chacun des termes du modèle est statistiquement significative, la valeur de p du terme est comparée à la seuil de signification pour évaluer l'hypothèse nulle. L'hypothèse nulle est que le coefficient du terme est égal à zéro, ce qui indique qu'il n'existe aucune association entre le terme et la réponse. En général, un seuil de signification (noté alpha ou α) de 0,05 fonctionne bien. Un seuil de signification de 0,05 indique un risque de 5% de conclure à tort qu'il existe une association.

  La valeur de p du terme Aire ECH /1000 (0,000) est inférieure au seuil de signification de 0,05, on peut conclure qu'il existe une association statistiquement significative entre la variable de réponse C introduite (µg/ml) et le terme Aire ECH /1000.

- **Détermination de l'ajustement du modèle aux données :** Le R^2 est le pourcentage de variation dans la réponse qui est expliquée par le modèle. Plus la valeur de R^2 est élevée, plus l'ajustement offert par le modèle est bon. Le R^2 se situe toujours entre 0 et 1.

  La valeur de R^2, mesurée à 0,9887, dépasse largement le critère d'acceptation fixé par plusieurs références [25,98,99] qui stipulent une R^2 supérieure à 0,98.

- **Coefficients de régression :** Si la valeur de p d'un coefficient est inférieure au seuil de signification choisi, par exemple 0,05, la relation entre le prédicteur et la réponse est statistiquement significative. Si la valeur de p d'un coefficient est supérieur au seuil de signification choisi, la relation entre le prédicteur et la réponse est statistiquement non significative (comparable au zéro)

  La valeur moyenne de la pente, établie à 0,012324, est accompagnée d'une analyse statistique approfondie. En effet, la valeur de P associée au terme "pente" est remarquablement basse, se chiffrant à 0,000, ce qui est inférieur à la valeur seuil de 0,05.

Cette constatation indique que la pente est statistiquement significative et qu'elle diffère de zéro.

Cette conclusion est également étayée par l'intervalle de confiance à 95% de la pente, déterminé à être (0,011884; 0,012763), où aucune de ces valeurs n'inclut zéro. Ce qui confirme la validité de droite de régression.

La moyenne de l'ordonnée à l'origine, établie à -0,00937, a été soumise à une analyse statistique approfondie. La valeur de P associée au terme "pente" est de 0,166, dépassant le seuil de 0,05, indiquant ainsi que l'ordonnée à l'origine n'est pas statistiquement significative et ne diffère pas de zéro.

Cette conclusion est renforcée par l'intervalle de confiance à 95% de l'ordonnée à l'origine, mesuré entre (-0,02282; 0,00407), où la valeur zéro est incluse.

En conséquence, ces résultats suggèrent que la méthode utilisée est spécifique.

- **Détermination si le modèle vérifie les hypothèses de l'analyse :** Les graphiques des valeurs résiduelles permettent de déterminer si le modèle est adapté et si les hypothèses de l'analyse sont vérifiées. Si elles ne le sont pas, il se peut que le modèle ne soit pas ajusté aux données et vous devez être prudent lors de l'interprétation des résultats.

  La droite de Henry (Figure 89) suit approximativement une ligne droite, ce qui suggère que les valeurs résiduelles présentent une distribution normale. Cela confirme les hypothèses de l'analyse.

3.3.3. Comparaison des droites de régression du principe actif seul et du placébo chargé

Test de comparaison des pentes

Test t à 2 échantillons et limites de confiance

Méthode

μ_1 : moyenne de l'échantillon 1

μ_2 : moyenne de l'échantillon 2

Différence : $\mu_1 - \mu_2$

Statistiques descriptives

Echantillon	N	Moyenne	EcTyp	ErT moyenne
Echantillon 1	39	0,012324	0,000217	0,000035
Echantillon 2	9	0,012545	0,000614	0,00020

Test

Hypothèse nulle $H_0 : \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hypothèse alternative $H_1 : \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valeur de T	DL	Valeur de P
-1,06	8	0,318

Pour déterminer si la différence entre les moyennes de population est statistiquement significative, on compare la valeur de p au seuil de signification. En général, un seuil de signification (noté alpha ou α) de 0,05 fonctionne bien.

- Valeur de $p \leq \alpha$: la différence entre les moyennes est statistiquement significative (Rejeter H0)
- Valeur de $p > \alpha$: la différence entre les moyennes n'est pas statistiquement significative (Impossible de rejeter H0)

La p-value de 0,318 suggère que les pentes des droites de régression du principe actif seul et du placebo chargé sont statistiquement équivalentes.

Test de comparaison des ordonnées à l'origine

Test t à 2 échantillons et limites de confiance

Méthode

μ_1 : moyenne de l'échantillon 1

μ_2 : moyenne de l'échantillon 2

Différence : $\mu_1 - \mu_2$

Statistiques descriptives

Echantillon	N	Moyenne	EcTyp	ErT moyenne
Echantillon 1	39	-0,00937	0,00664	0,0011
Echantillon 2	9	-0,0185	0,0220	0,0073

Test

Hypothèse nulle $H_0 : \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hypothèse alternative $H_1 : \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valeur de T	DL	Valeur de P
1,23	8	0,253

Avec une p-value de 0,253, qui est supérieure à 0,05, il est suggéré que les constantes (ordonnées à l'origine) des droites de régression entre le principe actif seul et le placebo chargé sont statistiquement similaires.

Par conséquent, il est possible de conclure qu'il n'y a pas de biais systématique notable dans la méthode de dosage.

La méthode de dosage des substances apparentées démontre une linéarité dans l'intervalle de mesure 0,1%-0,5%

3.4. Limite inférieure de l'intervalle

Les valeurs du rapport signal/bruit (S/N) du pic d'OXO dans l'échantillon SS 0,1% (la limite d'exclusion), calculé sur les trois jours de validation, étaient successivement de 18,06, 24,48 et 29,36 (Tableau 81).

Tableau 81. Rapport S/N de la solution SS 0,1%

Jours	Rapport S/N
Jour 1	18,06
Jour 2	24,48
Jour 3	29,36

Le rapport signal/bruit (S/N) a été déterminé à l'aide du logiciel LabSolution de l'HPLC selon la formule de la Ph Eur.

Au cours des trois jours de validation, le rapport signal/bruit (S/N) d'un échantillon à une concentration correspondante à la limite d'exclusion était toujours supérieur à 10.

En conclusion, la méthode de dosage des substances apparentées se révèle également être sensible pour la quantification des impuretés dont la teneur est égale ou supérieure à la limite d'exclusion.

3.5. Profil d'exactitude

Calcul des réponses alignées

Les réponses alignées sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 82. Réponses alignées

Niveau C %	C théorique	Jour1	Jour2	Jour3
50	0,1	8,72106367	9,06294039	8,84859192
50	0,1	8,36542866	8,86686744	9,4411479
50	0,1	8,52873341	8,77821086	8,62859192
100	0,2	14,8649127	17,0488035	18,686245
100	0,2	16,0417679	16,6582998	20,1529672
100	0,2	15,1405612	16,5808602	18,2663073
200	0,4	32,0214377	31,6056351	34,9702537
200	0,4	32,7066488	32,2268616	35,0914031
200	0,4	33,2340225	32,4064943	34,3873465
250	0,5	40,9825961	39,3964915	43,2403248
250	0,5	40,9674506	40,1510866	41,0554708
250	0,5	37,3783412	40,2191403	42,2998548

Calcul des prédictions inverses

Les prédictions inverses sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 83. Prédictions inverses en utilisant le modèle $Y = k_{0,2} X$

Niveau C %	C théorique	Jour1	Jour2	Jour3
50	0,1	0,107591915	0,107272363	0,096839546
50	0,1	0,103204439	0,10495157	0,103324515
50	0,1	0,105219133	0,103902198	0,094431852
100	0,2	0,183388687	0,201796036	0,204503439
100	0,2	0,19790757	0,197173888	0,220555339
100	0,2	0,186789367	0,196257284	0,199907614
200	0,4	0,395049035	0,374096157	0,382716653
200	0,4	0,403502496	0,381449227	0,38404252
200	0,4	0,410008716	0,383575427	0,376337279
250	0,5	0,505603003	0,466311658	0,47322483
250	0,5	0,505416153	0,475243328	0,449313651
250	0,5	0,461137247	0,476048837	0,462932267

Calcul des critères de validation

L'estimation de la justesse, de la fidélité et de l'erreur totale de la méthode s'effectue avec les concentrations calculées provenant des séries de validation pour chaque niveau de concentration.

Tableau 84. Critères de validations en utilisant le modèle $Y = k_{0,2}X$

C Théorique	0,10%	0,20%	0,40%	0,50%
Moyenne	0,105338496	0,18936187	0,40285342	0,4907188
Variance	4,82317E-06	5,7663E-05	5,6264E-05	0,00065631
Moyenne générale	0,102970837	0,19869769	0,38786417	0,47502566
Variance générale	2,00487E-05	0,00011345	0,0001512	0,00036738
MSM	5,12423E-05	0,00026981	0,00050684	0,00064016
MSE	9,65087E-06	6,1332E-05	3,2659E-05	0,00027646
Biais absolu	0,002970837	-0,00130231	-0,01213583	-0,02497434
Biais relatif (%)	2,970836808	-0,65115422	-3,03395808	-4,99486725
Recouvrement (%)	102,9708368	99,3488458	96,9660419	95,0051327
Var intra	9,65087E-06	6,1332E-05	3,2659E-05	0,00027646
Var inter	1,38638E-05	6,9491E-05	0,00015806	0,00012123
Var fidélité	2,35147E-05	0,00013082	0,00019072	0,00039769
CV répétabilité	3,016955505	3,94139639	1,47339366	3,50023753
CV fidélité	4,709286913	5,75638107	3,56055733	4,19813866
R	1,436534084	1,13303923	4,83980539	0,43852867
B	0,67741569	0,69633244	0,61342504	0,78818616
ddl	3,619299314	3,95915681	2,53466703	5,56341336
t-Student	1,637744354	1,63774435	1,88561808	1,47588405
Min	-5,624930089	-11,1031325	-10,6750179	-11,7221413
Max	11,56660371	9,80082401	4,60710175	1,73240682
Erreur totale	7,680123721	6,40753529	6,59451541	9,19300591

Profils d'exactitude

La limite d'acceptation est fixée à ± 15% comme en milieu biologique. Les résultats du profil d'exactitude sont présentés dans le Tableau 85.

Tableau 88. Profils d'exactitude en utilisant le modèle $Y = k_{0,2}X$

C théorique	Niveau C %	Limite d'Acceptation Inférieure	Limite inférieure	Biais %	Limite supérieure	Limite d'Acceptation supérieure
0,1	50	-15	-5,62493009	2,97083681	11,5666037	15
0,2	100	-15	-11,1031325	-0,65115422	9,80082401	15
0,4	200	-15	-10,6750179	-3,03395808	4,60710175	15
0,5	250	-15	-11,7221413	-4,99486725	1,73240682	15

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes des limites supérieures entre elles et d'autre part les bornes des limites inférieures entre elles.

Le profil d'exactitude est présenté dans la figure suivante.

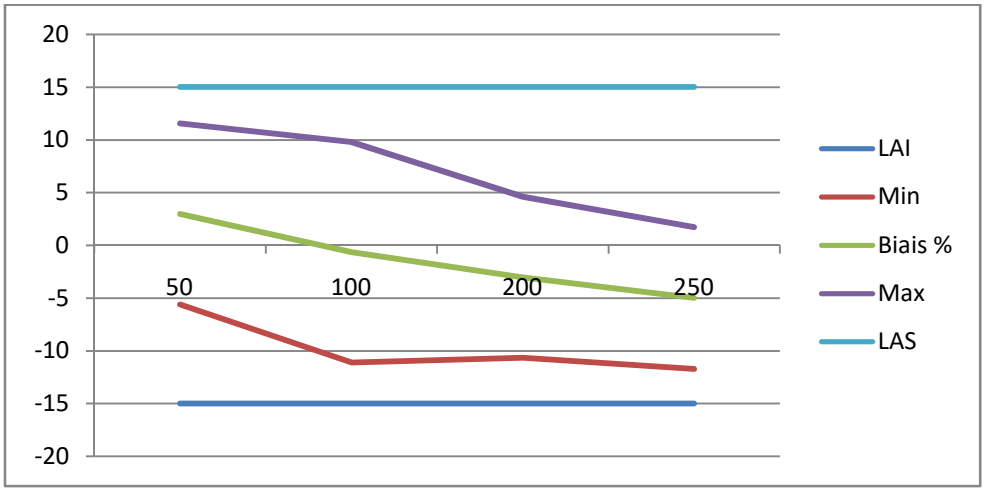


Figure 90. Profils d'exactitude en utilisant le modèle $Y = k_{0,2}X$

Limites de quantification basses (LLOQ) et hautes (ULOQ)

L'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation (-15 ; +15) définissent les limites de quantification basse (LLOQ) et haute (ULOQ) de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie.

Pour ce modèle $Y = k_{0,2}X$, les limites de quantification basse (LLOQ) et haute (ULOQ) sont respectivement de l'ordre de 0,1% et 0,5%

3.6. Justesse

Les résultats d'analyse exprimés en IR, des 4 niveaux de concentrations, sont résumés dans le Tableau 86.

Tableau 86. Résultats de la justesse

Niveau de Concentration	Jours	Répétition	IR en %
SS 0,1%	J1	ESSAI 1	107,03
		ESSAI 2	102,74
		ESSAI 3	104,40
	J2	ESSAI 1	106,71
		ESSAI 2	104,54
		ESSAI 3	103,41
	J3	ESSAI 1	97,06
		ESSAI 2	103,27
		ESSAI 3	94,82
SS 0,2%	J1	ESSAI 1	92,22
		ESSAI 2	99,04
		ESSAI 3	93,89
	J2	ESSAI 1	100,83
		ESSAI 2	98,69
		ESSAI 3	98,30
	J3	ESSAI 1	102,09
		ESSAI 2	109,48
		ESSAI 3	99,96
SS 0,4%	J1	ESSAI 1	98,88
		ESSAI 2	100,80
		ESSAI 3	102,27
	J2	ESSAI 1	94,11
		ESSAI 2	96,06
		ESSAI 3	96,29
	J3	ESSAI 1	96,03
		ESSAI 2	96,33
		ESSAI 3	94,56
SS 0,5%	J1	ESSAI 1	101,02
		ESSAI 2	100,98
		ESSAI 3	92,95
	J2	ESSAI 1	93,87
		ESSAI 2	95,51
		ESSAI 3	95,62
	J3	ESSAI 1	95,10
		ESSAI 2	90,66
		ESSAI 3	93,17

Les résultats du test de l'égalité des variances de l'indice de recouvrement en fonction du niveau de concentration sont les suivants :

Test de l'égalité des variances : IR en % en fonction du Niveau de Concentration

Méthode

Hypothèse nulle	Toutes les variances sont égales
Hypothèse alternative	Au moins une variance est différente
Seuil de signification	α = 0,05

Intervalles de confiance de Bonferroni à 95 % pour les écarts types

Niveau de Concentration	N	EcTyp	IC
SS 0,1%	9	4,11971	(2,52121; 9,7305)
SS 0,2%	9	4,93844	(3,02227; 11,6642)
SS 0,4%	9	2,78698	(1,70560; 6,5826)
SS 0,5%	9	3,51125	(2,14885; 8,2933)

Niveau de confiance individuel = 98,75 %

Tests

Méthode	Statistique du test	Valeur de P
Bartlett	2,59	0,459

Une valeur de P de 0,459, supérieure à 0,05, indique que les variances des IR dans les 4 niveaux de concentration sont égales.

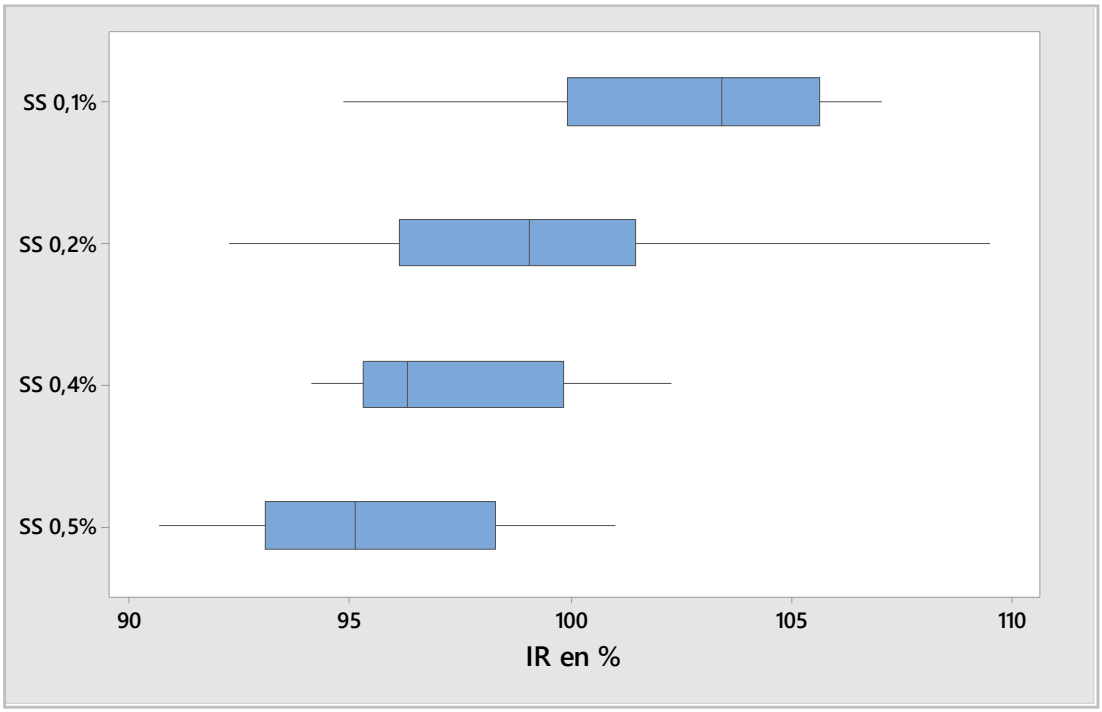


Figure 91. Boîte à moustaches des IR en % et niveau de concentration

Les résultats du test de l'égalité des moyennes de l'indice de recouvrement en fonction du niveau de concentration sont les suivants :

ANOVA à un facteur contrôlé : IR en % en fonction de Niveau de Concentration

Méthode

Hypothèse nulle	Toutes les moyennes sont égales
Hypothèse alternative	Toutes les moyennes ne sont pas égales
Seuil de signification	α = 0,05

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Niveau de Concentration	4	SS 0,1%; SS 0,2%; SS 0,4%; SS 0,5%

Analyse de variance

Source	DL	Contribution	Valeur F	Valeur de p
Niveau de Concentration	3	34,64%	5,65	0,003
Erreur	32	65,36%		
Total	35	100,00%		

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Niveau de Concentration	N	Moyenne	Groupement	
SS 0,1%	9	102,67	A	
SS 0,2%	9	99,39	A	B
SS 0,4%	9	97,258		B
SS 0,5%	9	95,43		B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

La valeur de p de 0,003, inférieure à 0,05, indique une différence significative entre les moyennes de l'Indice de Recouvrement (IR) dans les quatre niveaux de concentration.

Une analyse post-hoc de Tukey a été réalisée pour comparer les niveaux de concentration deux à deux. Les résultats révèlent la formation de deux groupes distincts en termes d'IR homogènes : les niveaux 0,1% et 0,2% appartiennent à un groupe, tandis que les niveaux 0,2%, 0,4%, et 0,5% forment un autre groupe ayant des IR différents.

Par conséquent, il est important d'interpréter avec précaution la signification de l'IR moyen.

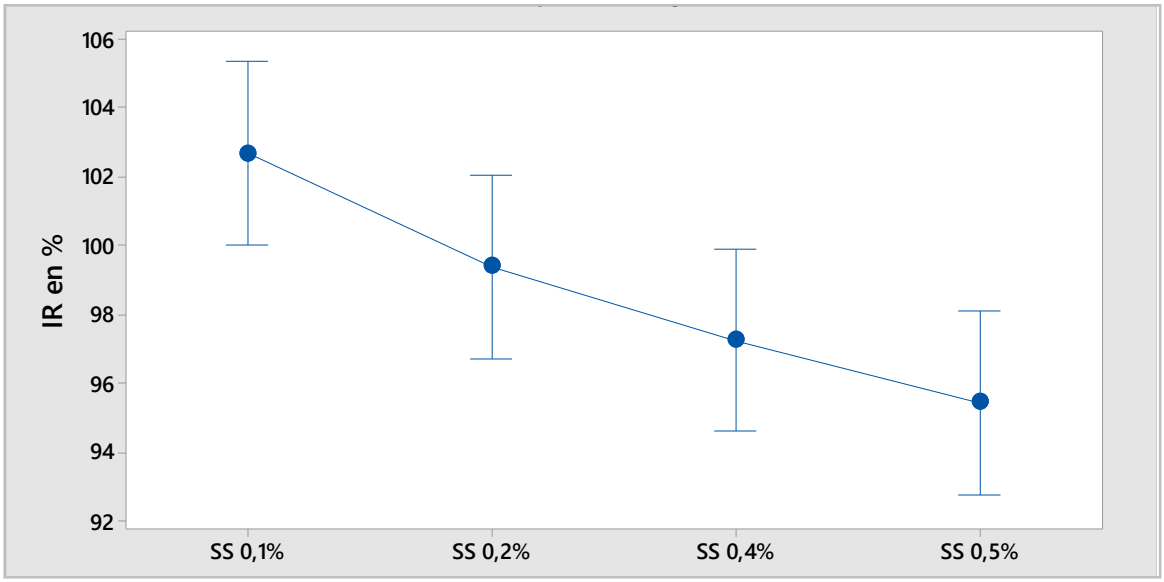


Figure 92. Graphique des intervalles des IR en % et niveau de concentration

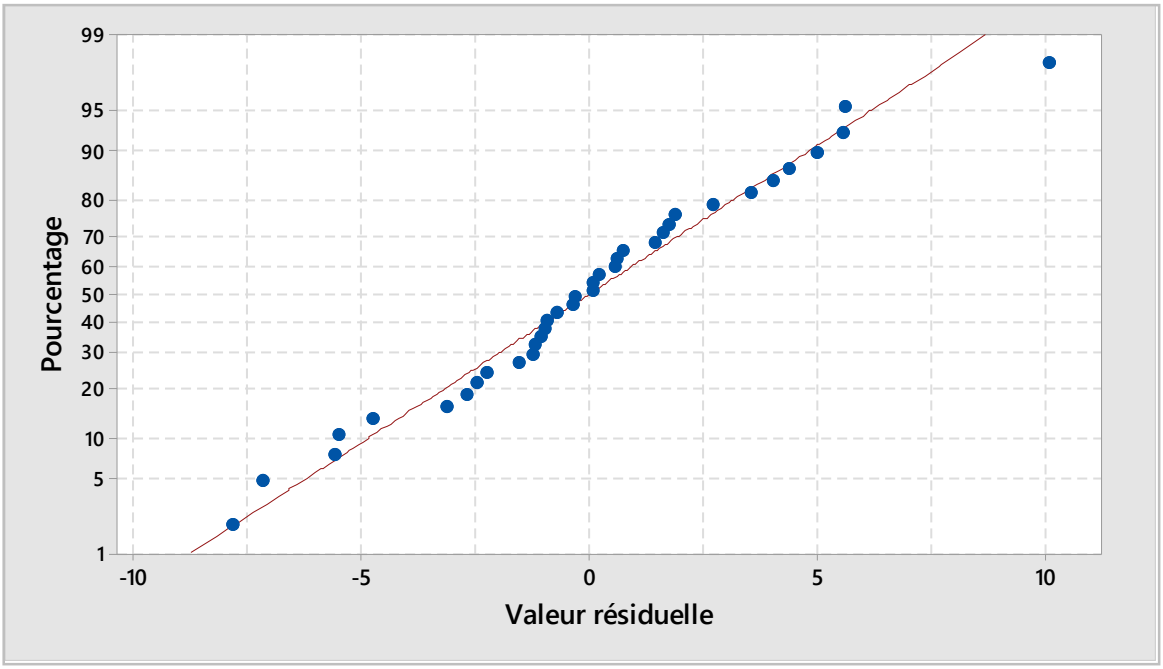


Figure 95. Droite de Henry (réponse : IR en %)

Calcul de l'IR par niveau de concentration et IRM

Les résultats de calcul des IR par niveau de concentration et IR moyen (IRM) sont présentés dans le Tableau 87.

Tableau 87. Résultats des IR

Niveau de Concentration	N	IR par Niveau de Concentration
SS 0,1%	9	102,67 %
SS 0,2%	9	99,39 %
SS 0,4%	9	97,26 %
SS 0,5%	9	95,43 %
	IRM	**98,69 %**

D'après Michael W. Dong et al [98], un Indice de recouvrement (IR) moyen par niveau de concentration entre 70,0 % et 130,0 % est considéré acceptable pour un intervalle entre la limite d'exclusion et deux fois la limite d'exclusion (0,1% à 0,2% dans notre cas). De manière similaire, pour un intervalle entre deux fois la limite d'exclusion et cinq fois la limite d'exclusion (0,2% à 0,5% dans notre cas), un IR moyen par niveau de concentration entre 80,0 % et 120,0% est jugé acceptable.

Conformément aux recommandations de Rosario LoBrutto et Tarun Patel (6), pour les niveaux de concentration inférieurs à 0,2%, un indice de recouvrement IR de 70 à 130% est conseillé, tandis que pour les niveaux de 0,2% à moins de 0,5%, un indice de recouvrement IR de 80 à 120% est recommandé.

Les résultats des Indices de Recouvrement (IR) respectent les critères d'acceptation précédemment définis. La méthode de dosage des substances apparentées demeure juste dans l'intervalle de mesure spécifiée.

3.7. Fidélité

Les résultats analytiques utilisés pour évaluer la fidélité de la méthode sont synthétisés dans le Tableau 88.

Tableau 88. Résultats de la fidélité

Niveau de Concentration	Répétition	IR (jour 1)	IR (jour 2)	IR (jour 3)
SS 0,1%	ESSAI 1	107,03	106,71	97,06
	ESSAI 2	102,74	104,54	103,27
	ESSAI 3	104,40	103,41	94,82
SS 0,2%	ESSAI 1	92,22	100,83	102,09
	ESSAI 2	99,04	98,69	109,48
	ESSAI 3	93,89	98,30	99,96
SS 0,4%	ESSAI 1	98,88	94,11	96,03
	ESSAI 2	100,80	96,06	96,33
	ESSAI 3	102,27	96,29	94,56
SS 0,5%	ESSAI 1	101,02	93,87	95,10
	ESSAI 2	100,98	95,51	90,66
	ESSAI 3	92,95	95,62	93,17

Test de l'égalité des variances : IR en % en fonction de JOURS

Méthode

Hypothèse nulle	Toutes les variances sont égales
Hypothèse alternative	Au moins une variance est différente
Seuil de signification	α = 0,05

La méthode de Bartlett est utilisée. Elle est exacte uniquement pour les données normales.

Tests

Méthode	Statistique du test	Valeur de P
Bartlett	0,46	0,927

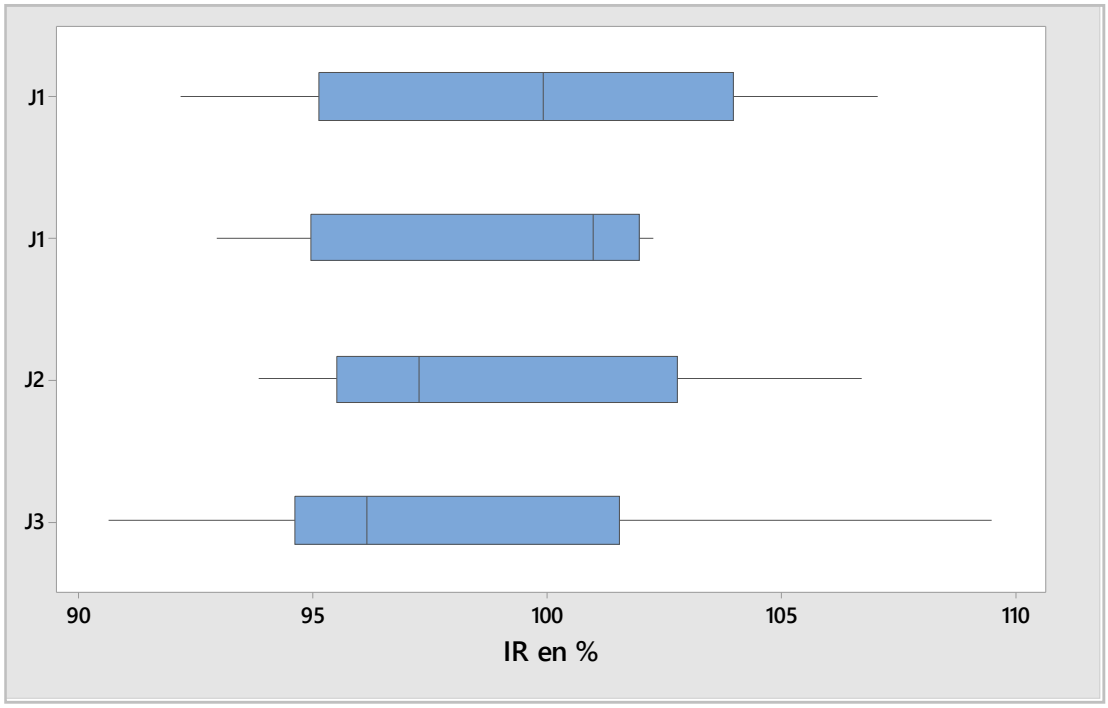


Figure 94. Boîte à moustaches des IR en % et Jours

Une valeur de P de 0,459, supérieure à 0,05, indique que la variance des IR dans les 4 niveaux de concentration est égale.

Composantes de la variance

Méthode

Estimation de la variance Maximum de vraisemblance restreinte

Informations sur les facteurs

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs
JRS	Aléatoire	4	J1; J1; J2; J3

Composantes de la variance

Source	Variance	% du total
Variance inter-jour	0,000000	0,00%
Variance intra-jour (Répétabilité)	21,492470	100,00%
Total (Fidélité intermédiaire)	21,492470	

La variance inter-jour est forcé à une valeur nulle parce que le MSE s'avère être supérieur au MSM, indiquant une prépondérance de la variabilité intra-jour par rapport à la variabilité inter-jour.

Cette démarche vise à obtenir une évaluation plus précise des sources de variation. Il est intéressant de souligner que cette manipulation conduit à l'égalisation de la variance de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire.

Sachant que la moyenne des IR est de 98,69, le coefficient de variation RSD de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire sera égal à 4,70%.

D'après Michael W. Dong et al [98], un RSD inférieur à 15% est considéré acceptable pour un intervalle de mesure entre la limite d'exclusion et deux fois la limite d'exclusion (0,1% à 0,2% dans notre cas). De manière similaire, pour un intervalle entre deux fois la limite d'exclusion et cinq fois la limite d'exclusion (0,2% à 0,5% dans notre cas), un RSD inférieur à 10% est jugé acceptable.

Conformément aux recommandations de Rosario LoBrutto et Tarun Patel (6), pour les niveaux de concentration de 0,2% à 0,5%, un RSD de répétabilité inférieur à 10% est conseillé, tandis qu'un RSD de fidélité intermédiaire inférieur à 15% est recommandé.

Selon JFDA (5), pour un intervalle inférieure à 0.1%, un RSD ≤ 20% et pour un intervalle entre 0.1% et 1.0%, un RSD ≤ 10% est préconisé.

Les résultats du coefficient de variation respectent les critères d'acceptation précédemment définis. La méthode de dosage des substances apparentées demeure fidèle dans l'intervalle de mesure spécifié.

3.8. Stabilité des solutions

Au premier jour, l'aire de l'OXO dans le standard ST 0,2%, injecté le 18 octobre 2023 à 21h 51min, était de 22,127. L'aire de l'OXO dans la même solution, injectée le 19 octobre 2023 à 09h 03min, était de 23,607 (Tableau 89), ce qui correspond à une diminution de 6,3% sur une période de 11 heures.

Tableau 89. Stabilité du ST 0,2%, jour 1

ID#2 Compound Name: OXO

Title	Ret. Time	Area	Year Acquired	Month Acquired	Day Acquired	Hour Acquired	Minute Acquired
ST0.2REP2D1.lcd	16,720	22127	23	Oct	18	21	51
ST0.2REP5D1.lcd	16,795	23607	23	Oct	19	09	03

Au deuxième jour, l'aire de l'OXO dans le standard ST 0,2%, injecté le 19 octobre 2023 à 20h 44min, était de 23,452. L'aire de l'OXO dans la même solution, injectée le 20 octobre 2023 à 07h 55min, était de 22,309 (Tableau 90), ce qui correspond à une augmentation de 5,1% sur une période de 11 heures.

Tableau 90. Stabilité du ST 0,2%, jour 2

ID#2 Compound Name: OXO

Title	Ret. Time	Area	Year Acquired	Month Acquired	Day Acquired	Hour Acquired	Minute Acquired
ST0.2REP2D2.lcd	16,688	23452	23	Oct	19	20	44
ST0.2REP5D2.lcd	16,741	22309	23	Oct	20	07	55

Au troisième jour, l'aire de l'OXO dans le standard ST 0,2%, injecté le 26 octobre 2023 à 22h 04min, était de 19,651. L'aire de l'OXO dans la même solution, injectée le 27 octobre 2023 à 11h 24min, était de 19,974 (Tableau 91), ce qui correspond à une diminution de 1,6% sur une période de 13 heures.

Tableau 91. Stabilité du ST 0,2%, jour 3

ID#1 Compound Name: OXO

Title	Ret. Time	Area	Year Acquired	Month Acquired	Day Acquired	Hour Acquired	Minute Acquired
ST0.2REP2D3.lcd	15,493	19651	23	Oct	26	22	04
ST0.2REP4D3.lcd	15,472	19974	23	Oct	27	11	24

Les résultats de stabilité du standard à 0,2% sur les 3 jours montrent une variation de moins de 10% [99] sur une période minimale de 11 heures.

Ce résultat était très prévisible vu la stabilité intrinsèque de la substance active envers les divers stress (thermique, hydrolytique, oxydatif et photolytique) prouvée lors de l'étude de dégradation forcée.

3.9. Optimisation des critères de conformité du système

Vu les résultats satisfaisants de la validation, les critères de conformité du système ont été révisés pour les affiner davantage.

3.9.1. Répétabilité

Selon Michael W. Dong, les critères d'acceptation typiques pour la répétabilité du système au niveau de la limite de quantification (QL) sont un RSD ≤ 10 % pour six injections avec un rapport signal/bruit (S/N) ≥ 10 [100]. Conformément à la recommandation de Hsu et Chien, la répétabilité de la réponse du pic pour les traces est un RSD entre 5 et 15 %. [101]

En analysant les résultats de la répétabilité du système sur les 3 jours de validation (4,75 %, 2,80 %, 2,14 %), nous avons établi un seuil maximum de 5 % pour la répétabilité.

En conclusion, la limite pour la répétabilité de la méthode de dosage des substances apparentées proposée est fixée comme suit : un maximum de 5,0 % pour l'écart type relatif RSD de la surface du pic dû à l'OXO déterminé sur un minimum de 3 injections de la solution standard à 0,2 %.

3.9.2. Résolution

Les critères d'acceptation pour la résolution sont définis à deux niveaux :

- Pour la solution échantillon : la résolution critique entre OXO et PP doit être supérieure à 2 [62].
- Pour la solution standard : la résolution entre PDO et OXO est définie par la borne inférieure d'un intervalle de confiance à 95 % sur les résolutions entre PDO et OXO sur les 3 jours de validation.

Le jour 1, les valeurs de résolution entre les pics PDO et OXO dans les 4 chromatogrammes de la solution standard 0,2 % étaient les suivantes : 23,402, 23,308, 24,321 et 23,255 (Figure 82). La moyenne de résolution était de 23,572 avec un RSD de 2,14 %.
Le jour 2, les valeurs de résolution entre les pics PDO et OXO dans les 4 chromatogrammes de la solution standard 0,2 % étaient les suivantes : 23,286, 23,455, 23,021 et 23,369 (Figure 83). La moyenne de résolution était de 23,283 avec un RSD de 0,81 %.

Le jour 3, les valeurs de résolution entre les pics PDO et OXO dans les 3 chromatogrammes de la solution standard 0,2 % étaient les suivantes : 21,260, 21,218 et 21,140 (Figure 84). La moyenne de résolution était de 21,206 avec un RSD de 0,29 %.

Pour établir un critère d'acceptation pour cet attribut, un intervalle de confiance à 95 % a été calculé par MINITAB 18. Le résultat était le suivant :

Test T à 1 échantillon : R

N	Moyenne	EcTyp	ErT moyenne	IC à 95% pour μ
3	22,687	1,291	0,745	(19; 26)

μ: moyenne de R

La valeur vraie et arrondie de la résolution se trouve à 95 % de confiance dans l'intervalle entre 19 et 26.

En conclusion, la limite de résolution dans la méthode de dosage des substances apparentées proposée est fixée comme suit :

- Au minimum 2,0 entre les pics OXO et PP dans le chromatogramme de la solution échantillon.
- Au minimum 19,0 entre les pics PDO et OXO dans le chromatogramme de la solution standard.

3.9.3. Rapport signal/bruit

Dans cette phase de validation, la sensibilité de la méthode a été vérifiée en utilisant les placebos chargés à la limite d'exclusion : SS 0,1% des trois jours de la validation.

Afin de confirmer cette sensibilité dans l'analyse de routine, une solution de sensibilité à 0,1% sera préparée en diluant de moitié la solution standard à 0,2%.

Le critère de conformité du système concernant la sensibilité de la méthode sera formulé de la manière suivante : Rapport signal/bruit (S/N) : Au moins 10 pour le pic dû à l'oxo dans le chromatogramme obtenu avec la solution de sensibilité.

3.9.4. Facteur de symétrie

Le facteur de symétrie du pic dû à l'OXO dans le chromatogramme de la solution standard est compris entre 0,8 et 1,8.

4. Conclusion

La méthode de dosage des substances apparentées dans le produit fini a été optimisée et soumise à une validation complète, adoptant deux approches : celle définie par les directives ICH Q2R1 et l'approche basée sur le profil d'exactitude.

Les résultats complets de cette validation sont consignés de manière synthétique dans le Tableau 92.

Tableau 92. Résultats de la validation

Critères à valider	Résultats	Spécifications
Spécificité	Absence d'interférence des excipients et des impuretés	Conforme
Linéarité de la fonction de réponse sur le principe actif seul	- R^2 = 0,9835 - R= 0,9917 - Pente ≠ 0 - Ordonnée à l'origine= 0	- R ≥ 0,990 [99] - R ≥ 0,98 [98]
Linéarité de la fonction de réponse sur le placébo chargé	- R^2 = 0,9887 - R = 0,9943 - Pente ≠ 0 - Ordonnée à l'origine= 0	- R ≥ 0,990 [99] - R ≥ 0,98 [98]
Limite inférieure de l'intervalle	- S/N = 18,06 au J1 - S/N = 24,48 au J2 - S/N = 29,36 au J3	- S/N ≥ 10 [1,58]
Justesse	- IRM =98,69 % - A 0,1%, IR=102,67 % - A 0,2%, IR=99,39 % - A 0,4%, IR=97,26 % - A 0,5%, IR=95,43 %	- Niveau < 0,2 %, IRM : 70–130 % [99] - Niveau 0,2 - 0,5 %, IRM : 80–120 % [99] - 0,1 ≤ y < 0,2, IR par niveau de concentration : 70.0 % –130.0 % [98] - 0,2 ≤ y < 0,5, IR par niveau de concentration : 80.0 % –120.0 % [98]
Répétabilité	- RSD =4,70 %	- Niveau 0,1 à <0,2 %, RSD ≤ 20 % [99] - Niveau 0,2 à <0,5 %, RSD ≤ 10 % [99] - 0,1 ≤ y < 0,2, RSD : 15,0% [98] - 0,2 ≤ y < 0,5, RSD : 10,0% [98]
Fidélité intermédiaire	- RSD =4,70 %	-Niveau 0,1 à <0,2 %, RSD ≤ 30 % [99] -Niveau 0,2 à <0,5 %, RSD ≤ 15 % [99]
Profile d'exactitude	-Niveau 0,1% :(-5,6, 11,6) -Niveau 0,2% : (-11,1, 9,8) -Niveau 0,4% : (-10,7, 4,6) -Niveau 0,5% : (-11,7, 1,7)	(-15,0, 15,0) [60]

II. Validation de la méthode de dosage des impuretés

La validation de la méthode de dosage des substances apparentées dans le sirop d'OXO a produit des résultats jugés conformes aux normes et standards internationalement reconnus.

Après l'ajout du système de conformité et de la solution de sensibilité, les détails de la méthode de dosage sont résumés dans le Tableau 93.

Tableau 93. Méthode validée du dosage des impuretés

<table>
<tr><td>Solution Echantillon (0,111 mg/ml)</td><td>Diluer 3 ml de l’échantillon à 10 ml avec la solution B.
Filtrer avec filtre seringue en nylon de 0,2 µm</td></tr>
<tr><td>Solution Standard (0,22 µg/ml)</td><td>Dissoudre 11 mg d'OXO et 11 mg de PDO dans 5 ml d'acétonitrile, puis ajuster le volume à 100 ml avec la solution B.
Diluer 5 ml de la solution précédente à 100 ml avec la solution B.
Diluer 2 ml la solution précédente à 50 ml avec la solution B.
Filtrer avec filtre seringue en nylon de 0,2 µm.</td></tr>
<tr><td>Solution de sensibilité (0,11 µg/ml)</td><td>Diluer au moitie la solution standard avec la solution B
Filtrer avec filtre seringue de 0,2 µm.</td></tr>
<tr><td>Tampon</td><td>Dissoudre 5,44 gr de dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 et 1,5 ml de Triéthylamine TEA dans 900 ml d’eau ultra-pure, régler le pH à 6,80 avec une solution de potassium hydroxyde KOH et ajuster le niveau à 1000 ml avec l’eau ultra-pure.</td></tr>
<tr><td>Solution A</td><td>Méthanol</td></tr>
<tr><td>Solution B</td><td>30% méthanol et 70% tampon</td></tr>
<tr><td>Phase mobile</td><td>Mode gradient
<table>
<tr><th>Temps min</th><th>Solution A %</th><th>Solution B %</th></tr>
<tr><td>0</td><td>7</td><td>93</td></tr>
<tr><td>23</td><td>36</td><td>64</td></tr>
<tr><td>28</td><td>36</td><td>64</td></tr>
<tr><td>29</td><td>7</td><td>93</td></tr>
<tr><td>34</td><td>7</td><td>93</td></tr>
</table>
</td></tr>
</table>

Tableau 93- bis. Méthode validée du dosage des impuretés

Colonne	**Dimensions**	▪ Longueur L = 10 cm ▪ Diamètre Ø = 4,6 mm
	Phase stationnaire	▪ Gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie (3,5 µm) ▪ Taille des pores = 100 Å
	Fabricant	▪ Waters Symmetry C18
Température	40°C	
Débit	1,0 ml/mn	
Détection	DAD à 224nm	
Volume d'injection	20µl	
Conformité du système	– Répétabilité : Au maximum 5,0 pourcent pour l'écart type relatif RSD de la surface du pic dû à l'OXO déterminé sur un minimum de 3 injections de la solution standard – Résolution : Au minimum 19,0 entre les pics dus à la PDO et à l'OXO dans le chromatogramme de la solution standard. Au minimum 2,0 entre les pics OXO et PP dans le chromatogramme de la solution échantillon. – Facteur de symétrie du pic dû à l'OXO dans le chromatogramme de la solution standard est compris entre 0,8 et 1,8. – Rapport signal/bruit (S/N) : Au minimum 10 pour le pic dû à l'oxo dans le chromatogramme obtenu avec la solution de sensibilité	

CHAPITRE 4. ETUDE DE LA STABILITE POST-APPROBATION

1. Introduction

Le développement et la validation de la méthode de dosage des impuretés dans le sirop d'OXO s'inscrivent dans une stratégie de mise à niveau technique conforme aux directives de l'ICH Q3B(R2). Il s'agit d'une modification apportée à un produit pharmaceutique après l'obtention de l'approbation réglementaire initiale. En parallèle à ce changement de méthode analytique, des ajustements ont été effectués aux spécifications du produit fini.

Cette modification représente une amélioration significative de la qualité, ce qui a conduit à une décision d'implémentation immédiate. L'impact de ce changement sur les études de stabilité a été évalué afin de garantir la conformité continue du produit. La nouvelle méthode a été appliquée aux échantillons de stabilité en cours et à ceux de l'échantillothèque.

Les objectifs de cette étude de stabilité rétrospective sont multiples. Tout d'abord, elle vise à comparer les résultats de l'étude de dégradation forcée avec ceux de l'étude de stabilité post-approbation. Ensuite, elle cherche à évaluer les conclusions de l'étude de dégradation forcée, qui stipule l'absence de toute impureté spécifique. Enfin, elle a pour but d'établir de nouvelles spécifications en fonction des données recueillies et des exigences réglementaires.

2. Matériels et méthodes

2.1. Collecte des échantillons

Onze échantillons de sirop OXO ont été collectés et codifiés par la lettre "S", suivie de la durée de vie exprimée en mois. La durée de vie a été calculée en soustrayant la date de fabrication du produit fini de la date d'analyse, comme indiqué dans le tableau X.

2.2. Préparation des solutions

Solution tampon pH 6,8

5,44 gr de dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 et 1,5 ml de Triéthylamine TEA ont été dissoutes dans 900 ml d'eau ultra-pure, le pH a été ajusté à 6,80 avec une solution de potassium hydroxyde KOH et le volume a été ajusté à 1000 ml avec l'eau ultra-pure.

Solution B

La solution B a été préparée en mélangeant 30% méthanol et 70% tampon

Solutions échantillons

3 ml de chaque échantillon collecté a été dilué à 10 ml avec la solution B, puis filtré avec filtre seringue en nylon de 0,2 µm

Solution Standard (0,22 µg/ml)

11 mg d'OXO et 11 mg de PDO ont été dissoutes dans 5 ml d'acétonitrile, puis le volume a été ajusté à 100 ml avec la solution B. 5 ml de la solution précédente a été dilué à 100 ml avec la solution B. 2 ml la solution précédente a été diluer à 50 ml avec la solution B, Pius Filtré avec filtre seringue en nylon de 0,2 µm

Solution du test de sensibilité (0,11 µg/ml)

La solution standard a été dilué au moitie avec la solution B puis filtrée avec filtre seringue en nylon de 0,2 µm.

2.3. Analyse des échantillons

La solution de sensibilité (0,11 µg/ml), la Solution Standard (0,22 µg/ml) et les solutions échantillons ont été analysées selon cet ordre en utilisant la méthode optimisée et validée, détaillée dans Tableau 93.

Entre les injections des solutions échantillons, plusieurs injections du solvant de dilution, soit la solution B, ont été intercalées. Les pics apparus dans les chromatogrammes du solvant de dilution n'ont pas été considérés comme des impuretés dans notre produit fini.

2.4. Vérification de la conformité du système

Avant l'interprétation des résultats analytiques, les tests suivants de la conformité du système ont été vérifiés :

- Répétabilité : Au maximum 5,0 pourcent pour l'écart type relatif RSD de la surface du pic dû à l'OXO déterminé sur un minimum de 3 injections de la solution standard
- Résolution : Au minimum 19,0 entre les pics dus à la PDO et à l'OXO dans le chromatogramme de la solution standard.

  Au minimum 2,0 entre les pics OXO et PP dans le chromatogramme de la solution échantillon.

- Facteur de symétrie du pic dû à l'OXO dans le chromatogramme de la solution standard est compris entre 0,8 et 1,8.
- Rapport signal/bruit (S/N) : Au minimum 10 pour le pic dû à l'oxo dans le chromatogramme obtenu avec la solution de sensibilité

2.5. Dosage des impuretés

Les pics non identifiées ont été codées par l'acronyme RT suivi du temps de rétention.par exemple RT5 signifie un pic au temps de rétention 5 min

La limite d'exclusion a été établie à 0,1 % conformément au guide de l'ICH Q3B(R2). Cela signifie que les impuretés non spécifiques dont l'aire était inférieure à l'aire de l'oxo dans la solution de sensibilité n'étaient pas prises en compte.
Le dosage des impuretés non spécifiées, exprimé en pourcentage par rapport au dosage nominal de la substance active, a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ chaque impureté non spécifiée} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

- $\mathbf{r_U}$ **:** aire du pic de chaque impureté non spécifiée dans la solution échantillon
- $\mathbf{r_S}$: aire du pic de l'OXO dans la solution standard
- $\mathbf{C_S}$: Concentration de l'OXO dans la solution standard (µg/ml)
- $\mathbf{C_U}$: la concentration nominale de l'OXO dans la solution échantillon (µg/ml)

La concentration de l'OXO dans la solution standard (µg/ml) a été calculée en tenant compte du dosage et la perte à dessiccation.

2.6. Etablissement des spécifications réglementaires

La limite d'exclusion a été établie à 0,1 % conformément au guide de l'ICH Q3B(R2).

La spécification pour chaque impureté non spécifiée a été fixée à 0,2% correspondant à la limite d'identification conformément au guide de l'ICH Q3B (R2).

Pour l'établissement d'une spécification pour le total des impuretés, une analyse de tendance à été réalisée suivie d'une analyse statistique.

2.7. Etablissement des spécifications de libération

L'établissement des spécifications de libération a été fait en tenant compte de :

- La variabilité de la valeur estimée de l'attribut par la méthode analytique.
- Le taux de changement de l'attribut et l'incertitude liée à son estimation.

3. Résultats et discussion

Les durées de vie des 11 échantillons collectés sont résumées dans le Tableau 94 Il est essentiel de noter qu'au sein de ces 11 échantillons, deux d'entre eux (S40 et S46) ont dépassé la durée de vie enregistrée du médicament, fixée à 36 mois. Ces deux échantillons ont été inclus dans l'analyse, traités de manière équitable avec les autres, malgré leur dépassement de la durée de vie spécifiée.

Tableau 94. Durées de vie des échantillons de stabilité

Code échantillon	Date de Fabrication	Date Analyse	Durée de vie en mois
S3	août-23	4-nov.-23	3
S14	sept.-22	4-nov.-23	14
S16	juil.-22	4-nov.-23	16
S18	mai-22	4-nov.-23	18
S20	mars-22	4-nov.-23	20
S22	janv.-22	4-nov.-23	22
S23	déc.-21	4-nov.-23	23
S26	sept.-21	4-nov.-23	26
S30	mai-21	4-nov.-23	30
S40	juil.-20	4-nov.-23	40
S46	janv.-20	4-nov.-23	46

3.1. Résultats brutes

La Figure 95 représente les chromatogrammes des 11 échantillons collectés pour l'étude de stabilité post-approbation.

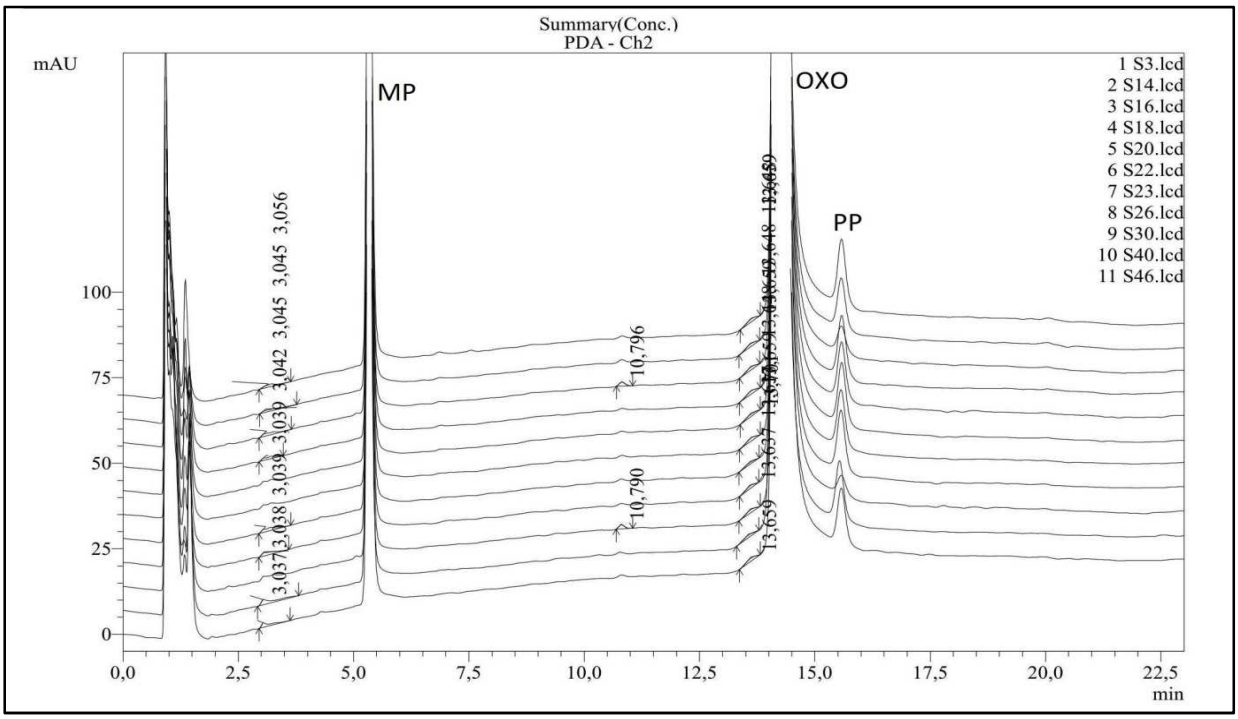


Figure 95. Chromatogrammes des échantillons de stabilité

Le Tableau 95 regroupe les résultats d'analyse de ces 11 échantillons.

Tableau 95. Données de rétention et aire des pics des échantillons de stabilité

S3.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	3,056	11541
2	13,659	12443

S14.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	3,045	11827
2	13,648	12484

S16.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	3,045	14309
2	10,796	9671
3	13,659	11915

S18.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	3,042	12074
2	13,659	13334

S20.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	13,701	10656

S22.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	13,648	13083

S23.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	3,039	16272
2	13,659	9182

S26.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	3,038	15913
2	13,637	11007

S30.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	10,790	9684
2	13,648	13355

S40.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	3,037	16550
2	13,637	12848

S46.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	3,039	15204
2	13,659	12935

3.2. Vérification de la conformité du système

Le système de conformité a été effectué en réalisant trois injections de la solution standard ST et deux injections de la solution de sensibilité CS (Figure 96).

- Répétabilité : L'écart type relatif (RSD) de la surface du pic dû à l'OXO, déterminé sur trois injections de la solution standard (ST1, ST2 et ST3), est de 4,45%.

Tableau 96. Répétabilité des injections ST 0,2% des analyses de l'étude de stabilité

	Aire
ST1	19013
ST2	19249
ST3	20629
MOYENNE	19630
ECART TYPE	873
RSD%	**4,45**

Cette valeur satisfait au critère d'acceptation, qui est au maximum de 5,0% pour l'écart type relatif RSD de la surface du pic a dû à l'OXO, déterminé sur un minimum de trois injections de la solution standard.

- La résolution entre les pics de la PDO et de l'OXO est supérieure à 21 dans les trois chromatogrammes de la solution standard (ST1, ST2 et ST3).

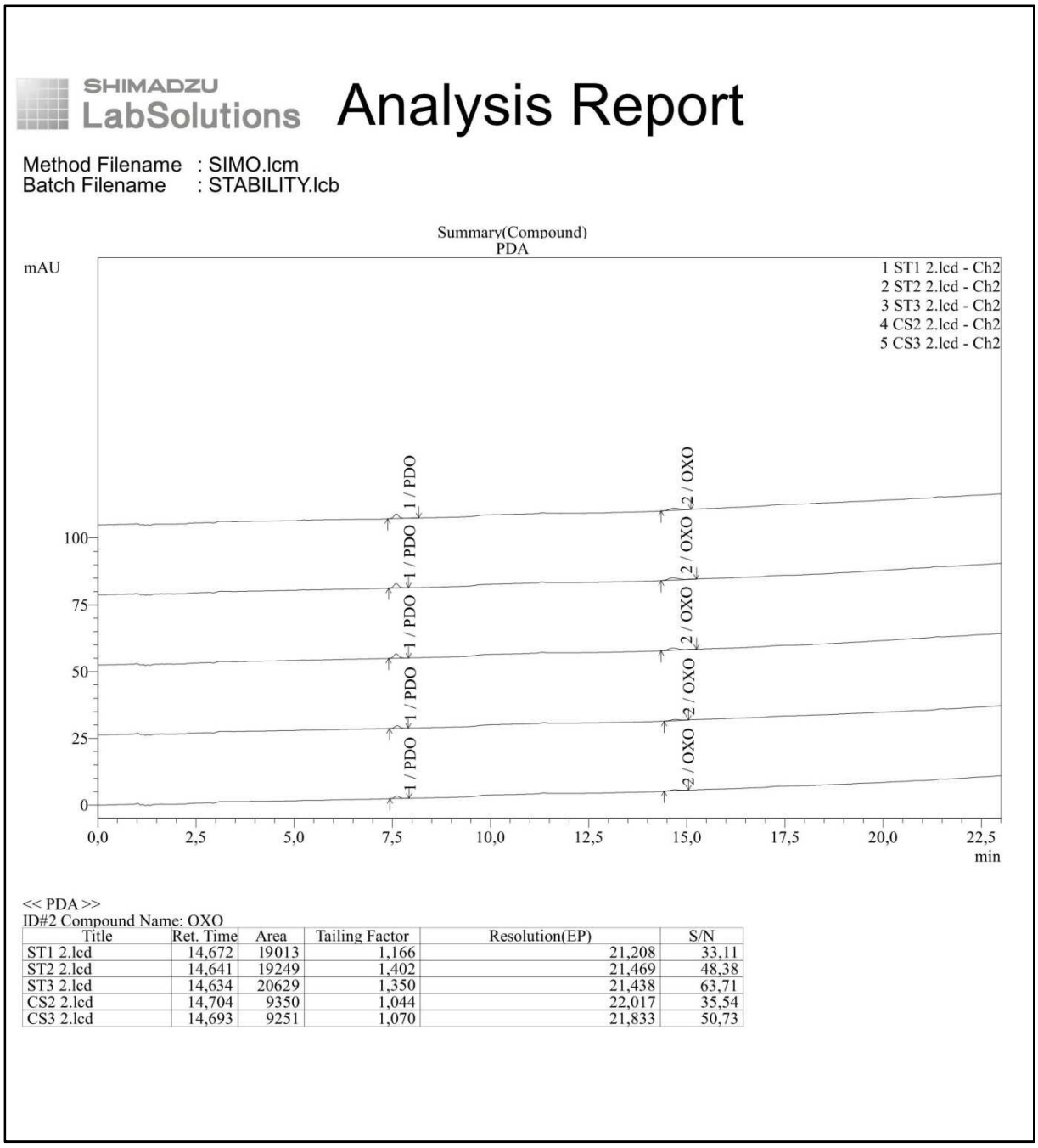
Cette valeur répond au critère d'acceptation, qui exige au moins 19,0 de résolution entre les pics de la PDO et de l'OXO dans le chromatogramme de la solution standard.

- Le facteur de symétrie du pic dû à l'OXO est de 1,166, 1,402 et 1,305 dans les trois chromatogrammes de la solution standard (ST1, ST2 et ST3).

Cette valeur répond au critère d'acceptation, qui spécifie que le facteur de symétrie du pic attribuable à l'OXO dans le chromatogramme de la solution standard doit être compris entre 0,8 et 1,8.

- Le rapport signal/bruit (S/N) est de 35,54 et 50,73 pour le pic attribuable à l'oxo dans les deux chromatogrammes obtenus avec la solution de sensibilité (CS1 et CS2).

Cette valeur satisfait au critère d'acceptation, qui stipule qu'un rapport signal/bruit (S/N) d'au moins 10 est nécessaire pour le pic attribuable à l'oxo dans le chromatogramme obtenu avec la solution de sensibilité.



<< PDA >>
ID#2 Compound Name: OXO

Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Resolution(EP)	S/N
ST1 2.lcd	14,672	19013	1,166	21,208	33,11
ST2 2.lcd	14,641	19249	1,402	21,469	48,38
ST3 2.lcd	14,634	20629	1,350	21,438	63,71
CS2 2.lcd	14,704	9350	1,044	22,017	35,54
CS3 2.lcd	14,693	9251	1,070	21,833	50,73

Figure 96. Conformité du système des analyses de l'étude de stabilité

3.3. Dosage des impuretés

Le Tableau 97 regroupe les éléments de calcul et les résultats des impuretés non spécifiées des 11 échantillons de stabilité.

Tableau 97. Dosage des impuretés dans les échantillons de stabilité

Echantillon de stabilité	Impureté non spécifiée	r_U	C_S (µg/ml)	r_S	C_U (µg/ml)	Impureté non spécifiée(%)
S3	RT3,0	11541	0,224	19630	111	0,12
	RT13,6	12443	0,224	19630	111	0,13
S14	RT3,0	11827	0,224	19630	111	0,12
	RT13,6	12484	0,224	19630	111	0,13
S16	RT3,0	14309	0,224	19630	111	0,15
	RT10,8	9671	0,224	19630	111	0,10
	RT13,6	11915	0,224	19630	111	0,12
S18	RT3,0	12074	0,224	19630	111	0,12
	RT13,6	13334	0,224	19630	111	0,14
S20	RT13,7	10656	0,224	19630	111	0,11
S22	RT13,6	13083	0,224	19630	111	0,13
S23	RT3,0	16272	0,224	19630	111	0,17
	RT13,6	9182	0,224	19630	111	0,09
S26	RT3,0	15913	0,224	19630	111	0,16
	RT13,6	11007	0,224	19630	111	0,11
S30	RT10,8	9684	0,224	19630	111	0,10
	RT13,6	13355	0,224	19630	111	0,14
S40	RT3,0	16550	0,224	19630	111	0,17
	RT13,6	12848	0,224	19630	111	0,13
S46	RT3,0	15204	0,224	19630	111	0,16
	RT13,6	12935	0,224	19630	111	0,13

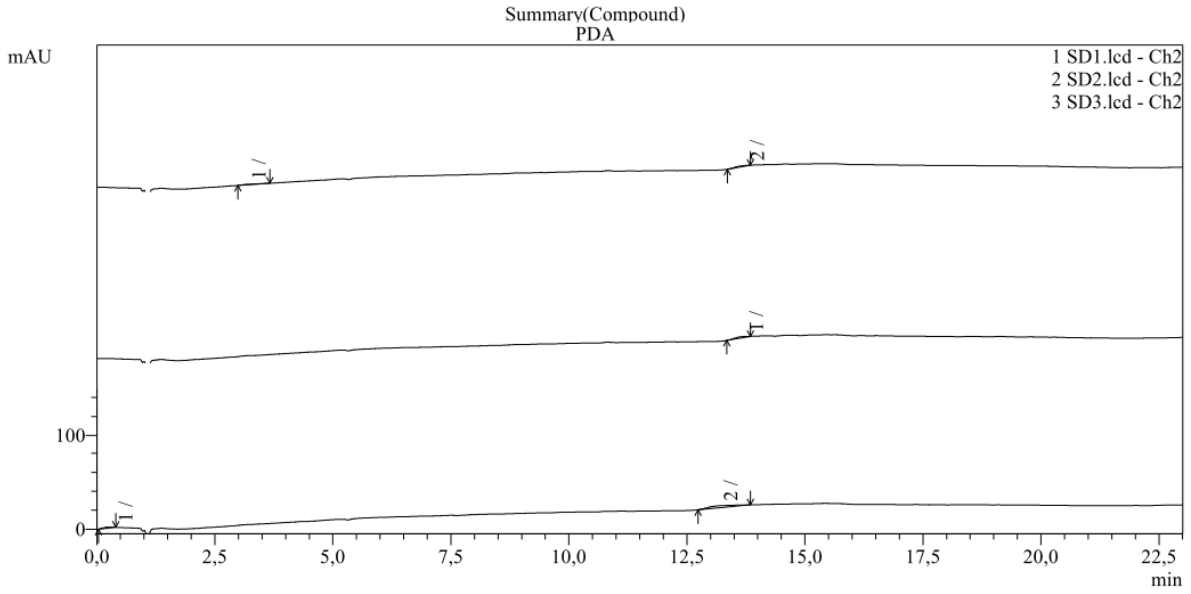
Le pic à RT 13,6 est présent dans tous les échantillons de stabilité mais il est également présent dans les 3 injections du solvant de dilution (Figure 97). Par conséquent, ce pic à RT 13,6 n'est pas comptabilisé comme une impureté.

Le pic à RT 3,0 est présent dans 8 échantillons de stabilité mais il est présent uniquement dans une seule injection du solvant de dilution (Figure 97). Par précaution, ce pic à RT 3,0 est considéré comme une impureté.

SHIMADZU LabSolutions

Analysis Report

Method Filename : SIMO.lcm
Batch Filename : STABILITY.lcb



Peak Table SD1.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	3,088	8935
2	13,648	16275

Peak Table SD2.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	13,627	21821

Peak Table SD3.lcd

PDA Ch2 224nm

Peak#	Ret. Time	Area
1	0,270	15785
2	13,083	77158

Figure 97. Rapport d'analyse des injections du solvant de dilution

Le Tableau 101 révèle également qu'aucune impureté ne dépasse la limite d'identification (0,2%), même pour les échantillons ayant dépassé les 36 mois (S40 et S46). Ces résultats viennent corroborer les conclusions de l'étude de dégradation forcée, démontrant ainsi la remarquable stabilité intrinsèque de l'OXO.

3.4. Etablissement de critère d'acceptation pour le total des impuretés

Suite à l'exclusion du pic à RT 13,6 du calcul des impuretés, le total des impuretés dans les échantillons de stabilité est présenté dans le Tableau 98.

Tableau 98. Total des impuretés dans les échantillons de stabilité

Echantillon de stabilité	Impureté non spécifiée	r_U	C_S (µg/ml)	r_S	C_U (µg/ml)	Impureté non spécifiée(%)	Total des impuretés (%)
S3	RT3,0	11541	0,224	19630	111	0,12	0,12
S14	RT3,0	11827	0,224	19630	111	0,12	0,12
S16	RT3,0	14309	0,224	19630	111	0,15	0,25
	RT10,8	9671	0,224	19630	111	0,10	
S18	RT3,0	12074	0,224	19630	111	0,12	0,12
S20	Aucune	00000	0,224	19630	111	0,00	0,00
S22	Aucune	00000	0,224	19630	111	0,00	0,00
S23	RT3,0	16272	0,224	19630	111	0,17	0,17
S26	RT3,0	15913	0,224	19630	111	0,16	0,16
S30	RT10,8	9684	0,224	19630	111	0,10	0,10
S40	RT3,0	16550	0,224	19630	111	0,17	0,17
S46	RT3,0	15204	0,224	19630	111	0,16	0,16

Pour évaluer l'existence d'une tendance à la hausse du total des impuretés au fil du temps, une analyse de régression linéaire entre le total des impuretés et la durée de vie correspondante a été réalisée à l'aide du MINITAB 18. Les résultats de cette étude sont les suivants :

Analyse de régression : Total des impuretés en fonction du temps (en mois)

Analyse de variance

Source	DL	Contribution	Valeur F	Valeur de p
Régression	1	2,72%	0,25	0,628
Temps (en mois)	1	2,72%	0,25	0,628
Erreur	9	97,28%		
Total	10	100,00%		

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,0764495	2,72%	0,00%	0,00%

Coefficients

Terme	Coeff	Coef ErT	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p
Constante	0,1055	0,0445	(0,0049; 0,2060)	2,37	0,042
Temps (en mois)	0,00076	0,00152	(-0,00267; 0,00419)	0,50	0,628

La valeur p associée à la variable de temps (en mois) est supérieure au seuil de signification de 0,05. Par conséquent, nous pouvons conclure qu'il n'existe pas d'association statistiquement significative entre la variable de réponse "Total des impuretés" et la durée (en mois).

Pour établir un critère d'acceptation pour ce terme, la borne de tolérance supérieure à 95 %, afin que 99,9 % des futurs lots du produit fini se situent dans cet intervalle, est calculée en utilisant le MINITAB 18. Voici le résultat :

Intervalle de tolérance : Total des impuretés

Méthode

Niveau de confiance	95 %
Pourcentage de population dans l'intervalle	99,9 %

Borne de tolérance supérieure à 95 %

Variable	Méthode normale
Total des impuretés	0,495

L'arrondissement de la valeur de la "Borne de tolérance supérieure à 95 %" (0,495 %) donne une valeur de 0,5 %. Par conséquent, le critère d'acceptation pour le total des impuretés est fixé à un maximum de 0,5 %.

3.5. Etablissement de spécification à libération

La spécification officielle (à péremption) des impuretés non spécifiées est établie à un maximum de 0,2%, considérée comme le 100%.

L'étude de stabilité rétrospective a démontré l'absence d'impuretés spécifiées dont la teneur augmente au fil du temps de conservation. Par conséquent, le calcul d'une spécification à libération devrait prendre en compte uniquement la variabilité de la méthode analytique.

La spécification à libération (URL) est déterminée par l'équation suivante :

$$\boldsymbol{URL = USL - t_{(0,95;\, DF)} \times \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}}}$$

Où:

- **URL** : spécification à libération supérieure.
- **USL :** spécification à péremption supérieure
- **σ^2 :** Variance de la fidélité intermédiaire de la méthode analytique.
- **DF :** degré de liberté.
- **t :** quantile à 95% de confiance.
- **n :** nombre d'essais répliqués utilisés pour la libération d'un lot.

La variance de la fidélité intermédiaire de la méthode analytique, calculée sur un effectif de 27 essais, s'est avérée être de 16,40. Les éléments de calcul et le résultat de la spécification à libération sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 99. Spécification à libération pour chaque impureté non spécifiée

Eléments de calcul	Valeur
Spécification à péremption USL	100% (correspondant à 0,2%)
Degré de liberté DF	26
Quantile $t_{0.95f}$	1,71
Nombre d'essai n	1
Variance fidélité intermédiaire σ^2	16,40
Spécification à libération URL	93,08% (correspondant à 0,19%)

Par conséquent, l'application d'une limite de 0,19% pour chaque impureté non spécifiée au moment de la libération garantit avec un niveau de confiance de 95% que les résultats moyens des essais, obtenus à tout moment ultérieur au cours de la durée de conservation, resteront dans les spécifications réglementaires d'un maximum de 0,2%. Cette approche assure une libération conforme des lots tout en prenant en compte la variabilité analytique.

4. Conclusion

En conclusion, cette étude de stabilité rétrospective a pleinement atteint ses objectifs multiples. Les résultats de l'étude de stabilité post-approbation ont confirmé que aucune impureté ne dépasse la limite d'identification de 0,2 %, même pour les échantillons ayant dépassé les 36 mois, corroborant ainsi les conclusions de l'étude de dégradation forcée qui a révélé l'absence de toute impureté spécifique. Cette constatation confirme la stabilité intrinsèque de l'OXO.

De plus, cette étude a conduit à l'établissement de nouvelles spécifications en adéquation avec les données recueillies et les exigences réglementaires. Pour garantir la qualité et la sécurité du produit, un critère d'acceptation pour le total des impuretés a été défini à un maximum de 0,5 %, en calculant la borne de tolérance supérieure à 95 % afin que 99,9 % des futurs lots du produit fini se situent dans cet intervalle.

Enfin, une spécification à la libération a été établie pour chaque impureté non spécifiée à 0,19 %, assurant avec un niveau de confiance de 95 % que les résultats moyens des essais, obtenus à tout moment ultérieur au cours de la durée de conservation, demeureront dans les spécifications réglementaires d'un maximum de 0,2 %.

Après l'incorporation du calcul des impuretés et des spécifications, les détails de la méthode finale de dosage des impuretés sont résumés dans le Tableau 100.

Tableau 100. Méthode finale de dosage des impuretés

<table>
<tr><td>Solution Echantillon (0,111 mg/ml)</td><td>Diluer 3 ml de l’échantillon à 10 ml avec la solution B.
Filtrer avec filtre seringue en nylon de 0,2 µm.</td></tr>
<tr><td>Solution Standard (0,22 µg/ml)</td><td>Dissoudre 11 mg d'OXO et 11 mg de PDO dans 5 ml d'acétonitrile, puis ajuster le volume à 100 ml avec la solution B.
Diluer 5ml de la solution précédente à 100 ml avec la solution B.
Diluer 2 ml la solution précédente à 50 ml avec la solution B.
Filtrer avec filtre seringue en nylon de 0,2 µm.</td></tr>
<tr><td>Solution de sensibilité (0,11 µg/ml)</td><td>Diluer au moitie la solution standard avec la solution B.
Filtrer avec filtre seringue de 0,2 µm.</td></tr>
<tr><td>Tampon</td><td>Dissoudre 5,44 gr de dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 et 1,5 ml de Triéthylamine TEA dans 900 ml d’eau ultra-pure, régler le pH à 6,80 avec une solution de potassium hydroxyde KOH et ajuster le niveau à 1000 ml avec l’eau ultra-pure.</td></tr>
<tr><td>Solution A</td><td>Méthanol</td></tr>
<tr><td>Solution B</td><td>30% méthanol et 70% tampon</td></tr>
<tr><td>Phase mobile</td><td>Mode gradient
<table>
<tr><th>Temps min</th><th>Solution A %</th><th>Solution B %</th></tr>
<tr><td>0</td><td>7</td><td>93</td></tr>
<tr><td>23</td><td>36</td><td>64</td></tr>
<tr><td>28</td><td>36</td><td>64</td></tr>
<tr><td>29</td><td>7</td><td>93</td></tr>
<tr><td>34</td><td>7</td><td>93</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Colonne</td><td>
<table>
<tr><td>Dimensions</td><td>▪ Longueur L = 10 cm
▪ Diamètre Ø = 4,6 mm</td></tr>
<tr><td>Phase stationnaire</td><td>▪ Gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie (3,5 µm)
▪ Taille des pores = 100 Å</td></tr>
<tr><td>Fabricant</td><td>▪ Waters Symmetry C18</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Température</td><td>40°C</td></tr>
<tr><td>Débit</td><td>1,0 ml/mn</td></tr>
<tr><td>Détection</td><td>DAD à 224nm</td></tr>
<tr><td>Volume d’injection</td><td>20µl</td></tr>
</table>

Tableau 100-bis. Méthode finale de dosage des impuretés

Conformité du système	– Répétabilité : Au maximum 5,0 pourcent pour l'écart type relatif RSD de la surface du pic dû à l'OXO déterminé sur un minimum de 3 injections de la solution standard – Résolution : Au minimum 19,0 entre les pics dus à la PDO et à l'OXO dans le chromatogramme de la solution standard. Au minimum 2,0 entre les pics OXO et PP dans le chromatogramme de la solution échantillon. – Facteur de symétrie du pic dû à l'OXO dans le chromatogramme de la solution standard est compris entre 0,8 et 1,8. – Rapport signal/bruit (S/N) : Au minimum 10 pour le pic dû à l'oxo dans le chromatogramme obtenu avec la solution de sensibilité
Analyse	Calculer le pourcentage de chaque impureté non spécifiée par la formule suivante : **Résultat = $(r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$** – **$r_U$:** aire du pic de chaque impureté non spécifiée dans la solution échantillon – **r_S** : aire du pic de l'OXO dans la solution standard – **C_S** : Concentration de l'OXO dans la solution standard (µg/ml) – **C_U** : la concentration nominale de l'OXO dans la solution échantillon (µg/ml)
Critères d'acceptation	– Limite d'exclusion : 0,1% – Pour chaque impureté non spécifiée : au maximum 0,2% – Total des impuretés : au maximum 0,5%

CONCLUSION GENERALE

L'intérêt de la détermination du profil des impuretés des substances actives dans les produits pharmaceutiques réside dans plusieurs aspects fondamentaux. Tout d'abord, cela permet d'approfondir les connaissances scientifiques sur les voies de dégradation du principe actif, offrant ainsi un aperçu crucial de sa stabilité intrinsèque. De plus, cette analyse est essentielle pour garantir la sécurité des produits pharmaceutiques en évaluant les effets secondaires potentiels liés aux impuretés présentes. Enfin, elle contribue à assurer la qualité des médicaments tout au long de leur durée de conservation, en identifiant les facteurs susceptibles d'affecter leur stabilité et leur efficacité.

Une approche systématique d'évaluation de la stabilité comprend plusieurs étapes, dont l'étude de la dégradation forcée, le développement, l'optimisation et la validation de méthodes analytiques indicatives de stabilité. Elle englobe également la réalisation d'études de stabilité formelle et post-approbation pour évaluer la pertinence des résultats obtenus lors de la dégradation forcée et leur capacité prédictive.

Les objectifs de cette étude étaient multiples et ont été soigneusement définis. Tout d'abord, nous avons entrepris une étude de dégradation forcée afin d'explorer les diverses conditions de stress pouvant affecter la stabilité du produit. En parallèle, notre objectif était de développer, d'optimiser et de valider une méthode analytique fiable pour évaluer la stabilité. Ensuite, une étude de stabilité post-approbation a été menée. Enfin, nous avons comparé les résultats générés lors de l'étude de dégradation forcée avec ceux observés dans les études de stabilité. Cette comparaison nous a permis d'évaluer la pertinence des conclusions du stress testing et la fiabilité de nos méthodes de contrôle de la qualité.

Dans cette étude, le sirop d'Oxomémazine à 0,33 mg/ml a été choisi pour plusieurs raisons significatives. Tout d'abord, il est important de noter qu'aucune monographie relative à cette substance active ou au produit fini n'est répertoriée dans des références aussi importantes que la Pharmacopée Européenne (Ph Eur 11), la Pharmacopée Américaine (USP 46) et la Pharmacopée Japonaise (JP18). De plus, l'absence d'articles et de travaux scientifiques publiés sur ce sujet rend cette étude d'autant plus pertinente pour combler cette lacune de connaissances. En outre, la faible concentration initiale du sirop pose un défi supplémentaire en termes de sensibilité de détection, nécessitant ainsi une approche analytique minutieuse.

Les expériences de mise au point d'une méthode chromatographique pour l'analyse des substances apparentées dans notre produit fini ont conduit à la création réussie d'une méthode en mode isocratique par chromatographie liquide à haute performance HPLC. Cette méthode a démontré une bonne rétention de la substance active (SA) avec une force élutive moyenne de la phase mobile. Les paramètres de la méthode comprenaient l'utilisation d'une colonne Symmetry C18 (100 × 4,6 mm, 5µm), une phase mobile constituée de 40% de méthanol et 60% d'un tampon à 50 mM d'hydrogénophosphate de potassium et 10 mM de triéthylamine à pH 7, une température maintenue à 40°C, un débit de 1 ml/min et une détection réalisée par DAD à 224 nm.

L'étude de dégradation forcée a démontré une stabilité remarquable de la substance active, aussi bien en solution aqueuse que dans le produit fini, face à diverses conditions de stress. La substance active est restée inchangée et a conservé son intégrité même lorsqu'elle a été soumise à un stress thermique prolongé à 70°C pendant 21 jours. De même, elle est demeurée stable lorsqu'elle a été exposée à un stress hydrolytique (1 M HCl et 1 M NaOH), maintenues à 70°C pendant 7 jours. Par ailleurs, elle a présenté une remarquable résistance face à un stress oxydatif, que ce soit par exposition à du peroxyde d'hydrogène à température ambiante pendant 7 jours ou par exposition à du fer ferrique à la même température sur une période similaire. En outre, la substance active a conservé son intégrité lorsqu'elle a été soumise à un stress photolytique équivalent à 2 fois 1,2 million de lux-heures.

Pendant la phase d'optimisation, la méthode isocratique, utilisée pour l'évaluation de l'étude de dégradation forcée, a été transformée en mode gradient d'élution dans le but principal d'accroître la sensibilité de détection des impuretés à faible concentration. L'optimisation a été réalisée en utilisant un placebo chargé à 100% d'Oxomémazine (OXO) et 0,2% de dioxyde de phénothiazine (PDO), représentant l'impureté synthétique de notre substance active. Un plan central composite a été employé pour optimiser la résolution entre les pics chromatographiques et le temps d'analyse. Les conclusions de cette phase ont abouti à un choix de pH du tampon de la phase mobile à 6,8, une variation de la fraction volumique du méthanol ($\Delta\phi$) de 35% à 55%, et un temps de gradient (Tg) de 23 minutes.

Une validation analytique, conforme aux directives du guide de l'ICH Q2 (R2), de cette méthode optimisée a été réalisée sur un intervalle de concentration allant de 0,1% à 0,5%. Le coefficient de détermination (R^2) de la courbe de régression de la série de calibration était de 0,9835, tandis que celui de la série de validation était de 0,9887. Les deux droites linéaires de

la série de calibration et de la série de validation ont été comparables, ce qui témoigne de l'absence d'effet matrice. Le rapport signal/bruit des solutions à un niveau de concentration correspondant à la limite d'exclusion, soit 0,1%, a été supérieur à 10. L'indice de recouvrement moyen (IRM) a été de 98,69%, tandis que les indices de recouvrement pour les niveaux de concentration de 0,1%, 0,2%, 0,4% et 0,5% ont été respectivement de 102,67%, 99,39%, 99,39% et 95,43%. Le coefficient de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire a été de 4,70%. Le profil d'exactitude ne dépasse pas les limites de ±15% sur toute l'étendue de l'intervalle de mesure.

Une étude de stabilité post-approbation, réalisée avec la méthode analytique préalablement validée, a été menée sur 11 échantillons du produit fini, dont les durées de vie au moment de l'analyse variaient de 3 mois à 46 mois. Les résultats de cette étude ont confirmé qu'aucune impureté ne dépassait la limite d'identification de 0,2%, corroborant ainsi les conclusions de l'étude de dégradation forcée qui avait révélé l'absence de toute impureté spécifique. De plus, cette étude a conduit à l'établissement de nouvelles spécifications en adéquation avec les données recueillies et les exigences réglementaires. Pour chaque impureté non spécifiée, la spécification a été fixée à un maximum de 0,2%, tandis que le total des impuretés ne doit pas dépasser 0,5%. En outre, une spécification à la libération a été établie pour chaque impureté non spécifiée à 0,19%.

En conclusion, le présent travail représente une contribution à la compréhension et à l'évaluation de la stabilité d'une substance active non monographiée. L'étude de dégradation forcée a démontré une stabilité intrinsèque remarquable de l'oxomémazine face aux diverses conditions de stress. En parallèle, une méthode indicative de stabilité a été développée, optimisée puis validée. Ensuite, les conclusions du stress testing ont été confirmées par une étude de stabilité post-approbation.

Recommandations

A. Développement analytique

L'adoption de l'approche des plans d'expérience pour le développement de la méthode est fortement recommandée. Cette approche s'est avérée être d'une grande utilité, permettant une meilleure compréhension des effets des facteurs et de leurs interactions, tout en facilitant la détermination des conditions optimales. Grâce à cette méthode, le nombre d'expériences nécessaires a pu être significativement réduit, entraînant ainsi une réduction notable du temps et des coûts associés au développement.

En conformité avec les données de la littérature, lorsque la sensibilité de la détection pose un défi lors du développement des méthodes chromatographiques HPLC, l'application du mode gradient est recommandée. De plus, l'utilisation des colonnes à particules superficiellement poreuses, caractérisées par un noyau solide entouré d'une fine couche poreuse, présente un intérêt prometteur pour améliorer la sensibilité de la détection [102–104].

B. Troubleshooting en HPLC

En cas de contamination par les métaux tels que le fer, l'efficacité du rinçage à l'EDTA a été démontrée.

En cas de suspicion de blocage partiel de l'entrée de la colonne, il est recommandé d'ajuster la concentration du tampon, d'utiliser un filtre de porosité plus fine lors de la filtration des échantillons, d'éviter le contact entre le solvant organique pur et le tampon de la phase mobile, et d'installer un filtre en ligne avant la colonne pour réduire la quantité de particules atteignant le fritté de la colonne. Ces ajustements sont susceptibles d'optimiser les performances de la HPLC et de minimiser les problèmes potentiels liés à l'obstruction.

La triéthylamine (TEA) est préconisée pour l'analyse des bases faibles lorsque le pH est maintenu au-dessus de 3. Cette substance s'est avérée être un choix approprié, en accord avec les données de la littérature, et elle a démontré une amélioration significative de la symétrie des pics chromatographiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of analytical procedures Q2(R2), Final Version. 2023 nov.

2. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Impurities in new drug products Q3B(R2), Step 4. 2006 juin.

3. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), Step 4. 2003 févr.

4. Goupy J, Creighton L. Introduction aux plans d'expériences. 3e édition. Paris: Dunod : L'Usine nouvelle; 2006.

5. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry : Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics [Internet]. 2015 juill. Disponible sur: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics

6. Steven W. Baertschi, Patrick J. Jansen, Karen M. Alsante. Stress testing: A predictive tool. In: Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation. 2nd ed. London: Informa healthcare; 2011. (Drugs and the pharmaceutical sciences).

7. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Guide technique pour l'élaboration des monographies. 2022.

8. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Impurities in new drug substances Q3A(R2), Step 4. 2006 oct.

9. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Guideline for elemental impurities Q3D, Step 4. 2014 déc.

10. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Impurities: guideline for residual solvents Q3C(R7), Step 4. 2018 oct.

11. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Establishing Impurity Acceptance Criteria As Part of Specifications for NDAs, ANDAs, and BLAs Based on Clinical Relevance. 2020 janv. Report No.: MAPP 5017.2 Rev. 1.

12. Silke Klick, Pim G. Muijselaar, Joop Waterval. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. Pharm Technol. 2 févr 2005;29(2):48-66.

13. Dan W. Reynolds,* Kevin L. Facchine, June F. Mullaney,Karen M. Alsante,Todd D. Hatajik, and Michael G. Motto. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. Pharm Technol. févr 2002;48-56.

14. Husain A. Forced Degradation Studies. J Anal Pharm Res [Internet]. 14 déc 2016 [cité 16 nov 2023];3(6). Disponible sur: https://medcraveonline.com/JAPLR/forced-degradation-studies.html

15. Singh S, Bakshi M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. Pharm Technol -Line. 1 janv 2000;24:1-14.

16. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Quality Risk Management Q9, Step 4. 2005 nov.

17. World Health Organization (WHO). Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. 2018. Report No.: Technical Report Series, No. 1010.

18. World Health Organization (WHO). Guidelines for registration of fixed-dose combination medicinal products. 2005 oct. Report No.: Technical Report Series, No. 929-Annex 5.

19. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry : INDs for Phase 2 and Phase 3 Studies [Internet]. 2003 mai [cité 16 janv 2024]. Disponible sur: http://www.fda.gov/cder/guidance./index.htm

20. Karen M Alsante, Linda Martin, Steven W Baertschi. A stress testing benchmarking study. Pharm Technol. févr 2003;27(2):60-73.

21. Waterman KC, Adami RC. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. Int J Pharm. avr 2005;293(1-2):101-25.

22. Waterman KC, Carella AJ, Gumkowski MJ, Lukulay P, MacDonald BC, Roy MC, et al. Improved Protocol and Data Analysis for Accelerated Shelf-Life Estimation of Solid Dosage Forms. Pharm Res. 12 mars 2007;24(4):780-90.

23. Waterman KC, Adami RC, Alsante KM, Antipas AS, Arenson DR, Carrier R, et al. Hydrolysis in Pharmaceutical Formulations. Pharm Dev Technol. janv 2002;7(2):113-46.

24. Alsante K, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik T, Kong W, et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. Adv Drug Deliv Rev. 10 janv 2007;59(1):29-37.

25. Jordan Food and Drug Administration. JFDA Guidelines for Validation of Analytical Procedures for Finished Pharmaceutical Products. 2021 août.

26. Zelesky T, Baertschi SW, Foti C, Allain LR, Hostyn S, Franca JR, et al. Pharmaceutical Forced Degradation (Stress Testing) Endpoints: A Scientific Rationale and Industry Perspective. J Pharm Sci. déc 2023;112(12):2948-64.

27. George Ngwa, PhD. Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. Drug Deliv Technol. juin 2010;10(5).

28. Sharma MK, Murugesan M. Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method. J Chromatogr Sep Tech [Internet]. 2017 [cité 16

nov 2023];08(01). Disponible sur: https://www.omicsonline.org/open-access/forced-degradation-study-an-essential-approach-to-develop-stabilityindicating-method-2157-7064-1000349.php?aid=85280

29. Mark A. Nussbaum, Andreas Kaerner, Patrick J. Jansen, Steven W. Baertschi. Role of "mass balance" in pharmaceutical stress testing. In: Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation. 2nd ed. London: Informa healthcare; 2011. p. 233-53. (Drugs and the pharmaceutical sciences).

30. Baertschi SW, Pack BW, Hoaglund Hyzer CS, Nussbaum MA. Assessing mass balance in pharmaceutical drug products: New insights into an old topic. TrAC Trends Anal Chem. sept 2013;49:126-36.

31. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Pharmaceutical Development Q8(R2), Step 4. 2009 août.

32. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A, Step 4. 1999.

33. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients, Q7, Step 4. 2000 nov.

34. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Evaluation for stability data Q1E, Step 4. 2003 févr.

35. Dolan J. Resolving Minor Peaks. 1 juill 2002 [cité 17 janv 2024];20. Disponible sur: https://www.chromatographyonline.com/view/resolving-minor-peaks-1

36. Iqbal MdY, Rao KMVN, Sridhar G, Raju PP, Deshpande GR, Babu JM. Characterization and relative response factor determination of process related impurity in Naproxen by nuclear magnetic resonance spectroscopy. J Pharm Biomed Anal. nov 2011;56(3):484-90.

37. Webster GK, Marsden I, Pommerening CA, Tyrakowski CM, Tobias B. Determination of relative response factors for chromatographic investigations using NMR spectrometry. J Pharm Biomed Anal. juill 2009;49(5):1261-5.

38. Hutchinson JP, Li J, Farrell W, Groeber E, Szucs R, Dicinoski G, et al. Comparison of the response of four aerosol detectors used with ultra high pressure liquid chromatography. J Chromatogr A. mars 2011;1218(12):1646-55.

39. Sunita Sule, Deepak Nikam, Sushama Ambadekar, Sudesh Bhure. Forced Degradation in Pharmaceuticals -A Regulatory Update. Am J Chem. 2023;13(2):42-8.

40. BRUMMER, Hildegard. How to approach a forced degradation study. SGS LIFE Sci. janv 2011;31:1-4.

41. Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [cité 27 janv 2024]. (Mathématiques et Applications; vol. 67). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-11472-4

42. Box GEP, Hunter JS, Hunter WG. Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery. 2nd ed. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience; 2005. 633 p. (Wiley series in probability and statistics).

43. Tinsson W. Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010 [cité 14 août 2021]. (Mathématiques et Applications). Disponible sur: https://www.springer.com/gp/book/9783642114717

44. Goupy J. Plans d''expériences. Tech Anal [Internet]. avr 1992 [cité 27 janv 2024]; Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/doi/10.51257/a/v1/p230

45. Armstrong NA. Pharmaceutical experimental design and interpretation. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis; 2006. 238 p.

46. Benoist D, Tourbier Y, Germain-Tourbier S. Plans d'expériences: construction et analyse. Paris: Lavoisier; 1994. 700 p.

47. Goupy, Jacques L. Étude comparative de divers plans d'expériences. Rev Stat Appliquée. 1990;Tome 38(4):5-44.

48. Goupy J. Plans d'expériences: les mélanges. Paris: Dunod; 2000.

49. Dean AM, Voss D, Draguljić D. Design and analysis of experiments. 2nd ed. Cham: Springer; 2017. (Springer texts in statistics).

50. Hinkelmann K, Kempthorne O. Design and analysis of experiments. 1: Introduction to experimental design. 2. ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2008. 631 p.

51. Torbeck LD, éditeur. Pharmaceutical and medical device validation by experimental design. New York: Informa Healthcare; 2007. 251 p.

52. Ducauze C. Chimie analytique, analyse chimique et chimiométrie: concepts, démarche et méthodes. Paris: Lavoisier-Tec & doc; 2014.

53. Goupy J. Plans d'expériences. Concept Prod [Internet]. sept 1997 [cité 11 mars 2024]; Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/doi/10.51257/a/v2/p230

54. Lawson J. Design and analysis of experiments with SAS. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 2010. 582 p. (Chapman & Hall/CRC texts in statistical science series).

55. Goupy J. Plans d'experiences: les melanges. Paris: Dunod; 2000.

56. Barker TB, Milivojevich A. Quality by experimental design. Fourth edition. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 2016.

57. Goupy J. Plans d'expériences pour surfaces de réponse. Paris: Dunod; 1999. 409 p. (Technique et ingénierie Série Génie industriel).

58. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), Step 4. 2005 nov.

59. Commission SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches. STP PHARMA PRATIQUES. juin 2003;13(3):101-38.

60. Commission SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II - Statistiques. STP PHARMA PRATIQUES. févr 2006;16(1):28-58.

61. Commission SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives : harmonisation des démarches Partie III. Exemples d'application. STP PHARMA PRATIQUES. avr 2006;16(2):81-121.

62. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods [Internet]. 1994 nov. Disponible sur: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/reviewer-guidance-validation-chromatographic-methods

63. Feinberg M. Validation interne des méthodes d'analyse. Qual Sécurité Au Lab [Internet]. sept 2001 [cité 11 mars 2024]; Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/doi/10.51257/a/v1/p224

64. Rivier C, Crozet M. Limite de détection de méthodes d'analyse et termes apparentés. Qual Sécurité Au Lab [Internet]. mars 2014 [cité 11 mars 2024]; Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/doi/10.51257/a/v2/p262

65. Feinberg M. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. Qual Sécurité Au Lab [Internet]. déc 2012 [cité 11 mars 2024]; Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/doi/10.51257/a/v2/p224

66. G. C. HOKANSON. A LIFE CYCLE APPROACH TO THE VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS DURING PHARMACEUTICAL PRODUCT DEVELOPMENT, PART I: THE INITIAL VALIDATION PROCESS. Pharmaceutical technology. 1994;31.

67. Melveger AJ, Huynh-Ba K. Critical Regulatory Requirements for a Stability Program. In: Huynh-Ba K, éditeur. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2009 [cité 2 févr 2024]. p. 9-19. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-85627-8_2

68. ANSM. Bonnes pratiques de fabrication. Paris; 2016 févr. Report No.: N° 2015/12 bis.

69. Frank J. Diana. Post-approval Changes – Stability Requirements and Regulations. In: Huynh-Ba K, éditeur. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2009 [cité 1 févr 2024]. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-85627-8

70. Buncher CR, Tsay JY, éditeurs. Statistics in the pharmaceutical industry. 3rd ed. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC; 2006. (Biostatics).

71. Burdick RK, LeBlond DJ, Pfahler LB, Quiroz J, Sidor L, Vukovinsky K, et al. Stability. In: Statistical Applications for Chemistry, Manufacturing and Controls (CMC) in the Pharmaceutical Industry [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cité 1 févr 2024]. p. 269-327. (Statistics for Biology and Health). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-50186-4_8

72. Allen PV, Dukes GR, Gerger ME. Determination of Release Limits: A General Methodology. Pharm Res. 1991;08(9):1210-3.

73. Huynh-Ba K, Larner G, Strickland H, Choudhury D, Wu Y, Hofer J, et al. Analytical approaches to ensure product quality -- AAPS Joint Face-to-Face Meeting of the Stability, the Pharmaceutical Impurities, and the CMC Statistics Focus Groups, April 6th, 2016 in Gaithersburg, MD. AAPS Open. déc 2017;3(1):1.

74. Riley CM, Yang H. General principles and regulatory considerations: specifications and shelf life setting. In: Specification of Drug Substances and Products [Internet]. Elsevier; 2020 [cité 4 févr 2024]. p. 9-41. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081028247000026

75. Stan Altan, Yilje Dong, Mary Ann Gorko, Niels Vaever Hartvig. Understanding Internal Release Limits. Pharmaceutical Technology [Internet]. oct 2018; Disponible sur: http://www.pharmtech.com/

76. PubChem. Oxomemazine hydrochloride [Internet]. [cité 5 févr 2024]. Disponible sur: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3083870

77. Oxomemazine | The Merck Index Online [Internet]. [cité 5 févr 2024]. Disponible sur: https://merckindex.rsc.org/monographs/m8315

78. Oxomemazine [Internet]. [cité 5 févr 2024]. Disponible sur: https://go.drugbank.com/drugs/DB13820

79. Merck. HPLC and UHPLC Column Selection Guide [Internet]. Disponible sur: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/340/058/hplc-columns-guide-br7614en-mk.pdf

80. Symmetry C18 Column, 100Å, 3.5 µm, 4.6 mm X 100 mm, 1/pk [Internet]. [cité 5 févr 2024].Disponible sur: https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/wat066220-symmetry-c18-column-100a-35--m-46-mm-x-100-mm-1-pk.html

81. Meurs J. Flow Rates in Liquid Chromatography, Gas Chromatography and Supercritical Fluid Chromatography: A Tool for Optimization. J Open Res Softw. 2 août 2016;4(1):32.

82. Keunchkarian S, Reta M, Romero L, Castells C. Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatogaphic conditions. J Chromatogr A. juin 2006;1119(1-2):20-8.

83. Porsch B. Experimental Consequences of Differences Between Composition of the Sample Solvent and of the Mobile Phase in HPLC. J Liq Chromatogr. oct 1993;16(16):3409-21.

84. Rousseaux G, De Wit A, Martin M. Viscous fingering in packed chromatographic columns: Linear stability analysis. J Chromatogr A. mai 2007;1149(2):254-73.

85. Dolan J. Peak Shape Problems. 1 juill 2008;26:610-6.

86. Dolan J. Troubleshooting Basics, Part IV: Peak Shape Problems. 1 juill 2012;30:564-9.

87. Kromidas S. Practical problem solving in HPLC. Weinheim ; New York: Wiley-VCH; 2000. 178 p.

88. Ronald E. Majors. The Cleaning and Regeneration of Reversed-Phase HPLC Columns. 1 janv 2003 [cité 28 janv 2024];21. Disponible sur: https://www.chromatographyonline.com/view/cleaning-and-regeneration-reversed-phase-hplc-columns-1

89. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd. ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2010. 912 p.

90. Moldoveanu SC, David V. Gradient Elution. In: Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 27 janv 2024]. p. 451-62. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128036846000147

91. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Practical HPLC Method Development [Internet]. 1re éd. Wiley; 1997 [cité 6 févr 2024]. Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118592014

92. Marcel CAUDE, Alain JARDY. Optimisation Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation. TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR. 10 oct 1994;

93. Kromidas S, éditeur. Gradient HPLC for Practitioners: RP, LC-MS, Ion Analytics, Biochromatography, SFC, HILIC [Internet]. 1re éd. Wiley; 2019 [cité 8 févr 2024]. Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527812745

94. Adam P. Schellinger, Peter W. Carr. Solubility of Buffers in Aqueous-Organic Eluents for Reversed-Phase Liquid Chromatography. 1 juin 2004 [cité 11 févr 2024];22. Disponible sur: https://www.chromatographyonline.com/search

95. ACE_Guide_BufferSelection.pdf [Internet]. [cité 11 févr 2024]. Disponible sur: https://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf

96. Dolan J. Split Peaks — A Case Study. 1 mars 2005;23:266-71.

97. Restek Liquid Chromatography (LC) Columns — Usage & Care [Internet]. [cité 11 févr 2024]. Disponible sur: https://www.restek.com/global/en/articles/restek-liquid-chromatography-lc-columns-usage-care

98. Dong M, Huynh-Ba K, Wong A. Validation of Stability-Indicating HPLC Methods for Pharmaceuticals: Overview, Methodologies, and Case Studies. 1 nov 2020;38:606-18.

99. Rosario LoBrutto, Tarun Patel. METHOD VALIDATION. In: Kazakevich Y, LoBrutto R, éditeurs. HPLC for pharmaceutical scientists. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience; 2007. p. 455-502.

100. Dong M, Huynh-Ba K, Ayers J. Development of Stability-Indicating Analytical Procedures by HPLC: An Overview with Best Practices (Part 1). 1 oct 2020;33:521-6.

101. Bose A. HPLC Calibration Process Parameters in Terms of System Suitability Test. Austin Chromatogr. 2014;1(2).

102. Fekete S, Guillarme D, Dong M. Superficially Porous Particles: Perspectives, Practices, and Trends. 1 juin 2014;32:420-33.

103. Comparison of UHPLC Particles for Intact Mass Subunit Analysis of Monoclonal Antibodies [Internet]. Chromatography Online. 2020 [cité 14 févr 2024]. Disponible sur: https://www.chromatographyonline.com/view/comparison-of-uhplc-particles-for-intact-mass-subunit-analysis-of-monoclonal-antibodies

104. Enhancing High-Throughput HPLC Methods for Small-Molecule Drug Discovery Using Superficially Porous Particle Technology [Internet]. Chromatography Online. 2023 [cité 14 févr 2024]. Disponible sur: https://www.chromatographyonline.com/view/enhancing-high-throughput-hplc-methods-for-small-molecule-drug-discovery-using-superficially-porous-particle-technology

ANNEXES

Annexe 1. Impuretés dans les substances actives et produits finis USP <1086>

Printed on: Wed Feb 08 2023, 11:03:08 PM(EST)
Printed by: Dang Van Vu
Do Not Distribute
Status: Currently Official on 09-Feb-2023
Official Date: Official as of 01-May-2021
DOI Ref: a5w6v
DocId: GUID-65E1A502-9F23-49A6-A43E-FD54D977F2E8_4_en-US
Document Type: GENERAL CHAPTER
DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M99805_04_01
@2023 USPC

⟨1086⟩ IMPURITIES IN DRUG SUBSTANCES AND DRUG PRODUCTS

Change to read:

▲INTRODUCTION

Impurities are critical quality attributes of drug substances and drug products because they have the potential to affect the safety and efficacy of the product. This general information chapter provides guidance on the control of impurities in drug substances (process-related impurities and degradation products) and drug products (degradation products). (Definitions of key terms used in this chapter can be found in the *Glossary*).

This chapter covers drug substances and drug products described in the *USP–NF*. This chapter addresses impurities arising during the manufacturing process and/or storage of the drug substance. Also the chapter covers those impurities in drug products classified as degradation products of the drug substance or reaction products of the drug substance with an excipient and/or immediate container–closure system (collectively referred to as "degradation products").

This chapter does not cover veterinary products, biological/biotechnological products, peptides, oligonucleotides, fermentation products and semisynthetic products derived from them, polymorphic forms, radiopharmaceuticals, herbal products, or crude products of animal or plant origin. In addition, impurities in excipients and leachables from the container–closure system are out of the scope of this chapter.

The regulatory and compendial standards for the control of impurities continue to evolve due to advancements in analytical science, technology, and toxicology. Therefore, communications about impurities and degradation products in drug substances and drug products can be improved by including in this Pharmacopeia the definitions for terms and the contexts in which these terms are used (see the *Glossary*). See *General Notices, 5.60. Impurities and Foreign Substances* for additional information about impurities. Some other general chapters added over the years have also addressed topics of purity or impurity as these have come into focus or as analytical methodology has become available. Analytical aspects are enlarged upon in *Chromatography* ⟨621⟩, *Validation of Compendial Procedures* ⟨1225⟩, and *Verification of Compendial Procedures* ⟨1226⟩.

Impurity measurements for drug products using chromatographic methods could present a challenge to the Pharmacopeial standards setting due to low concentration of the impurity and complexity of matrix. As a consequence, many monographs for Pharmacopeial preparations rely on chromatographic assays. Where more significant impurities are known, some monographs set forth specific tests for these impurities. In general, however, this Pharmacopeia does not quantify in drug products impurities that are evaluated in drug substances and that are not expected to increase in the drug product during manufacturing or storage (i.e., impurities that are not degradation products). It is assumed that adequate retention specimens are in storage for the exact batch of drug substances used in any specific lot of a drug product. Whenever analysis of a drug product raises a question of the quality attributes of any of the drug substances used, subsequent analysis of retention specimens is in order.

DRUG SUBSTANCE

Impurities in drug substances can be classified into the following categories:

1. Organic impurities
2. Inorganic impurities
3. Residual solvents

Organic impurities can arise during the manufacturing process and/or storage of the drug substance. They can be identified or unidentified, volatile or nonvolatile, and include the following:

1. Starting materials
2. Reaction byproducts
3. Intermediates
4. Degradation products
5. Reagents and ligands

Inorganic impurities can result from the manufacturing process. They are normally known and identified and include the following:

1. Reagents and catalysts
2. Elemental impurities
3. Inorganic salts
4. Other materials (e.g., filter aids)

Elemental impurities can include catalysts and environmental contaminants that may be present in drug substances. These impurities may occur naturally, be added intentionally, or be introduced inadvertently (e.g., by interactions with processing equipment and the container–closure system). When elemental impurities are known to be present, have been added, or have the potential for introduction, assessment of the drug substance in the context of its use in the finished product is required (see *Elemental Impurities—Limits* ⟨232⟩).

Residual solvents originate from organic liquids used as vehicles in the synthesis of a drug substance, as starting material, or as the intermediates involved in the synthesis. Because these are generally of known toxicity, the selection of appropriate controls is easily accomplished (see *Residual Solvents* ⟨467⟩).

Concepts for setting impurity limits in drug substances are based on chemistry and safety concerns. As such, limits for organic and inorganic impurities and residual solvents should be established according to the applicable guidances. Elemental impurity

www.webofpharma.com

limits for a drug substance may be required depending on the outcome of the risk assessment for the finished product. The basic tenet for setting limits is that levels of impurities in a drug substance must be controlled throughout its development to ensure its safety and quality for use in a drug product.

Documented evidence that the analytical procedure used to evaluate impurities is validated and suitable for the detection and quantitation of impurities should be established.

DRUG PRODUCT

The specification for organic impurities in a drug product should include a list of degradation products expected to occur during the manufacture of the commercial product and under the recommended storage conditions. Stability studies, forced degradation studies, knowledge of degradation pathways, product development studies, compatibility studies, and laboratory studies should be used to characterize the degradation profile. The selection of degradation products in the drug product specification should be based on the degradation products found in batches manufactured by the proposed commercial process.

The rationale for specifications should include a discussion of the degradation profiles observed in the safety and clinical development batches and in stability studies, together with a consideration of the degradation profile of batches manufactured by the proposed commercial process. For degradation products known to be unusually potent or to produce toxic or unexpected pharmacological effects, the quantitation/detection limit of the analytical procedures should be commensurate with the level at which the degradation products should be controlled.

For drug products, the concept for setting degradation product limits is based on sound scientific assessment as applied to available data on the safety and stability of the drug product, data that may include the degradation pathways of the drug substance, the manufacturing process, known excipient interactions, any safety assessment studies (e.g., predictive toxicology programs, mutagenicity assessments, and in vitro and in vivo toxicology studies), stability studies conducted under the recommended storage conditions, and ancillary studies that may provide additional information on the stability profile of the drug product. Impurities that are not degradation products (i.e., process-related impurities from the drug substance) are often not controlled in the drug product, as they are typically controlled in the drug substance and these impurities are not expected to increase over time. In cases where the studies show that impurities from the drug substance can increase over time (i.e., they are also drug product degradation products), they should be controlled in the drug substance and also in the drug product. Additional guidance for setting limits can be found in various International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines, such as ICH Q3A, Q3B, and M7; FDA guidance documents; and *USP* monograph submission guidelines.

Documented evidence that the analytical procedure used to evaluate impurities is validated and suitable for the detection and quantification of impurities should be established.

General chapter ⟨232⟩ specifies limits for the amounts of elemental impurities in drug products.

Drug products should contain no higher levels of residual solvents than can be supported by safety data (see ⟨467⟩).

ORGANIC IMPURITIES IN DRUG SUBSTANCES AND DRUG PRODUCTS

All drug substances and drug products are subject to control of organic impurities. A threshold-based approach described in the ICH Q3A and Q3B guidelines may be used for the control of organic impurities in drug substances or drug products generated during the manufacturing process or storage (see *Control of Organic Impurities in Drug Substances and Drug Products* ⟨476⟩ for additional information). In this chapter, "impurity" can refer to process-related impurities and degradation products for a drug substance, and "degradation products" can refer to process-related impurities and degradation products for a drug product (see *Glossary* for additional information).

The organic impurities to be controlled in drug substances are the process-related impurities and degradation products. The organic impurities to be controlled in the drug product are those resulting from the degradation of the drug substance or from the interaction of the drug substance with excipients and/or the primary container–closure system. Drug substance process-related impurities need not be controlled in the drug product unless they are also degradation products. However, in some cases drug substance process-related impurities may be included in the drug product specifications, if appropriate, and limited by appropriate acceptance criteria.

As described in ⟨476⟩, unusually toxic impurities (e.g., mutagenic impurities) in drug substances and drug products require more stringent control compared to non-mutagenic impurities.

Manufacturers are responsible for controlling organic impurities in accordance with current regulatory standards. Manufacturers should consider the chemical characteristics and safety aspects of impurities when they identify and classify impurities in a drug substance or drug product. Analytical procedures for the detection and quantitation of impurities should be verified or validated. (For additional information, see ⟨1226⟩ and ⟨1225⟩). For impurities that are known or suspected to be highly toxic (e.g., mutagenic) or that produce undesired pharmacological effects, the quantitation/detection limit of the analytical procedures should be commensurate with the acceptance criteria for the suspected highly toxic impurity and current applicable regulatory guidance to ensure patient safety. Impurities or degradation products that are also significant metabolites and present in animal and/or human studies are generally considered qualified.

If an individual monograph does not include a procedure for quantifying an impurity or acceptance criterion for an observed impurity, the manufacturer is responsible for developing and validating analytical procedures and establishing appropriate acceptance criterion. USP requests submission of the alternative/new procedure to evaluate for potential inclusion in the appropriate monograph(s).

In cases of complex impurity profiles, it may not be feasible to resolve each of the impurities individually or to detect them and quantify them using a single analytical procedure. In such cases, manufacturers should consider alternate approaches such as the use of multiple analytical procedures to test for impurities.

www.webofpharma.com

The acceptance criteria for impurities shall be based on applicable guidances or other acceptable scientific means, with safety as the primary consideration, and not solely based on process capability. In cases of complex impurity profiles, acceptance limits may be established based on grouping of impurities, as appropriate.

Similar principles may be applied to set thresholds and acceptance criteria for degradation products in FDA over-the-counter (OTC) monograph drug products, which are not discussed in ICH guidelines or FDA guidances. Degradation products in these drugs should be reported, identified, and/or qualified.

Measurement of degradation products can be challenging for products containing multiple drug substances and complex formulations. The use of placebo products as controls in stability studies may aid in the deconvolution of chemical changes that could be related to excipients rather than the drug substance.

(Definitions for key terms used in this chapter can be found in the *Glossary*. Additional sources of guidance on impurities in drug substances and drug products may be found in *Appendix 1: Additional Sources of Information and Guidance*.)

ORGANIC IMPURITIES DECISION TREE

The decision tree shown in *Figure 1* provides guidance for the control of organic impurities in drug substances and drug products.

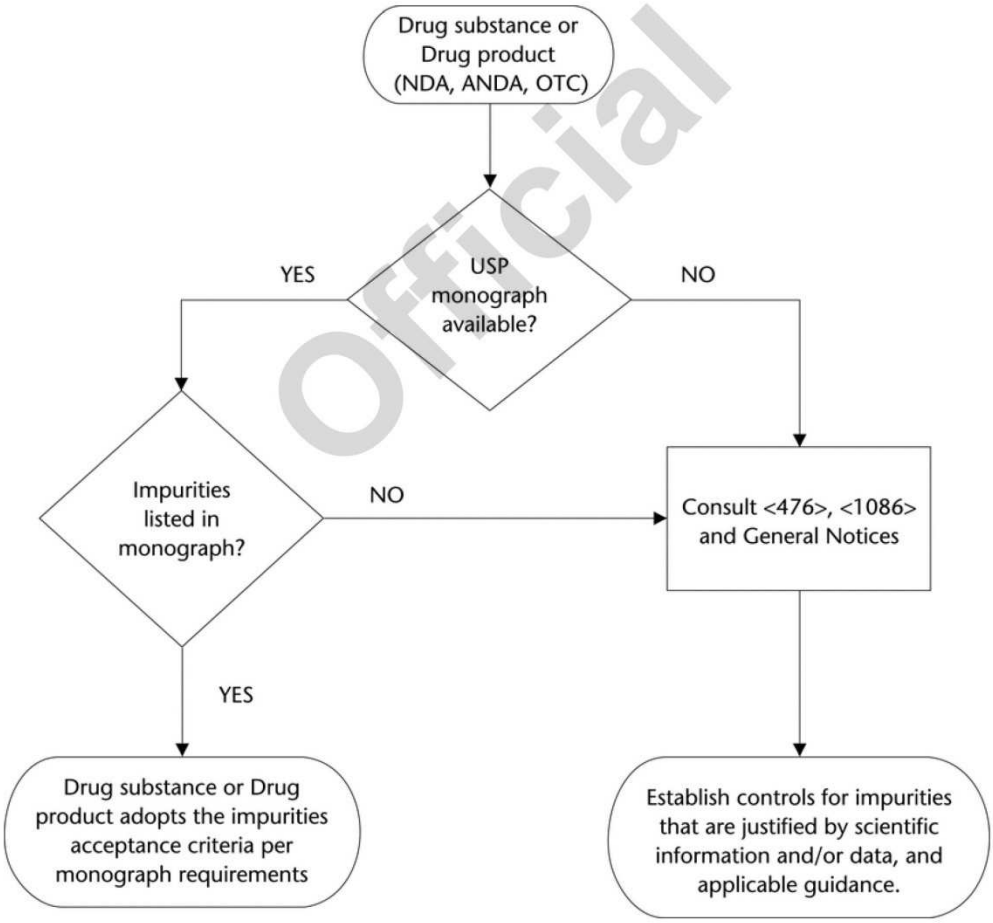


Figure 1. Decision tree for the control of organic impurities in drug substances and drug products. NDA = New Drug Application; ANDA = Abbreviated New Drug Application.

Official

www.webofpharma.com

Note that all impurities specific to a given drug product formulation may or may not be included in the *USP* monograph. If the impurity is listed in the monograph, follow monograph limits. If the impurity is not listed, consult this chapter and ⟨476⟩ for guidance. Nonmonograph tests and acceptance criteria suitable for detecting and controlling impurities that may result from a change in the processing methods or that may be introduced from external sources should be employed in addition to the tests provided in the individual monograph, where the presence of the impurity is inconsistent with applicable good manufacturing practices or good pharmaceutical practices.

TERMINOLOGY ASSOCIATED WITH ORGANIC IMPURITIES USED IN DRUG SUBSTANCE AND DRUG PRODUCT MONOGRAPHS

The *Organic Impurities* section in a monograph generally includes impurities/degradation products that are known to be detected by the tests prescribed in the monograph. There are several scenarios for citing specified organic impurities in *USP–NF* monographs.

For identified impurities/degradation products (i.e., the ones that have known and characterized chemical structure), the chemical name is usually provided (e.g., in an impurities table or as a table footnote or in the Reference Standard section). They can have reference material available or not, depending on the substance.

Unidentified impurities/degradation products (i.e., the ones for which a structural characterization has not been achieved) are named with a general designation (e.g., impurity 1, impurity 2) or by an analytical property (e.g., chromatographic retention time). The reference material is not available.

Specified impurities/degradation products can be either identified or unidentified. They are listed and limited with a specific acceptance criterion in monographs.

If an impurity/degradation product is not listed and is NMT the identification threshold, it is controlled as an individual unspecified impurity. In all cases the terms “any individual impurity” or “any other individual impurity” correspond to unspecified impurities.

A *USP* monograph of a drug substance may contain acceptance criteria for: specified identified and unidentified organic impurities; “any individual impurity”, "any unspecified impurity", or “any other individual impurity”; and total impurities. Total impurities in the drug substance monographs are the sum of all specified and unspecified impurities above the reporting threshold.

A *USP* monograph of a drug product may contain acceptance criteria for: specified identified and unidentified degradation products; “any individual degradation product”, “any other individual degradation product”, or "any unspecified degradation product"; and total degradation products. Total degradation products in the drug product monographs are the sum of all specified and unspecified degradation products above the reporting threshold.

The preferred terms applicable to organic impurities procedures are “impurity” and “total impurities” in the drug substance monographs and “degradation product” and “total degradation products” in the drug product monographs. Only if the drug substance process-related impurities are included in the drug product organic impurities procedure should the term “impurity” be used and the total be expressed as “total impurities”. Drug substance process-related impurities also detected in the drug product and included in its specification may include a note that certain drug substance process-related impurities are listed for information only and should not be included in the “total degradation products”. When this note is included, the total degradation products should only include all specified and unspecified impurities/degradation products above the reporting threshold, with the exception of these designated process-related impurities.

Some monographs may state “disregard any peak below [… certain value]” in chromatographic tests. Typically, the disregard limit for substances covered by a monograph is set in accordance with the reporting threshold given in ⟨476⟩. In this context, the disregard limit is the decision criterion (the numerical value) for the user whether a peak response of an impurity is to be included or excluded in the total impurities.

In chromatographic tests, during quantitation, peaks caused by solvents and reagents or arising from the mobile phase or the sample matrix shall be disregarded, as well as other peaks that the monograph explicitly states are to be disregarded. When the impurity test prescribes the total of impurities or there is a quantitative determination of an impurity, choice of an appropriate threshold setting and appropriate conditions for the integration of the peak areas is important. Principles from ⟨621⟩, ⟨1225⟩, and ⟨1226⟩, such as signal-to-noise ratio, quantification limit, and quantitation methods, should be observed. The quantitation limit for the analytical procedure should be NMT (≤) the reporting threshold.

GLOSSARY

Degradation product: An impurity resulting from a chemical change in the drug substance brought about during manufacturing and/or storage of the drug substance or drug product by the effect of, for example, light, temperature, pH, water, or by reaction with an excipient and/or the immediate container–closure system.

Disregard limit: See *Reporting threshold*. [NOTE—It may appear in a monograph as “disregard any peak below [.. certain value]”.]

Drug substance process-related impurity: An impurity generated during drug substance manufacturing. Process-related impurities may include starting materials, byproducts, intermediates, reagents, ligands, and catalysts. In this chapter, it is also called “process impurity”.

Identification threshold: A limit above which an impurity should be identified (i.e., its structural characterization).

Identified impurity/degradation product: An impurity or degradation product for which the structural characterization has been achieved.

Impurity: For a drug substance, any component of the drug substance that is not the chemical entity that is defined as the drug substance; for a drug product, any component of a drug product that is not the drug substance or an excipient in the drug product.

Qualification: The process of acquiring and evaluating data that establish the biological safety of an individual impurity or a given impurity profile at the level(s) specified.

www.webofpharma.com

Qualification threshold: A limit above which an impurity should be qualified.

Reporting threshold: In chromatographic tests, the limit above which an impurity should be reported and should be taken into account for calculating total impurities/total degradation products. Synonyms include "reporting level" and "reporting limit". The older term "disregard limit" still appears in some *USP–NF* monographs; however, the ICH Q3 term "reporting threshold" is preferred. Peak responses must be corrected by the relative response factor when the information is provided in the individual monograph.

Specified impurity/degradation product: An impurity or degradation product that is individually listed and limited with an acceptance criterion in the drug substance or drug product monograph. A specified impurity or specified degradation product can be either identified or unidentified.

Total impurities/total degradation products: In a drug substance monograph, "total impurities" are the sum of all specified and unspecified impurities above the reporting threshold. Unless otherwise indicated, "total degradation products" in a drug product monograph are the sum of all specified and unspecified degradation products above the reporting threshold. Drug substance process-related impurities also detected in the drug product and included in its specification may include a note that certain drug substance process-related impurities are listed only for information and should not be included in the total degradation products. When this note is included, the total degradation products should only include all specified and unspecified impurities/degradation products above the reporting threshold, with the exception of these designated process-related impurities. For drug product monographs, the term "total degradation products" is considered a synonym to "total impurities", with "total degradation products" being a preferred term.

Unidentified impurity/unidentified degradation product: An impurity or degradation product for which structural characterizations has not been achieved and that is identified solely by qualitative analytical properties (e.g., chromatographic retention times).

Unspecified impurity/degradation product: An impurity or degradation product that is not individually listed with its own specific acceptance criterion in the drug substance or drug product monograph. In Pharmacopeial monographs, any impurity/degradation product that is not individually listed is considered "unspecified" and is limited by a general acceptance criterion. Synonyms for "unspecified impurity/degradation product" include "other impurity/degradation product" or "other individual impurity/degradation product", with "unspecified impurity/degradation product" being preferred terms.

APPENDIX

Appendix 1: Additional Sources of Information and Guidance

1. International Council for Harmonisation. Q3A(R2) Impurities in new drug substances. 2006. https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf. Accessed 6 September 2017.
2. International Council for Harmonisation. Q3B(R2) Impurities in new drug products. 2006. https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf. Accessed 6 September 2017.
3. International Council for Harmonisation. Q6A Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances. 1999. https://database.ich.org/sites/default/files/Q6A%20Guideline.pdf. Accessed 6 September 2017.
4. International Council for Harmonisation. M7 Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. 2017. https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf. Accessed 6 September 2017.
5. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry. NDAs: impurities in drug substances. 2000. http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070577.pdf. Accessed 6 September 2017.
6. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry. ANDAs: impurities in drug products. 2010. http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072861.pdf. Accessed 6 September 2017.
7. *Organic Impurities in Drug Substances and Drug Products* ⟨476⟩. USP. In: *Pharm Forum* 43(6) [Nov.–Dec. 2017]. Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention; 2017. http://www.usppf.com.
8. Consumer Healthcare Products Association. Your Health at Hand Book: Guide to OTC Active Ingredients in the United States. 2010. http://www.yourhealthathand.org/images/uploads/Your_Health_at_Hand_Book.pdf. Accessed 6 September 2017.▲ (USP 1-May-2021)

www.webofpharma.com

Annexe 2. Contrôle des impuretés organiques dans les substances actives et produits finis USP <476>

Printed on: Wed Feb 08 2023, 11:00:31 PM(EST)
Printed by: Dang Van Vu
Do Not Distribute
Status: Currently Official on 09-Feb-2023
Official Date: Official as of 01-May-2021
DOI Ref: x3p5x
DocId: GUID-18BE4BBA-AE06-4F63-AAC9-583B27206546_2_en-US
Document Type: GENERAL CHAPTER
DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M8446_02_01
@2023 USPC

Add the following:

▲⟨476⟩ CONTROL OF ORGANIC IMPURITIES IN DRUG SUBSTANCES AND DRUG PRODUCTS

INTRODUCTION

This chapter covers requirements for controlling drug-related organic impurities in drug substances and drug products described in *USP* monographs. A threshold-based approach described in the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q3A(R2) *Impurities in New Drug Substances* and Q3B(R2) *Impurities in New Drug Products* guidelines may be used for the control of organic impurities in drug substances or drug products generated during the manufacturing process and/or storage. (For additional information and definition of terms, see *Impurities in Drug Substances and Drug Products* ⟨1086⟩.)

This chapter applies to drug substances and drug products described in the *USP* when referenced in the individual monograph. This chapter addresses organic impurities arising during the manufacturing process and/or storage of the drug substance. Also the chapter covers those impurities in drug products classified as degradation products of the drug substance or reaction products of the drug substance with an excipient and/or immediate container–closure system (collectively referred to as "degradation products").

This chapter does not cover veterinary products, biological/biotechnological products, peptides, oligonucleotides, fermentation products and semisynthetic products derived from them, polymorphic forms, radiopharmaceuticals, herbal products, or crude products of animal or plant origin. In addition, inorganic/elemental impurities, residual solvents, impurities in excipients, and leachables from the container–closure system are out of the scope of this chapter.

This chapter does not cover mutagenic impurities as described in ICH Guideline M7(R1) *Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk*.

ANALYTICAL PROCEDURES FOR IMPURITIES

Manufacturers shall validate or verify, as appropriate, analytical procedures and must demonstrate their suitability for the detection and quantitation of impurities in drug substances and drug products. Manufacturers shall develop acceptance criteria for impurities that are justified by appropriate safety considerations and consistent with current applicable regulatory guidances.

For impurities known or suspected to be unusually toxic (e.g., mutagenic impurities) or to produce undesired pharmacological effects, the limit of detection and limit of quantitation of the analytical procedures shall be commensurate with the acceptance criteria and the current applicable regulatory guidances to ensure patient safety.

REPORTING IMPURITIES

The reporting threshold can be established using current applicable regulatory guidances or other acceptable scientific means. The preferred terms applicable to organic impurities procedures are "impurity" and "total impurities" in the drug substance monographs and "degradation product" and "total degradation products" in the drug product monographs. Impurities presenting above the reporting threshold shall be reported according to the relevant analytical procedure.

Impurity results shall be reported as numerical values and rounded according to conventional rules (see *General Notices, 7.20. Rounding Rules*). All impurities at a level greater than (>) the reporting threshold shall be summed and reported as a value for total impurities, unless otherwise indicated in the monograph.

IDENTIFICATION OF IMPURITIES

Impurities present above the identification threshold for drug substances and drug products at release and on storage shall be investigated and all reasonable attempts shall be made to identify these impurities. The identification threshold can be established using current applicable regulatory guidances or other acceptable scientific means. Lower thresholds may be required for impurities known or suspected to be unusually toxic (e.g., mutagenic impurities) or to produce undesired pharmacological effects. Higher thresholds may be applied if scientifically justified, according to ICH Q3A(R2) and ICH Q3B(R2).

QUALIFICATION OF IMPURITIES

Qualification is the process of establishing the biological safety of impurities at the specified level(s). Qualification of impurities shall be based on a combination of factors including safety, intended use, applicable guidances, and scientific rationale.

SETTING ACCEPTANCE CRITERIA FOR IMPURITIES

Acceptance criteria shall be set for all impurities present above the reporting thresholds for drug substances and drug products. Specified impurities/degradation products can be either identified or unidentified. Specified identified impurities/degradation products should be included along with specified unidentified impurities/degradation products estimated to be

www.webofpharma.com

present at a level greater than (>) the identification threshold. Unspecified impurities/degradation products are limited by a general acceptance criterion, which is NMT (≤) the identification threshold and NLT (>) the reporting threshold. A rationale for the inclusion or exclusion of impurities in the specification should be documented. The acceptance criteria shall be based on applicable guidances or other acceptable scientific means, with safety as the primary consideration and not solely based on process capability.

A monograph for a drug substance shall include acceptance criteria for the following, where applicable:

- Each specified identified impurity
- Each specified unidentified impurity
- Any unspecified impurity with an acceptance criterion of NMT the identification threshold
- Total impurities

Unless otherwise indicated, total impurities in the drug substance monographs are the sum of all specified (identified and unidentified) and unspecified impurities above the reporting threshold.

A monograph for a drug product shall include acceptance criteria for the following, where applicable:

- Each specified identified degradation product
- Each specified unidentified degradation product
- Any unspecified degradation product with an acceptance criterion of NMT the identification threshold
- Total degradation products

Unless otherwise indicated, total degradation products in the drug product monographs are the sum of all specified and unspecified degradation products above the reporting threshold.

The preferred terminology applicable to organic impurities procedures is “impurity” and “total impurities” in the drug substance monographs, and “degradation product” and “total degradation products” in the drug product monographs, respectively. Drug substance process impurities need not be controlled in the drug product unless they are also degradation products. However, in some cases drug substance process-related impurities may be included in the drug product specifications, if appropriate, and limited by appropriate acceptance criteria. Drug substance process-related impurities also detected in the drug product and included in its specification may have a note that certain drug substance process-related impurities are listed only for information and should not be included in the total degradation products. When this note is included, the total degradation products should only include all specified and unspecified impurities/degradation products above the reporting threshold, with the exception of these designated process-related impurities.

Acceptance criteria for impurities (including unusually toxic, for example, mutagenic impurities) should be supported by appropriate toxicological evaluation, using current applicable guidances. Lower thresholds may be required for impurities known or suspected to be unusually toxic.

ORGANIC IMPURITIES IN DRUG SUBSTANCES

Organic impurities in drug substances arising from the manufacturing process and/or storage should be controlled. A rationale for the inclusion or exclusion of impurities in the specification should be documented. The organic impurities to be controlled in the drug substance are the process-related impurities and degradation products. They can be identified or unidentified. Process-related impurities are generated during drug substance manufacturing, such as byproducts, residual starting materials, intermediates, reagents, and ligands. Impurities that increase over time on storage are considered degradation products.

When there are changes to the chemistry, manufacturing, and/or controls of the drug substance (e.g., a different manufacturer or manufacturing site, scale/equipment, starting materials, synthetic pathways, and/or purification steps) described in a monograph, they should be evaluated to determine if the differences affect the impurity profile listed in the existing monograph. If the individual monograph does not include a procedure for quantifying an impurity or acceptance criterion for an observed impurity, the manufacturer is responsible for developing and validating analytical procedures and then establishing appropriate acceptance criterion. USP requests submission of the alternative/new procedure to evaluate for potential inclusion in the appropriate monograph(s).

A threshold-based approach as described in ICH Q3A(R2) may be used for the reporting, identification, and/or qualification of impurities in drug substances. Because toxicity is a dose-related phenomenon, the thresholds are set based on the amount of drug substance administered per day (see *Table 1*). Lower thresholds can be appropriate if the impurity is unusually toxic or produces undesirable pharmacological effects.

Table 1. ICH Recommended Thresholds for Impurities in Drug Substances

Maximum daily dose	≤2 g	>2 g
Reporting threshold	0.05%	0.03%
Identification threshold	0.10% (1.0 mg)[a]	0.05%
Qualification threshold	0.15% (1.0 mg)[a]	0.05%

[a] The total daily intake (TDI; in parentheses) applies if it is lower than the calculated value.

Principles for Setting Acceptance Criteria for Impurities in drug substances are discussed in this chapter and also in ICH guidelines and FDA guidances for New Drug Applications (NDAs) and Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). The acceptance criteria shall be based on applicable guidances or other acceptable scientific means, with safety as the primary consideration and not solely based on process capability.

www.webofpharma.com

ORGANIC IMPURITIES IN DRUG PRODUCTS

Usually, the organic impurities to be controlled in the drug product are only the degradation products resulting from the degradation of the drug substance or the interaction of the drug substance with excipients and/or the primary packaging configuration. They can be identified or unidentified. A rationale for the inclusion or exclusion of impurities in the specification should be documented. Drug substance process-related impurities need not be monitored or specified in drug products unless they are also degradation products.

A threshold-based approach as described in ICH Q3B(R2) may be used for the reporting, identification, and/or qualification of impurities in drug products. Because the toxicity is dose-related, the thresholds are based on the amount of drug substance administered per day (see *Table 2*). The amount of drug substance administered per day is based upon the manufacturer's maximum recommended labeled dosage per day. Lower thresholds can be appropriate if the degradation product is unusually toxic or produces undesirable pharmacological effects.

Table 2. ICH Recommended Thresholds for Degradation Products in Drug Products

Maximum daily dose	<1 mg	≥1 to <10 mg	10 mg	>10–100 mg	>100 mg–1 g	>1–2 g	>2 g
Reporting threshold	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.05%	0.05%
Identification threshold	1.0% (5 µg)[a]	0.5% (20 µg)[a]	0.5% (20 µg)[a]	0.2% (2 mg)[a]	0.2% (2 mg)[a]	0.2% (2 mg)[a]	0.10%
Qualification threshold	1.0% (50 µg)[a]	1.0% (50 µg)[a]	0.5% (200 µg)[a]	0.5% (200 µg)[a]	0.2% (3 mg)[a]	0.2% (3 mg)[a]	0.15%

[a] Whichever is lower, calculated value or TDI (in parentheses).

Principles for Setting Acceptance Criteria for Impurities in drug products are discussed in this chapter and also in ICH guidelines and FDA guidances for NDAs and ANDAs. The acceptance criteria shall be based on applicable guidances or other acceptable scientific means, with safety as the primary consideration and not solely based on process capability. In cases of complex impurity profiles, limits may be established based on the grouping of impurities, if appropriate and scientifically justified [according to ICH Q3B(R2)].

For drug products that contain multiple drug substances, degradation products from each active ingredient should be controlled. Manufacturers should provide rationale and supporting data to justify the acceptance criteria for impurities associated with each drug substance, as applicable. ▲ (USP 1-May-2021)

Official

www.webofpharma.com

Annexe 3. Monographies de produits finis (PF) contenant des substances actives chimiquement définies : principes généraux



Monographies de produits finis (PF) contenant des substances actives chimiquement définies : principes généraux

Ce document a pour objectif de fournir aux utilisateurs des indications sur la façon d'interpréter et d'appliquer les futures monographies individuelles de produits finis (« monographies PF »). Il doit être lu en conjonction avec les *Prescriptions générales* de la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.), ainsi qu'avec la monographie relative à la forme pharmaceutique considérée et la monographie générale *Préparations pharmaceutiques (2619)*.

Les spécifications des monographies reposent sur l'examen des médicaments approuvés dans les Etats membres. Néanmoins, la capacité des spécifications d'une monographie PF à contrôler correctement la qualité du produit fini doit être démontrée dans la demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Sauf indication contraire, les monographies PF couvrent (lorsque cela est possible) plusieurs formulations et dosages d'une même forme pharmaceutique, contenant la même substance active (principe actif).

La Commission européenne de Pharmacopée (« la Commission ») élabore exclusivement des monographies PF pour des produits qui sont autorisés dans au moins un des Etats signataires de la *Convention relative à l'élaboration d'une Pharmacopée européenne* et qui contiennent une substance active couverte par une monographie de la Ph. Eur. (publiée ou inscrite au programme de travail). De même que pour les autres monographies de la Ph. Eur., l'élaboration et la révision de monographies PF comprend une procédure d'enquête publique, et prend en compte l'état des connaissances scientifiques et l'ensemble des médicaments autorisés. Les normes qualité représentées par les monographies ne sont valables que si la production s'effectue dans le cadre d'un système qualité approprié. Le système qualité doit apporter la garantie que ces produits satisfont de façon reproductible aux exigences de la Pharmacopée.

La Commission a décidé de se consacrer, dans un premier temps, à l'élaboration de monographies portant sur des produits encore sous brevet, mais présentant un intérêt élevé en matière de santé publique. Il n'est cependant pas exclu que la Commission envisage d'élaborer également des monographies sur des produits multisources. Avant toute addition au programme de travail, elle procèderait alors à une évaluation critique de la question en prêtant tout spécialement attention à :

- l'utilité de l'élaboration d'une monographie de la Ph. Eur., par exemple, dans l'objectif d'une harmonisation internationale ou pour des questions de santé publique,
- l'impact sur d'autres produits déjà enregistrés.

Procédures d'essai. La formulation et/ou le procédé de fabrication pouvant affecter le choix des procédures analytiques, il est nécessaire d'apporter la démonstration que les procédures d'essai décrites dans une monographie PF sont appropriées pour le produit fini considéré. Cette démonstration doit être documentée dans la demande d'AMM, et l'évaluation des données afférentes fait partie de la procédure d'AMM.

Spécifications à péremption ou spécifications à libération. Les spécifications contenues dans les monographies PF sont applicables pendant toute la durée de conservation. Par ailleurs, en Europe, le

demandeur d'une AMM doit proposer des spécifications de libération dans le dossier d'AMM, selon les législations nationales ou régionales applicables en la matière.

Différentes sections des monographies PF

Titre

Le titre est composé de la dénomination de la substance active et de la forme pharmaceutique. S'il existe une DCI (ou une DCIM dérivée), elle est généralement utilisée comme dénomination de la substance ; en l'absence de DCI ou de DCIM, il est admis d'utiliser une dénomination non commerciale nationale (BAN, par exemple) ou une autre dénomination établie appropriée. La désignation adoptée pour la forme pharmaceutique est issue de la monographie générale couvrant cette forme pharmaceutique et de la liste des Termes normalisés.

Essai des substances apparentées

Conformément aux *guidelines* ICH Q6A, *Specifications : Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products : Chemical Substances*, et ICH Q3B R2, *Impurities in new drug products*, les monographies PF limitent les produits de dégradation apparus au cours de la fabrication du produit fini ou pendant sa durée de vie, y compris les impuretés de synthèse qui sont également des produits de dégradation. Dans certaines circonstances, il est également nécessaire d'identifier d'autres impuretés de synthèse dans le produit fini, par exemple lorsqu'elles y sont détectées par l'essai des substances apparentées à une teneur supérieure au seuil de déclaration spécifié. A cette fin, la monographie PF indique comment identifier les impuretés de synthèse connues, afin de ne pas les déclarer et de pouvoir les exclure de la somme des impuretés.

Les monographies PF n'ont pas pour objet de contrôler les impuretés de synthèse qui ne sont pas des produits de dégradation. Toutefois, les méthodes prescrites par la monographie PF peuvent être utilisées pour contrôler les impuretés de synthèse dont on sait qu'elles sont détectées par la monographie PF, si elles ont été validées à cette fin.

Tout comme dans le cas des monographies de substances actives, les exigences de la Ph. Eur. concernant les produits finis ne sont pas conçues pour couvrir toutes les impuretés possibles. Il ne faut pas présumer, par exemple, qu'une impureté non détectable par les essais prescrits est tolérée, si le bon sens et les bonnes pratiques pharmaceutiques exigent qu'elle soit absente. Des contrôles supplémentaires peuvent donc être requis pour la détection de produits de dégradation autres que ceux contrôlés par la monographie PF de la Ph. Eur. (par exemple des produits de dégradation liés à la nature des excipients ou des récipients utilisés, ou associés à un procédé de fabrication différent). Il incombe au demandeur de l'AMM d'évaluer sur quelles impuretés doivent porter les contrôles. Cette évaluation doit faire partie du dossier d'AMM instruit par les autorités compétentes.

Essai de dissolution

Si la monographie PF spécifie une procédure d'essai (conditions opératoires, limites et critères d'acceptation), celle-ci est d'application obligatoire, sauf indication contraire dans la monographie (« sauf exception justifiée et autorisée »). L'essai de dissolution et les limites associées doivent être suffisamment discriminants pour permettre de s'assurer de la reproductibilité de lot à lot et, le cas échéant, de la reproductibilité par rapport aux lots dont l'efficacité a été établie.

L'essai de dissolution décrit dans les monographies PF n'a pas pour objet de servir à démontrer la bioéquivalence ou à comparer des profils de dissolution en cas de dispense de la démonstration de bioéquivalence (*biowaiver*) ; il ne peut donc pas remplacer cette démonstration ou comparaison au produit

de référence dans le dossier d'AMM. L'essai de dissolution décrit dans les monographies PF est exclusivement destiné aux contrôles qualité (reproductibilité de lot à lot).

Comme exposé dans le *guideline* ICH Q6A, il est admis de remplacer l'essai de dissolution par un essai de désagrégation dans le cas de produits à dissolution rapide contenant des substances actives de solubilité élevée sur l'ensemble de l'intervalle physiologique. Lorsqu'une monographie prescrit un essai de désagrégation au lieu d'un essai de dissolution, les autorités d'enregistrement peuvent exiger qu'il soit démontré dans le dossier d'AMM que la relation entre désagrégation et dissolution a été établie sur toute la durée de vie du médicament, ou que la désagrégation constitue un essai plus discriminant que la dissolution. Le choix entre essai de dissolution ou essai de désagrégation est supposé être fondé dans le dossier d'AMM sur des données de développement relatives à la robustesse de la formulation et du procédé de fabrication (réf. ICH Q6A).

Impuretés

Cette section répertorie toutes les impuretés, quelle qu'en soit l'origine, dont on sait qu'elles sont détectées par les essais de la monographie.

La dénomination des impuretés déjà répertoriées dans la monographie de la substance active reste inchangée. Les impuretés spécifiquement associées au produit fini sont désignées par la mention « FP » suivie d'une lettre de l'alphabet, pour éviter toute confusion avec les impuretés mentionnées dans la monographie de la substance active.

Annexe 4. Résumé des caractéristiques du produit TOPLEXIL, 0,33 mg/ml, sirop

RÉSUMÉ DES CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT

ANSM - Mis à jour le : 15/02/2024

1. DENOMINATION DU MEDICAMENT

TOPLEXIL 0,33 mg/ml, sirop

2. COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

Oxomémazine..... 0,033 g

Pour 100 ml de sirop

Excipients à effet notoire : saccharose, sodium.

Pour la liste complète des excipients, voir rubrique 6.1.

3. FORME PHARMACEUTIQUE

Sirop.

4. DONNEES CLINIQUES

4.1. Indications thérapeutiques

Traitement symptomatique des toux non productives gênantes en particulier à prédominance nocturne.

4.2. Posologie et mode d'administration

Posologie

RESERVE A L'ADULTE ET A L'ENFANT DE PLUS DE 2 ANS.

Chez l'adulte : 10 ml par prise, 4 fois par jour.

Population pédiatrique

Chez l'enfant : la posologie quotidienne est fonction du poids de l'enfant (1 ml de sirop par kg de poids corporel et par jour), soit à titre indicatif :

- Enfant de 13 à 20 kg (soit 2 à 6 ans) : 5 ml par prise, 2 à 3 fois par jour,
- Enfant de 20 à 30 kg (soit 6 à 10 ans) : 10 ml par prise, 2 à 3 fois par jour,
- Enfant de 30 à 40 kg (soit 10 à 12 ans) : 10 ml par prise, 3 à 4 fois par jour

- Enfant de plus de 40 kg (soit 12 ans) : 10 ml par prise, 4 fois par jour.

Les prises sont à renouveler en cas de besoin et espacées de 4 heures minimum.

Mode d'administration

Voie orale. Utiliser le gobelet doseur.
Il convient de privilégier les prises vespérales en raison de l'effet sédatif, surtout en début de traitement, de l'oxomémazine.

4.3. Contre-indications

Ce médicament est CONTRE-INDIQUE dans les cas suivants :

- Hypersensibilité à l'un des constituants, et notamment aux antihistaminiques,
- En raison de la présence d'oxomémazine
  - nourrisson (moins de 2 ans) (voir rubrique 4.4),
  - antécédents d'agranulocytose,
  - risque de rétention urinaire liée à des troubles urétro-prostatiques,
  - risque de glaucome par fermeture de l'angle,
- En association avec la cabergoline et le quinagolide (voir rubrique 4.5).

4.4. Mises en garde spéciales et précautions d'emploi

Les toux productives, qui sont un élément fondamental de la défense bronchopulmonaire, sont à respecter.
Il est illogique d'associer un expectorant ou un mucolytique à ce médicament antitussif.
Avant de prescrire un traitement antitussif, il convient de rechercher les causes de la toux qui requièrent un traitement spécifique.
Si la toux résiste à un antitussif administré à une posologie usuelle, on ne doit pas procéder à une augmentation des doses, mais à un réexamen de la situation clinique.

Liées à la présence d'oxomémazine :

Dans la mesure où les phénothiazines ont été considérées comme d'hypothétiques facteurs de risque dans la survenue de mort subite du nourrisson, l'oxomémazine ne doit pas être utilisée chez l'enfant de moins de 2 ans.
La surveillance (clinique et éventuellement électrique) doit être renforcée chez les épileptiques en raison de la possibilité d'abaissement du seuil épileptogène.
Le risque d'abus et de pharmacodépendance est faible. Toutefois, des cas d'abus et de pharmacodépendance ont été rapportés principalement chez des adultes après mésusage de l'oxomémazine à visée sédative. La survenue de signes ou symptômes évoquant un usage abusif ou une dépendance à l'oxomémazine doit faire l'objet d'une surveillance attentive.

L'oxomémazine doit être utilisée avec prudence :

- Chez le sujet âgé présentant :
  - une plus grande sensibilité à l'hypotension orthostatique, aux vertiges et à la sédation,
  - une constipation chronique (risque d'iléus paralytique),
  - une éventuelle hypertrophie prostatique.
- Chez les sujets porteurs de certaines affections cardio-vasculaires, en raison des effets tachycardisants et hypertenseurs des phénothiazines.
- En cas d'insuffisance hépatique et/ou rénale sévères (en raison du risque d'accumulation).

En cas d'utilisation chez l'enfant, il convient d'éliminer un asthme bronchique ou un reflux gastro-œsophagien avant d'utiliser l'oxomémazine comme antitussif.

La prise de boissons alcoolisées ou de médicaments contenant de l'alcool (voir rubrique 4.5) est fortement déconseillée pendant la durée du traitement.

Compte-tenu de l'effet photosensibilisant des phénothiazines, il est préférable de ne pas s'exposer au soleil pendant le traitement.

Les antihistaminiques H1 doivent être utilisés avec prudence en raison du risque de sédation. L'association avec d'autres médicaments sédatifs doit être déconseillée (voir rubrique 4.5).

Liées à la présence d'excipients à effet notoire :

Ce médicament contient du saccharose. Son utilisation est déconseillée chez les patients présentant une intolérance au fructose, un syndrome de malabsorption du glucose et du galactose ou un déficit en sucrase/isomaltase.

Ce médicament contient 3,7 g de saccharose par prise de 5 ml et 7,3 g par prise de 10 ml dont il faut tenir compte dans la ration journalière en cas de régime pauvre en sucre ou de diabète.

Ce médicament contient moins de 1 mmol (23 mg) de sodium par dose de 10 ml, c'est-à-dire qu'il est essentiellement « sans sodium ».

4.5. Interactions avec d'autres médicaments et autres formes d'interactions

Médicaments abaissant le seuil épileptogène

L'utilisation conjointe de médicaments proconvulsivants, ou abaissant le seuil épileptogène, devra être soigneusement pesée, en raison de la sévérité du risque encouru. Ces médicaments sont représentés notamment par la plupart des antidépresseurs (imipraminiques, inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine), les neuroleptiques (phénothiazines et butyrophénones), la méfloquine, la chloroquine, le bupropion, le tramadol.

Médicaments atropiniques

Il faut prendre en compte le fait que les substances atropiniques peuvent additionner leurs effets indésirables et entraîner plus facilement une rétention urinaire, une poussée aiguë de glaucome, une constipation, une sécheresse de la bouche, etc…

Les divers médicaments atropiniques sont représentés par les antidépresseurs imipraminiques, la plupart des antihistaminiques H1 atropiniques, les antiparkinsoniens anticholinergiques, les antispasmodiques atropiniques, le disopyramide, les neuroleptiques phénothiaziniques ainsi que la clozapine.

Médicaments sédatifs

Il faut prendre en compte le fait que de nombreux médicaments ou substances peuvent additionner leurs effets dépresseurs du système nerveux central et contribuer à diminuer la vigilance. Il s'agit des dérivés morphiniques (analgésiques, antitussifs et traitements de substitution), des neuroleptiques, des barbituriques, des benzodiazépines, des anxiolytiques autres que les benzodiazépines (par exemple, le méprobamate), des hypnotiques, des antidépresseurs sédatifs (amitriptyline, doxépine, miansérine, mirtazapine, trimipramine), des antihistaminiques H1 sédatifs, des antihypertenseurs centraux, du baclofène et du thalidomide.

Associations contre-indiquées

- Dopaminergiques, hors Parkinson (cabergoline, quinagolide) : Antagonisme réciproque de l'agoniste dopaminergique et des neuroleptiques.

Associations déconseillées

- Autres médicaments sédatifs : Potentialisation de l'effet sédatif des antihistaminiques H1.

- Consommation d'alcool : Majoration par l'alcool de l'effet sédatif de ces substances. L'altération de la vigilance peut rendre dangereuses la conduite de véhicules et l'utilisation de machines. Eviter la prise de boissons alcoolisées et de médicaments contenant de l'alcool.

Associations faisant l'objet de précautions d'emploi

- Topiques gastro-intestinaux, antiacides et charbon : Diminution de l'absorption digestive des neuroleptiques phénothiaziniques. Prendre les topiques gastro-intestinaux et antiacides à distance des neuroleptiques phénothiaziniques (plus de 2 heures, si possible).

Associations à prendre en compte

- Antihypertenseurs : Majoration du risque d'hypotension, notamment orthostatique.

- Bêta-bloquants (sauf esmolol et sotalol) : Effet vasodilatateur et risques d'hypotension, notamment orthostatique (effet additif).

- Bêta-bloquants dans l'insuffisance cardiaque (bisoprolol, carvédidol, métoprolol, nébivolol) : effet vasodilatateur et risques d'hypotension, notamment orthostatique (effet additif).

- Dérivés nitrés et apparentés : Majoration du risque d'hypotension, notamment orthostatique.

4.6. Fertilité, grossesse et allaitement

La présence d'oxomémazine conditionne la conduite à tenir pendant la grossesse et l'allaitement.

Grossesse

Aspect malformatif :

Il n'y a pas de données fiables de tératogenèse chez l'animal.

Il n'existe pas actuellement de données suffisamment pertinentes pour évaluer un éventuel effet malformatif ou foetotoxique de l'oxomémazine lorsqu'elle est administrée pendant la grossesse.

Aspect foetotoxique :

Chez les nouveaux-nés de mères traitées au long cours par de fortes posologies de médicaments anticholinergiques ont été rarement décrits des signes digestifs liés aux propriétés atropiniques (distension abdominale, iléus méconial, retard à l'émission du méconium, difficulté de la mise en route de l'alimentation, tachycardies, troubles neurologiques…).

Compte-tenu de ces données, l'utilisation de ce médicament est déconseillée au cours du premier trimestre de la grossesse. Il ne sera prescrit que si nécessaire par la suite, en se limitant au 3ème trimestre, à un usage ponctuel.

Si l'administration de ce médicament a eu lieu en fin de grossesse, il semble justifié d'observer une période de surveillance des fonctions neurologiques et digestives du nouveau-né.

Allaitement

Le passage de l'oxomémazine dans le lait maternel n'est pas connu. Compte-tenu des possibilités de sédation ou d'excitation paradoxale du nouveau-né, et plus encore des risques d'apnée du sommeil évoqués avec les phénothiazines, ce médicament est déconseillé en cas d'allaitement.

4.7. Effets sur l'aptitude à conduire des véhicules et à utiliser des machines

L'attention est appelée, notamment chez les conducteurs de véhicules et les utilisateurs de machines, sur les risques de somnolence attachés à l'emploi de ce médicament, surtout en début de traitement. Ce phénomène est accentué par la prise de boissons alcoolisées ou de médicaments contenant de l'alcool.

4.8. Effets indésirables

Les caractéristiques pharmacologiques de la molécule d'oxomémazine sont à l'origine d'effets indésirables d'inégale intensité et liés ou non à la dose (voir rubrique 5.1) :

Effets neurovégétatifs :

- sédation ou somnolence, plus marquée en début de traitement ;
- effets anticholinergiques à type de sécheresse des muqueuses, constipation, troubles de l'accommodation, mydriase, palpitations cardiaques, risque de rétention urinaire ;

- hypotension orthostatique ;
- troubles de l'équilibre, vertiges, baisse de la mémoire ou de la concentration (plus fréquent chez le sujet âgé) ;
- incoordination motrice, tremblements ;
- confusion mentale, hallucinations ;
- plus rarement, effets à type d'excitation : agitation, nervosité, insomnie.

Affections psychiatriques :

- abus/dépendance médicamenteuse (voir rubrique 4.4) (fréquence indéterminée).

Réactions de sensibilisation :

- érythèmes, eczéma, prurit, purpura, urticaire éventuellement géant,
- œdème, plus rarement œdème de Quincke,
- choc anaphylactique,
- photosensibilisation.

Affections hématologiques et du système lymphatique :

- leucopénie, neutropénie, agranulocytose exceptionnelle,
- anémie hémolytique,
- éosinophilie (fréquence indéterminée),
- thrombocytopénie, y compris purpura thrombocytopénique (fréquence indéterminée).

En raison de la présence de glycérol, risque de troubles digestifs et de diarrhée.

Déclaration des effets indésirables suspectés

La déclaration des effets indésirables suspectés après autorisation du médicament est importante. Elle permet une surveillance continue du rapport bénéfice/risque du médicament. Les professionnels de santé déclarent tout effet indésirable suspecté via le système national de déclaration : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) et réseau des Centres Régionaux de Pharmacovigilance - Site internet : https://signalement.social-sante.gouv.fr/.

4.9. Surdosage

Signes d'un surdosage en oxomémazine : convulsions (surtout chez l'enfant), troubles de la conscience, coma.
Un traitement symptomatique sera institué en milieu spécialisé.

5. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

5.1. Propriétés pharmacodynamiques

Classe pharmacothérapeutique : ANTIHISTAMINIQUES À USAGE SYSTÉMIQUE, code ATC : R06AD08

Oxomémazine : antihistaminique H1, phénothiazine à chaîne latérale aliphatique, qui se caractérise par :

- un effet sédatif marqué aux doses usuelles, d'origine histaminergique et adrénolytique centrale,
- un effet anticholinergique à l'origine d'effets indésirables périphériques,
- un effet adrénolytique périphérique, pouvant retentir au plan hémodynamique (risque d'hypotension orthostatique).

Les antihistaminiques ont en commun la propriété de s'opposer, par antagonisme compétitif plus ou moins réversible, aux effets de l'histamine notamment sur la peau, les bronches, l'intestin, et les vaisseaux.

5.2. Propriétés pharmacocinétiques

Les données de pharmacocinétique avec l'oxomémazine font défaut.

Pour l'ensemble des antihistaminiques, notamment phénothiaziniques, des éléments d'ordre général peuvent être apportés :

- La biodisponibilité est généralement moyenne.
- Le cas échéant, le métabolisme peut être intense, avec formation de nombreux métabolites, ce qui explique le très faible pourcentage de produit retrouvé inchangé dans les urines.
- La demi-vie est variable mais souvent prolongée, autorisant une seule prise quotidienne.
- La liposolubilité de ces molécules est à l'origine de la valeur élevée du volume de distribution.

Variation physiopathologique : risque d'accumulation des antihistaminiques chez les insuffisants rénaux ou hépatiques.

5.3. Données de sécurité préclinique

Sans objet

6. DONNEES PHARMACEUTIQUES

6.1. Liste des excipients

Benzoate de sodium, glycérol, acide citrique monohydraté, citrate de sodium, arôme composé caramel (caramel, résinoide de fénugrec, méthylcyclopenténolone hydratée,

maltol, acide butyrique, piperonal, diacétyle, éthylvanilline, vanilline, propylèneglycol, eau distillée) caramel (E150), saccharose liquide, eau purifiée.

6.2. Incompatibilités

Sans objet.

6.3. Durée de conservation

3 ans.

A conserver maximum six mois après la première ouverture du flacon.

6.4. Précautions particulières de conservation

Ce médicament ne nécessite pas de précautions particulières de conservation.

A conserver dans l'emballage primaire d'origine, à l'abri de la lumière.

Pour les conditions de conservation du médicament après première ouverture, voir la rubrique 6.3.

6.5. Nature et contenu de l'emballage extérieur

- 150 ml en flacon (verre brun type III) avec fermeture sécurité enfant et gobelet doseur (polypropylène).
- 200 ml en flacon (verre brun type III) avec fermeture sécurité enfant et gobelet doseur (polypropylène).
- 250 ml en flacon (verre brun type III) avec fermeture sécurité enfant et gobelet doseur (polypropylène).

Toutes les présentations peuvent ne pas être commercialisées.

6.6. Précautions particulières d'élimination et de manipulation

Pas d'exigences particulières pour l'élimination.

Tout médicament non utilisé ou déchet doit être éliminé conformément à la réglementation en vigueur.

7. TITULAIRE DE L'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE

OPELLA HEALTHCARE FRANCE SAS

157 AVENUE CHARLES DE GAULLE

92200 NEUILLY-SUR-SEINE

8. NUMERO(S) D'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE

- 34009 359 578 4 9 : 150 ml en flacon (verre brun) avec fermeture sécurité enfant et gobelet doseur (polypropylène).
- 34009 359 579 0 0 : 200 ml en flacon (verre brun) avec fermeture sécurité enfant et gobelet doseur (polypropylène).

- 34009 359 580 9 9 : 250 ml en flacon (verre brun) avec fermeture sécurité enfant et gobelet doseur (polypropylène).

9. DATE DE PREMIERE AUTORISATION/DE RENOUVELLEMENT DE L'AUTORISATION

[à compléter ultérieurement par le titulaire]

10. DATE DE MISE A JOUR DU TEXTE

[à compléter ultérieurement par le titulaire]

11. DOSIMETRIE

Sans objet.

12. INSTRUCTIONS POUR LA PREPARATION DES RADIOPHARMACEUTIQUES

Sans objet.

CONDITIONS DE PRESCRIPTION ET DE DELIVRANCE

Médicament non soumis à prescription médicale.

Annexe 5. Monographie de l'Alimemazine hemitartrate Ph Eur 11.0

for 3 min, cool, add 5 mL of *water R*, and shake with 15 mL of *di-isopropyl ether R*. Carry out a blank test. The upper layer obtained with the substance to be examined exhibits a deeper bluish-red colour than that obtained with the blank.

TESTS

Chlorides: maximum 1.0 per cent.

To 2.50 g add 50 mL of *dilute nitric acid R*, shake for 1 h and dilute to 100.0 mL with *dilute nitric acid R*. Filter. To 50.0 mL of the filtrate add 10.0 mL of *0.1 M silver nitrate* and 5 mL of *toluene R*. Titrate with *0.1 M ammonium thiocyanate*, using 2 mL of *ferric ammonium sulfate solution R2* as indicator and shaking vigorously towards the end-point.

1 mL of *0.1 M silver nitrate* is equivalent to 3.545 mg of Cl.

Loss on drying (*2.2.32*): maximum 15.0 per cent, determined on 0.1000 g by drying in an oven at 105 °C for 4 h.

Sulfated ash (*2.4.14*): maximum 8.0 per cent (dried substance), determined on 0.100 g.

Microbial contamination

TAMC: acceptance criterion 10^2 CFU/g (*2.6.12*).

Absence of *Escherichia coli* (*2.6.13*).

Absence of *Salmonella* (*2.6.13*).

ASSAY

To 0.2500 g add 25 mL of *water R*, 25.0 mL of *0.1 M sodium hydroxide* and 0.2 mL of *phenolphthalein solution R*. Titrate with *0.1 M hydrochloric acid*.

1 mL of *0.1 M sodium hydroxide* is equivalent to 4.502 mg of carboxyl groups ($-CO_2H$).

FUNCTIONALITY-RELATED CHARACTERISTICS

This section provides information on characteristics that are recognised as being relevant control parameters for one or more functions of the substance when used as an excipient (see chapter 5.15). Some of the characteristics described in the Functionality-related characteristics section may also be present in the mandatory part of the monograph since they also represent mandatory quality criteria. In such cases, a cross-reference to the tests described in the mandatory part is included in the Functionality-related characteristics section. Control of the characteristics can contribute to the quality of a medicinal product by improving the consistency of the manufacturing process and the performance of the medicinal product during use. Where control methods are cited, they are recognised as being suitable for the purpose, but other methods can also be used. Wherever results for a particular characteristic are reported, the control method must be indicated.

The following characteristics may be relevant for alginic acid used as disintegrant and/or binder.

Particle-size distribution (*2.9.31* or *2.9.38*).

Settling volume. Place 75 mL of *water R* in a 100 mL graduated cylinder and add 1.5 g of the substance to be examined in 0.5 g portions, shaking vigorously after each addition. Dilute to 100.0 mL with *water R* and shake again until the substance is homogeneously distributed. Allow to stand for 4 h and determine the volume of the settled mass.

The following characteristic may be relevant for alginic acid used as gelling agent or viscosity-increasing agent.

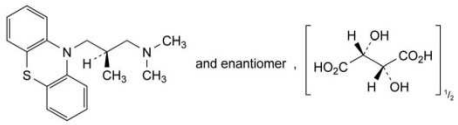
Apparent viscosity. Determine the dynamic viscosity using a rotating viscometer (*2.2.10*).

Prepare a 20 g/L suspension of alginic acid (dried substance) and add *0.1 M sodium hydroxide* until a solution is obtained.

01/2014:2650
corrected 10.0

ALIMEMAZINE HEMITARTRATE

Alimemazini hemitartras



$C_{20}H_{25}N_2O_3S$ M_r 373.5
[4330-99-8]

DEFINITION

(*2RS*)-*N*,*N*,2-Trimethyl-3-(10*H*-phenothiazin-10-yl)propan-1-amine hemi[(2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxybutanedioate].

Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or very slightly yellowish powder.

Solubility: freely soluble in water, sparingly soluble in ethanol (96 per cent), practically insoluble in toluene.

It deteriorates when exposed to air and light.

IDENTIFICATION

Infrared absorption spectrophotometry (*2.2.24*).

Comparison: *alimemazine hemitartrate CRS*.

TESTS

Appearance of solution. The solution is not more opalescent than reference suspension II (*2.2.1*) and not more intensely coloured than reference solution BY_5 (*2.2.2, Method II*).

Dissolve 1.0 g in *water R* and dilute to 10 mL with the same solvent.

pH (*2.2.3*): 5.0 to 6.5. *Carry out the test protected from light and use a freshly prepared solution.*

Dissolve 1.0 g in *carbon dioxide-free water R* and dilute to 50 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (*2.2.29*). *Carry out the test protected from light and use freshly prepared solutions.*

Solvent mixture: *acetonitrile R*, *water R* (20:80 *V/V*).

Test solution. Dissolve 35 mg of the substance to be examined in the solvent mixture and dilute to 100.0 mL with the solvent mixture.

Reference solution (a). Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the solvent mixture. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the solvent mixture.

Reference solution (b). Dissolve 3.5 mg of *alimemazine for system suitability CRS* (containing impurities A, B and C) in the solvent mixture and dilute to 10.0 mL with the solvent mixture.

Column:

- *size*: *l* = 0.15 m, Ø = 4.6 mm;
- *stationary phase*: *base-deactivated end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R* (3 µm);
- *temperature*: 40 °C.

Mobile phase: *acetonitrile R*, *methanol R*, 3.854 g/L solution of *ammonium acetate R* (10:40:50 *V/V/V*).

Flow rate: 1.3 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 253 nm.

Injection: 20 µL.

Run time: twice the retention time of alimemazine.

Identification of impurities: use the chromatogram supplied with *alimemazine for system suitability CRS* and the chromatogram obtained with reference solution (b) to identify the peaks due to impurities A, B and C.

Relative retention with reference to alimemazine (retention time = about 27 min): impurity A = about 0.1; impurity B = about 0.5; impurity C = about 1.4.

System suitability: reference solution (b):

- *resolution*: minimum 5.0 between the peaks due to alimemazine and impurity C.

Calculation of percentage contents:

- *correction factors*: multiply the peak areas of the following impurities by the corresponding correction factor: impurity A = 4.4; impurity C = 0.4;
- for each impurity, use the concentration of alimemazine hemitartrate in reference solution (a).

Limits:

- *impurity B*: maximum 0.3 per cent;
- *impurities A, C*: for each impurity, maximum 0.15 per cent;
- *unspecified impurities*: for each impurity, maximum 0.10 per cent;
- *total*: maximum 0.5 per cent;
- *reporting threshold*: 0.05 per cent.

Loss on drying (*2.2.32*): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C for 3 h.

Sulfated ash (*2.4.14*): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Dissolve 0.300 g in 50 mL of *anhydrous acetic acid R*. Titrate with *0.1 M perchloric acid*, determining the end-point potentiometrically (*2.2.20*).

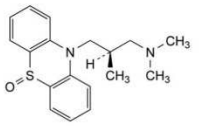
1 mL of *0.1 M perchloric acid* is equivalent to 37.35 mg of $C_{20}H_{25}N_2O_3S$.

STORAGE

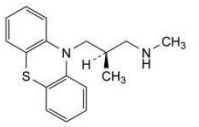
In an airtight container, protected from light.

IMPURITIES

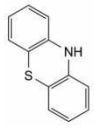
Specified impurities: A, B, C.



A. (2*RS*)-*N*,*N*,2-trimethyl-3-(5-oxido-10*H*-phenothiazin-10-yl)propan-1-amine,



B. (2*RS*)-*N*,2-dimethyl-3-(10*H*-phenothiazin-10-yl)propan-1-amine,

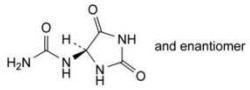


C. 10*H*-phenothiazine.

01/2008:1288
corrected 11.0

ALLANTOIN

Allantoinum



$C_4H_6N_4O_3$ M_r 158.1
[97-59-6]

DEFINITION

Allantoin contains not less than 98.5 per cent and not more than the equivalent of 101.0 per cent of (*RS*)-(2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)urea.

CHARACTERS

A white or almost white, crystalline powder, slightly soluble in water, very slightly soluble in ethanol (96 per cent).

It melts at about 225 °C, with decomposition.

IDENTIFICATION

First identification: A.

Second identification: B, C, D.

A. Examine by infrared absorption spectrophotometry (*2.2.24*), comparing with the spectrum obtained with *allantoin CRS*.

B. Examine the chromatograms obtained in the test for related substances. The principal spot in the chromatogram obtained with test solution (b) is similar in position, colour and size to the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution (a).

C. Boil 20 mg with a mixture of 1 mL of *dilute sodium hydroxide solution R* and 1 mL of *water R*. Allow to cool. Add 1 mL of *dilute hydrochloric acid R*. To 0.1 mL of the solution add 0.1 mL of a 100 g/L solution of *potassium bromide R*, 0.1 mL of a 20 g/L solution of *resorcinol R* and 3 mL of *sulfuric acid R*. Heat for 5 min to 10 min on a water-bath. A dark blue colour develops, which becomes red after cooling and pouring into about 10 mL of *water R*.

D. Heat about 0.5 g. Ammonia vapour is evolved, which turns *red litmus paper R* blue.

TESTS

Solution S. Dissolve 0.5 g in *carbon dioxide-free water R*, with heating if necessary, and dilute to 100 mL with the same solvent.

Acidity or alkalinity. To 5 mL of solution S add 5 mL of *carbon dioxide-free water R*, 0.1 mL of *methyl red solution R* and 0.2 mL of *0.01 M sodium hydroxide*. The solution is yellow. Add 0.4 mL of *0.01 M hydrochloric acid*. The solution is red.

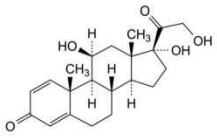
Optical rotation (*2.2.7*). The angle of optical rotation, determined on solution S, is – 0.10° to + 0.10°.

Reducing substances. Shake 1.0 g with 10 mL of *water R* for 2 min. Filter. Add 1.5 mL of *0.02 M potassium permanganate*. The solution must remain violet for at least 10 min.

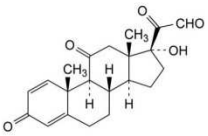
Related substances. Examine by thin-layer chromatography (*2.2.27*), using a suitable *cellulose for chromatography R* as the coating substance.

Test solution (a). Dissolve 0.10 g of the substance to be examined in 5.0 mL of *water R* with heating. Allow to cool.

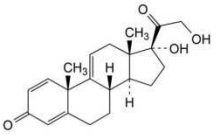
Annexe 6. Monographie de la promazine chlorhydrate Ph Eur 11.0



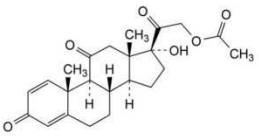
B. 11β,17,21-trihydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione (prednisolone),



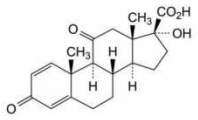
C. 17-hydroxy-3,11,20-trioxopregna-1,4-dien-21-al (prednisone-21-aldehyde),



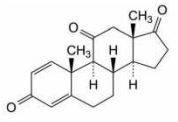
D. 17,21-dihydroxypregna-1,4,9(11)-triene-3,20-dione (deltacortinene),



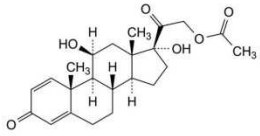
E. 17-hydroxy-3,11,20-trioxopregna-1,4-dien-21-yl acetate (prednisone acetate),



J. 17α-hydroxy-3,11-dioxoandrosta-1,4-diene-17β-carboxylic acid,



K. androsta-1,4-diene-3,11,17-trione,

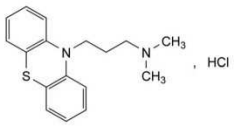


L. 11β,17-dihydroxy-3,20-dioxopregna-1,4-dien-21-yl acetate (prednisolone acetate).

07/2023:1365

PROMAZINE HYDROCHLORIDE

Promazini hydrochloridum



$C_{17}H_{21}ClN_2S$ M_r 320.9
[53-60-1]

DEFINITION

N,*N*-Dimethyl-3-(10*H*-phenothiazin-10-yl)propan-1-amine hydrochloride.

Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, slightly hygroscopic, crystalline powder.

Solubility: very soluble in water, in ethanol (96 per cent) and in methylene chloride.

mp: about 179 °C.

IDENTIFICATION

First identification: A, D.

Second identification: B, C, D.

A. Infrared absorption spectrophotometry (*2.2.24*).
Comparison: *promazine hydrochloride CRS*.

B. Identification test for phenothiazines by thin-layer chromatography (*2.3.3*): use *promazine hydrochloride CRS* to prepare the reference solution.

C. Dissolve about 5 mg in 2 mL of *sulfuric acid R* and allow to stand for 5 min. An orange colour is produced.

D. Dissolve 18 mg in 2 mL of *methanol R*. The solution gives reaction (a) of chlorides (*2.3.1*).

TESTS

pH (*2.2.3*): 4.2 to 5.2, measured immediately after preparation.
Dissolve 0.5 g in *carbon dioxide-free water R* and dilute to 10 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (*2.2.29*). *Use freshly prepared solutions and protect from light.*

Buffer solution. Dissolve 1.2 g of *ammonium hydrogen carbonate R* in *water for chromatography R* and dilute to 1000 mL with *water for chromatography R*. Adjust to pH 10.8 with *ammonia R*.

Test solution. Dissolve 60.0 mg of the substance to be examined in mobile phase A and dilute to 50.0 mL with mobile phase A.

Reference solution (a). Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with mobile phase A. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with mobile phase A.

Reference solution (b). Dissolve 6 mg of *promazine impurity B CRS* and 6 mg of *promazine impurity C CRS* in mobile phase A, using sonication if necessary, and dilute to 100 mL with mobile phase A. Dilute 1 mL of the solution to 50 mL with mobile phase A.

Column:
- *size*: *l* = 0.25 m, Ø = 4.6 mm;
- *stationary phase*: *end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R* (5 µm);

– *temperature*: 30 °C.

Mobile phase:

– *mobile phase A*: buffer solution, *acetonitrile R* (35:50 *V/V*);

– *mobile phase B*: buffer solution, *acetonitrile R* (10:90 *V/V*);

Time (min)	Mobile phase A (per cent *V/V*)	Mobile phase B (per cent *V/V*)
0 - 22	100	0
22 - 37	100 → 0	0 → 100
37 - 60	0	100

Flow rate: 1.0 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 254 nm.

Injection: 10 µL.

Identification of peaks: use the chromatogram obtained with reference solution (b) to identify the peaks due to impurities B and C.

Relative retention with reference to promazine (retention time = about 22 min): impurity C = about 0.56; impurity B = about 0.68. The elution order of impurities C and B may be inverted.

System suitability: reference solution (b):

– *resolution*: minimum 1.5 between the peaks due to impurities C and B.

Calculation of percentage content:

– use the concentration of promazine hydrochloride in reference solution (a).

Limits:

– *unspecified impurities*: for each impurity, maximum 0.10 per cent;

– *total*: maximum 0.3 per cent;

– *reporting threshold*: 0.05 per cent.

Loss on drying (*2.2.32*): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

Sulfated ash (*2.4.14*): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Dissolve 0.250 g in a mixture of 5.0 mL of *0.01 M hydrochloric acid* and 50 mL of *ethanol (96 per cent) R*. Carry out a potentiometric titration (*2.2.20*), using *0.1 M sodium hydroxide*. Read the volume added between the 2 points of inflexion.

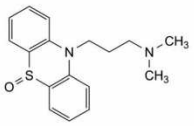
1 mL of *0.1 M sodium hydroxide* is equivalent to 32.09 mg of $C_{17}H_{21}ClN_2S$.

STORAGE

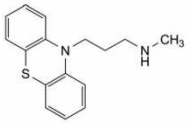
In an airtight container protected from light.

IMPURITIES

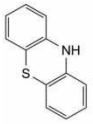
Other detectable impurities (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical use (2034)*. It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also *5.10. Control of impurities in substances for pharmaceutical use*): *A, B, C, D*.



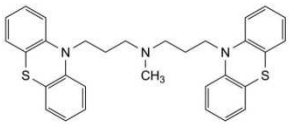
A. 10-[3-(dimethylamino)propyl]-5λ⁴-phenothiazin-5(10*H*)-one (promazine sulfoxide),



B. *N*-methyl-3-(10*H*-phenothiazin-10-yl)propan-1-amine,



C. 10*H*-phenothiazine,



D. *N*-methyl-3-(10*H*-phenothiazin-10-yl)-*N*-[3-(10*H*-phenothiazin-10-yl)propyl]propan-1-amine.

07/2023:2799

PROPYLENE GLYCOL MONOCAPRYLATE

Propylenglycoli monocaprylas

DEFINITION

Mixture of propylene glycol ((2*RS*)-propane-1,2-diol) mono- and diesters of caprylic (octanoic) acid obtained by esterification of propylene glycol with caprylic acid. Propylene glycol monocaprylate type II is obtained by further distillation.

Content:

– *propylene glycol monocaprylate (type I)*: 55.0 per cent to 80.0 per cent of monoesters and 20.0 per cent to 45.0 per cent of diesters;

– *propylene glycol monocaprylate (type II)*: minimum 90.0 per cent of monoesters and maximum 10.0 per cent of diesters.

CHARACTERS

Appearance: clear, oily liquid at 20 °C, colourless or slightly yellow.

Solubility: practically insoluble in water, miscible with ethanol (96 per cent), with methanol and with methylene chloride.

IDENTIFICATION

A. Thin-layer chromatography (*2.2.27*).

Test solution. Dissolve 0.5 g of the substance to be examined in *methylene chloride R* and dilute to 10 mL with the same solvent.

Reference solution. Dissolve 0.5 g of *propylene glycol monocaprylate CRS* in *methylene chloride R* and dilute to 10 mL with the same solvent.

Plate: *TLC silica gel plate R*.

Mobile phase: *heptane R, ethyl acetate R* (30:70 *V/V*).

Application: 10 µL.

Development: over 2/3 of the plate.

Drying: in air.

Annexe 7. Techniques de séparation chromatographique Ph Eur 2.2.46

Procedure. Run the test solution and record the response (r_u). The test solution complies with the test if r_u is not greater than $r_s - r_w$.

The method can also be applied using on-line instrumentation that has been adequately calibrated and shown to have acceptable system suitability. The location of instrumentation must be chosen to ensure that the responses are representative of the water used.

01/2008:20245

2.2.45. SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY

Supercritical fluid chromatography (SFC) is a method of chromatographic separation in which the mobile phase is a fluid in a supercritical or a subcritical state. The stationary phase, contained in a column, consists of either finely divided solid particles, such as a silica or porous graphite, a chemically modified stationary phase, as used in liquid chromatography, or, for capillary columns, a cross-linked liquid film evenly coated on the walls of the column.

SFC is based on mechanisms of adsorption or mass distribution.

APPARATUS

The apparatus usually consists of a cooled pumping system, an injector, a chromatographic column, contained in an oven, a detector, a pressure regulator and a data acquisition device (or an integrator or a chart recorder).

Pumping system

Pumping systems are required to deliver the mobile phase at a constant flow rate. Pressure fluctuations are to be minimised, e.g. by passing the pressurised solvent through a pulse-damping device. Tubing and connections are capable of withstanding the pressures developed by the pumping system.

Microprocessor controlled systems are capable of accurately delivering a mobile phase in either constant or varying conditions, according to a defined programme. In the case of gradient elution, pumping systems which deliver solvent(s) from several reservoirs are available and solvent mixing can be achieved on either the low or high-pressure side of the pump(s).

Injectors

Injection may be carried out directly at the head of the column using a valve.

Stationary phases

Stationary phases are contained in columns which have been described in the chapters on *Liquid chromatography* (*2.2.29*) (packed columns) and *Gas chromatography* (*2.2.28*) (capillary columns). A capillary column has a maximum internal diameter (Ø) of 100 µm.

Mobile phases

Usually the mobile phase is carbon-dioxide which may contain a polar modifier such as methanol, 2-propanol or acetonitrile. The composition, pressure (density), temperature and flow rate of the prescribed mobile phase may either be constant throughout the whole chromatographic procedure (isocratic, isodense, isothermic elution) or may vary according to a defined programme (gradient elution of the modifier, pressure (density), temperature or flow rate).

Detectors

Ultraviolet/visible (UV/Vis) spectrophotometers and flame ionisation detectors are the most commonly employed detectors. Light scattering detectors, infrared absorption spectrophotometers, thermal conductivity detectors or other special detectors may be used.

METHOD

Prepare the test solution(s) and the reference solution(s) as prescribed. The solutions must be free from solid particles.

Criteria for assessing the suitability of the system are described in the chapter on *Chromatographic separation techniques* (*2.2.46*). The extent to which adjustments of parameters of the chromatographic system can be made to satisfy the criteria of system suitability are also given in this chapter.

01/2023:20246

2.2.46. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION TECHNIQUES(7)

INTRODUCTION

Chromatographic separation techniques are multi-stage separation methods in which the components of a sample are distributed between 2 phases, one of which is stationary, while the other is mobile. The stationary phase may be a solid or a liquid supported on a solid or a gel. The stationary phase may be packed in a column, spread as a layer, or distributed as a film, etc. The mobile phase may be gaseous or liquid. The separation may be based on adsorption, mass distribution (partition), ion exchange, etc., or may be based on differences in the physico-chemical properties of the molecules such as size, mass, volume, etc.

This chapter contains definitions and calculations of common parameters and generally applicable requirements for system suitability. Principles of separation, equipment and methods are given in the corresponding general chapters:

◊– paper chromatography (*2.2.26*);
– thin-layer chromatography (*2.2.27*);
– gas chromatography (*2.2.28*);
– liquid chromatography (*2.2.29*);
– size-exclusion chromatography (*2.2.30*).◊

DEFINITIONS

The system suitability and acceptance criteria in monographs have been set using parameters as defined below. With some equipment, certain parameters such as signal-to-noise ratio and resolution can be calculated using software provided by the manufacturer. It is the responsibility of the user to ensure that the calculation methods used in the software are equivalent to the requirements of the European Pharmacopoeia and to make any necessary corrections if this is not the case.

Chromatogram

A graphical or other representation of detector response, effluent concentration or other quantity used as a measure of effluent concentration, versus time or volume. Ideally, chromatograms are represented as a sequence of Gaussian peaks on a baseline (Figure 2.2.46.-1).

V_M = hold-up volume;
t_M = hold-up time;
V_{R1} = retention volume of peak 1;
t_{R1} = retention time of peak 1;
V_{R2} = retention volume of peak 2;
t_{R2} = retention time of peak 2;

(7) This chapter has undergone pharmacopoeial harmonisation. See chapter *5.8. Pharmacopoeial harmonisation.*

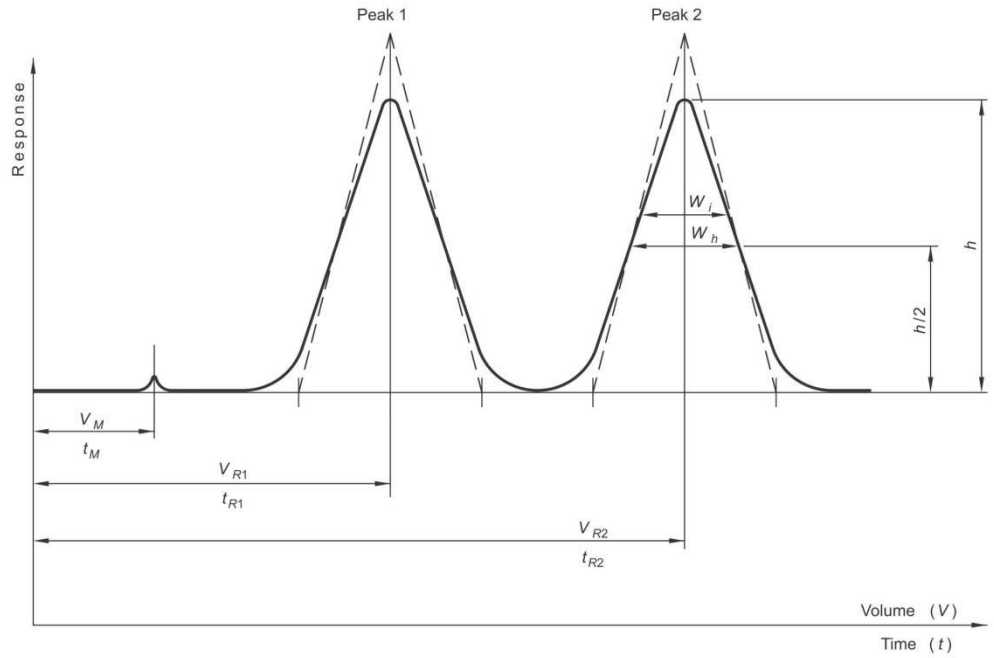


Figure 2.2.46.-1.

W_h = peak width at half-height;

W_i = peak width at the inflexion point;

h = height of the peak;

$h/2$ = half-height of the peak.

Distribution constant (K_0)

In size-exclusion chromatography, the elution characteristics of a component in a particular column may be given by the distribution constant (also referred to as distribution coefficient), which is calculated using the following equation:

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0}$$

t_R = retention time;

t_0 = retention time of an unretained compound;

t_t = total mobile phase time.

Dwell volume (D) (also referred to as V_D)

The dwell volume (also known as gradient delay volume) is the volume between the point at which the eluents meet and the inlet of the column. It can be determined using the following procedure.

Column: replace the chromatographic column by an appropriate capillary tubing (e.g. 1 m × 0.12 mm).

Mobile phase:

- *mobile phase A*: *water for chromatography R*;
- *mobile phase B*: 0.1 per cent *V/V* solution of *acetone R* in *water for chromatography R*;

Time (min)	Mobile phase A (per cent *V/V*)	Mobile phase B (per cent *V/V*)
0 - 20	100 → 0	0 → 100
20 - 30	0	100

Flow rate: set to obtain sufficient back-pressure (e.g. 2 mL/min).

Detection: spectrophotometer at 265 nm.

Determine the time ($t_{0.5}$), in minutes, when the absorbance has increased by 50 per cent (Figure 2.2.46.-2).

$$D = t_D \times F$$

t_D = $t_{0.5} - 0.5t_G$, in minutes;

t_G = pre-defined gradient time (= 20 min);

F = flow rate, in millilitres per minute.

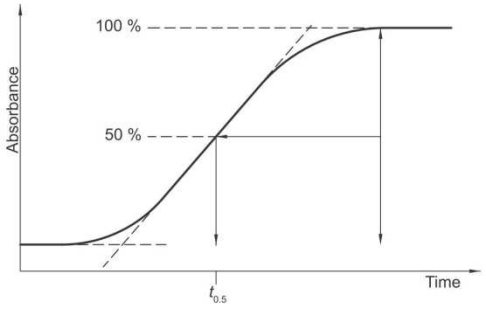


Figure 2.2.46.-2.

Note: where applicable, this measurement is performed with the autosampler in the 'inject' position so as to include the injection loop volume in the dwell volume.

Hold-up time (t_M)

Time required for elution of an unretained component (Figure 2.2.46.-1, baseline scale being in minutes or seconds).

In size-exclusion chromatography, the term 'retention time of an unretained compound (t_0)' is used.

Hold-up volume (V_M)

Volume of the mobile phase required for elution of an unretained component. It may be calculated from the hold-up time (t_M) and the flow rate (F) in millilitres per minute using the following equation:

$$V_M = t_M \times F$$

In size-exclusion chromatography, the term 'retention volume of an unretained compound (V_0)' is used.

Peak

Portion of a chromatogram recording the detector response when a single component (or 2 or more unresolved components) is eluted from the column.

The peak response may be represented by the peak area or the peak height (h).

Peak-to-valley ratio (p/v)

The peak-to-valley ratio may be employed as a system suitability criterion when baseline separation between 2 peaks is not achieved (Figure 2.2.46.-3).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

H_p = height above the extrapolated baseline of the minor peak;

H_v = height above the extrapolated baseline at the lowest point of the curve separating the minor and major peaks.

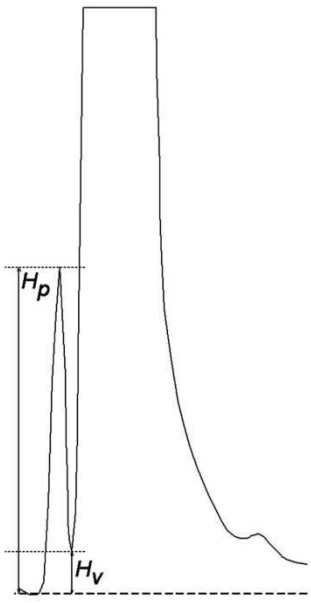


Figure 2.2.46.-3.

Plate height (H) (synonym: Height equivalent to one theoretical plate (HETP))

Ratio of the column length (L), in micrometres, to the plate number (N).

$$H = \frac{L}{N}$$

Plate number (N) (synonym: Number of theoretical plates)

A number indicative of column performance (column efficiency). It can only be calculated from data obtained under either isothermal, isocratic or isodense conditions, depending on the technique, as the plate number, using the following equation, the values of t_R and w_h being expressed in the same units:

$$N = 5.54\left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2$$

t_R = retention time of the peak corresponding to the component;

w_h = peak width at half-height ($h/2$).

The plate number varies with the component as well as with the column, the column temperature, the mobile phase and the retention time.

Reduced plate height (h)

Ratio of the plate height (H), in micrometres, to the particle diameter (d_p) in micrometres.

$$h = \frac{H}{d_p}$$

Relative retardation (R_{rel})

The relative retardation, used in planar chromatography, is calculated as the ratio of the distances travelled by the spot of the component of interest and a reference component (Figure 2.2.46.-4).

$$R_{rel} = \frac{b}{c}$$

a = migration distance of the mobile phase;

b = migration distance of the component of interest;

c = migration distance of the reference component.

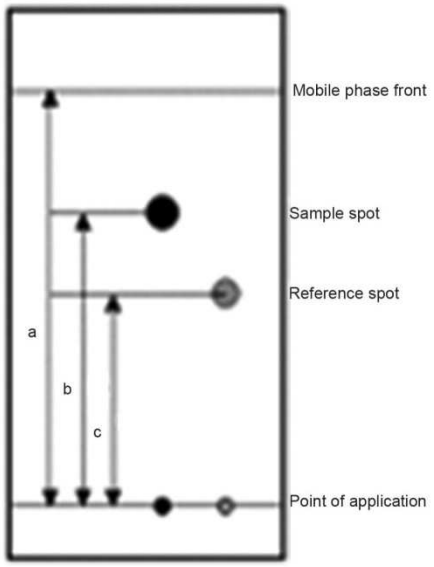


Figure 2.2.46.-4.

Relative retention (*r*)

Relative retention is calculated as an estimate using the following equation:

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

t_{Ri} = retention time of the peak of interest;

t_{Rst} = retention time of the reference peak (usually the peak corresponding to the substance to be examined);

t_M = hold-up time.

Relative retention, unadjusted (r_G)

Unadjusted relative retention is calculated using the following equation:

$$r_G = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}$$

Unless otherwise indicated, values for relative retention stated in monographs correspond to unadjusted relative retention.

◊ In planar chromatography, the retardation factors R_{Fst} and R_{Fi} are used instead of t_{Rst} and t_{Ri}. R_{Fst} (also known as R_{st}) indicates the ratio of the distance travelled by a substance to the distance travelled by a substance used as reference. ◊

Resolution (R_s)

The resolution between peaks of 2 components (Figure 2.2.46.-1) may be calculated using the following equation:

$$R_s = \frac{1.18\,(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$t_{R2} > t_{R1}$

t_{R1}, t_{R2} = retention times of the peaks;

w_{h1}, w_{h2} = peak widths at half-height.

In quantitative planar chromatography, using densitometry, the migration distances are used instead of retention times and the resolution between peaks of 2 components may be calculated using the following equation:

$$R_s = \frac{1.18a\,(R_{F2} - R_{F1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$R_{F2} > R_{F1}$

R_{F1}, R_{F2} = retardation factors of the peaks;

w_{h1}, w_{h2} = peak widths at half-height;

a = migration distance of the solvent front.

Retardation factor (R_F)

The retardation factor ◊ (also known as retention factor (R_f)) ◊, used in planar chromatography, is the ratio of the distance from the point of application to the centre of the spot and the distance simultaneously travelled by the solvent front from the point of application (Figure 2.2.46.-4).

$$R_F = \frac{b}{a}$$

b = migration distance of the component of interest;

a = migration distance of the solvent front.

Retention factor (*k*)

The retention factor (also known as mass distribution ratio (D_m) or capacity factor (k')) is defined as:

$$k = \frac{\text{amount of component in stationary phase}}{\text{amount of component in mobile phase}} = K_C \times \frac{V_S}{V_M}$$

K_C = distribution constant (also known as equilibrium distribution coefficient);

V_S = volume of the stationary phase;

V_M = volume of the mobile phase.

The retention factor of a component may be determined from the chromatogram using the following equation:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

t_R = retention time;

t_M = hold-up time.

Retention time (t_R)

Time elapsed between the injection of the sample and the appearance of the maximum peak response of the eluted sample zone (Figure 2.2.46.-1, baseline scale being in minutes or seconds).

Retention volume (V_R)

Volume of the mobile phase required for elution of a component. It may be calculated from the retention time (t_R) and the flow rate (F) in millilitres per minute using the following equation:

$$V_R = t_R \times F$$

Retention time of an unretained compound (t_0)

In size-exclusion chromatography, retention time of a component whose molecules are larger than the largest gel pores (Figure 2.2.46.-5).

Retention volume of an unretained compound (V_0)

In size-exclusion chromatography, retention volume of a component whose molecules are larger than the largest gel pores. It may be calculated from the retention time of an unretained compound (t_0) and the flow rate (F) in millilitres per minute using the following equation:

$$V_0 = t_0 \times F$$

Separation factor (α)

Relative retention calculated for 2 adjacent peaks (by convention, the value of the separation factor is always > 1) using the following equation:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

k_1 = retention factor of peak 1;

k_2 = retention factor of peak 2.

Signal-to-noise ratio (*S/N*)

Short-term noise influences the precision and accuracy of quantitation. The signal-to-noise ratio is calculated using the following equation:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

H = height of the peak (Figure 2.2.46.-6) corresponding to the component concerned, in the chromatogram obtained with the reference solution, measured from the maximum of the peak to the extrapolated baseline of the signal observed over a distance equal to 20 times the width at half-height;

h = range of the noise in a chromatogram obtained after injection of a blank (Figure 2.2.46.-7), observed over a distance equal to 20 times the width at half-height of the peak in the chromatogram obtained with the reference solution and, if possible, situated equally around the place where this peak would be found.

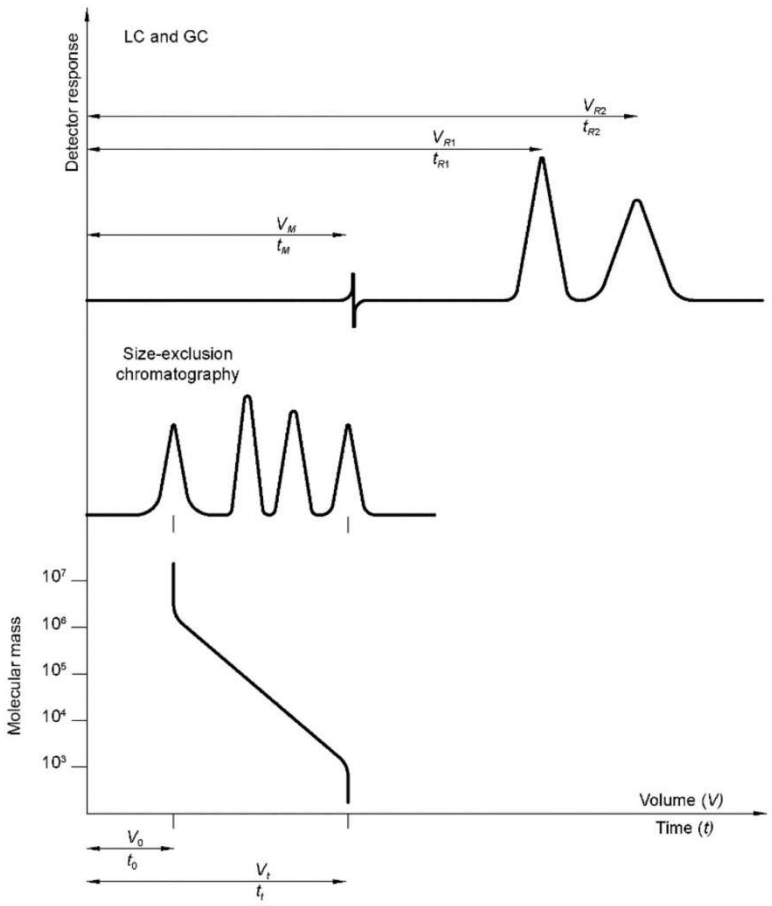


Figure 2.2.46.-5.

If a baseline of 20 times the width at half-height is not obtainable because of peaks due to solvents or reagents, or arising from the mobile phase or the sample matrix, or due to the gas chromatography temperature programme, a baseline of at least 5 times the width at half-height is permitted.

Symmetry factor (A_s)

The symmetry factor of a peak (also known as asymmetry factor or tailing factor) (Figure 2.2.46.-8) is calculated using the following equation:

$$A_s = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

$w_{0.05}$ = width of the peak at one-twentieth of the peak height;

d = distance between the perpendicular dropped from the peak maximum and the leading edge of the peak at one-twentieth of the peak height.

An A_s value of 1.0 signifies symmetry. When $A_s > 1.0$, the peak is tailing. When $A_s < 1.0$, the peak is fronting.

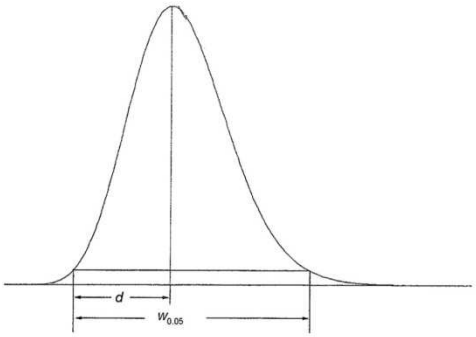


Figure 2.2.46.-8.

System repeatability

The repeatability of response is expressed as an estimated percentage relative standard deviation (%*RSD*) of a consecutive series of measurements for not fewer than 3 injections or applications of a reference solution, and is calculated using the following equation:

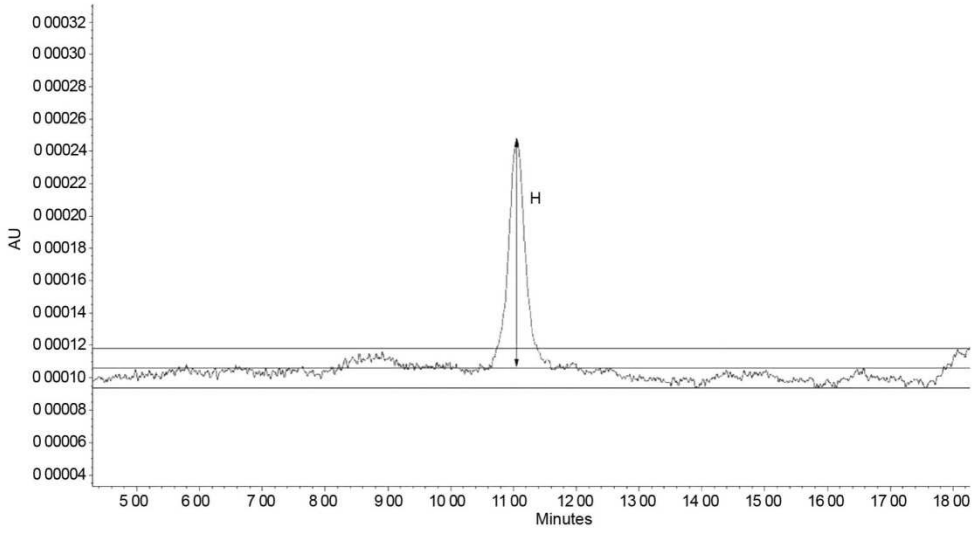


Figure 2.2.46.-6. – *Chromatogram of the reference solution*

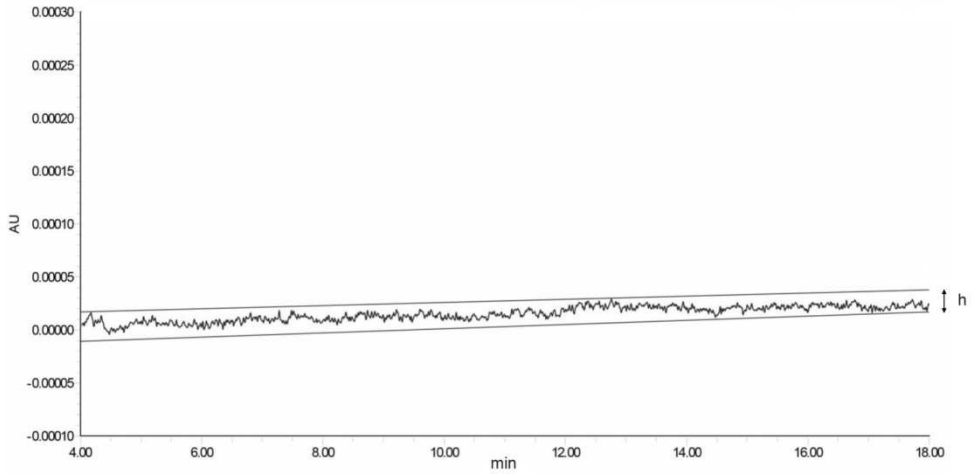


Figure 2.2.46.-7. – *Chromatogram of a blank*

$$\%\,RSD = \frac{100}{\bar{y}}\sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

y_i = individual values expressed as peak area, peak height, or ratio of areas by the internal standardisation method;

$\bar{y}$ = mean of individual values;

n = number of individual values.

Total mobile phase time (t_t)

In size-exclusion chromatography, retention time of a component whose molecules are smaller than the smallest gel pores (Figure 2.2.46.-5).

Total mobile phase volume (V_t)

In size-exclusion chromatography, retention volume of a component whose molecules are smaller than the smallest gel pores. It may be calculated from the total mobile phase time (t_t) and the flow rate (F) in millilitres per minute using the following equation:

$$V_t = t_t \times F$$

SYSTEM SUITABILITY

This section only covers liquid chromatography and gas chromatography.

The various components of the equipment employed must be qualified and be capable of achieving the performance required to conduct the test or assay.

The system suitability tests represent an integral part of the analytical procedure and are used to ensure adequate performance of the chromatographic system. Column plate number, retention factor (mass distribution ratio), system repeatability, signal-to-noise, resolution/peak-to-valley ratio and symmetry factor are the parameters that may be employed

in assessing the performance of the chromatographic system. When stated in the individual monograph, in case of complex chromatographic profiles (e.g. for biotechnological/biological products), visual comparison of the profiles can be used as a system suitability test.

Factors that may affect the chromatographic behaviour include:

- composition and temperature of the mobile phase;
- ionic strength and pH of the aqueous component of the mobile phase;
- flow rate, column dimensions, column temperature and pressure;
- stationary phase characteristics including type of chromatographic support (particle-based or monolithic), particle or pore size, porosity, specific surface area;
- reversed phase and other surface-modification of the stationary phases, extent of chemical modification (as expressed by end-capping, carbon loading, etc.).

When retention times and relative retentions are provided in monographs, they are for information purposes only, unless otherwise stated in the monograph. There are no acceptance criteria applied to relative retentions.

Compliance with the system suitability criteria is required throughout the chromatographic procedure. No sample analysis is acceptable unless the suitability of the system has been demonstrated.

The following requirements are to be fulfilled, in addition to any other system suitability criteria stated in the monograph. When specific requirements are stated in the monograph, they supersede the requirements mentioned in this chapter.

System repeatability – assay of an active substance or an excipient

In an assay of an active substance or an excipient, where the target value is 100 per cent for a pure substance and no system repeatability requirement is specified, the maximum permitted relative standard deviation ($\%RSD_{max}$) for the defined limits is calculated for a series of injections of the reference solution (n = 3-6). The maximum permitted relative standard deviation of the peak response does not exceed the appropriate value given in Table 2.2.46.-1.

$$\% RSD_{max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}$$

K = constant (0.349), obtained from the expression $K = \frac{0.6}{\sqrt{2}} \times \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$ in which $\frac{0.6}{\sqrt{2}}$ represents the required percentage relative standard deviation determined on 6 injections for B = 1.0;

B = upper limit given in the definition of the individual monograph minus 100 per cent;

n = number of replicate injections of the reference solution ($3 \leq n \leq 6$);

$t_{90\%,n-1}$ = Student's t at the 90 per cent probability level (double sided) with n-1 degrees of freedom.

Table 2.2.46.-1. – *Maximum permitted relative standard deviation (assay)*

	Number of individual injections *n*			
	3	4	5	6
B (per cent)	*Maximum permitted relative standard deviation (per cent)*			
2.0	0.41	0.59	0.73	0.85
2.5	0.52	0.74	0.92	1.06
3.0	0.62	0.89	1.10	1.27

System sensitivity

The signal-to-noise ratio is used to define the system sensitivity. The limit of quantitation (corresponding to a signal-to-noise ratio of 10) is equal to or less than the reporting threshold.

◊ To determine the signal-to-noise ratio, inject a solution of the substance to be examined at the concentration corresponding to the reporting threshold (e.g. 0.05 per cent). Alternatively, use the reference solution used for the quantitation of unspecified impurities (e.g. 0.10 per cent of the concentration of the test solution) and extrapolate the area of the principal peak to the reporting threshold (e.g. half the peak area obtained with the reference solution at 0.10 per cent). ◊

Peak symmetry

Unless otherwise stated, in a test or assay, the symmetry factor (tailing factor) of the peak used for quantitation is 0.8-1.8.

ADJUSTMENT OF CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

The chromatographic conditions described have been validated during the elaboration of the monograph.

The extent to which the various parameters of a chromatographic test may be adjusted without fundamentally modifying the pharmacopoeial analytical procedures are listed below. Changes other than those indicated require revalidation of the procedure.

Multiple adjustments can have a cumulative effect on the performance of the system and are to be properly evaluated by the users. This is particularly important in cases where the separation pattern is described as a profile. In those cases, a risk assessment has to be carried out.

Any adjustments must be made on the basis of the pharmacopoeial procedure.

If adjustments are made to a pharmacopoeial procedure, additional verification tests may be required. To verify the suitability of the adjusted pharmacopoeial procedure, assess the relevant analytical performance characteristics potentially affected by the change.

When a pharmacopoeial analytical procedure has been adjusted according to the requirements stated below, no further adjustments are allowed without appropriate revalidation.

Compliance with the system suitability criteria is required to verify that conditions for satisfactory performance of the test or assay are achieved.

Adjustment of conditions with gradient elution (HPLC) or temperature programming (GC) is more critical than with isocratic (HPLC) or isothermal (GC) elution, since it may shift some peaks to a different step of the gradient or to different elution temperatures, potentially causing partial or complete coelution of adjacent peaks or peak inversion, and thereby leading to the incorrect assignment of peaks and the masking of peaks, or a shift such that elution occurs beyond the prescribed elution time.

For some parameters, the adjustments are explicitly defined in the monograph to ensure the system suitability.

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

Composition of the mobile phase: the amount of the minor solvent components may be adjusted by ± 30 per cent relative or ± 2 per cent absolute, whichever is the larger; no other component is altered by more than 10 per cent absolute. A minor component comprises less than or equal to (100/n) per cent, n being the total number of components of the mobile phase. For a minor component at 10 per cent of the mobile phase, a 30 per cent relative adjustment allows a range of 7-13 per cent whereas a 2 per cent absolute adjustment allows a range of 8-12 per cent, the relative value therefore being the larger; for a minor component at 5 per cent of the mobile phase, a 30 per cent relative adjustment allows a range of

3.5-6.5 per cent whereas a 2 per cent absolute adjustment allows a range of 3-7 per cent, the absolute value being the larger in this case.

pH of the aqueous component of the mobile phase: ± 0.2 pH units, unless otherwise prescribed.

Concentration of salts in the buffer component of a mobile phase: ± 10 per cent.

Application volume: 10-20 per cent of the prescribed volume if using fine particle size plates (2-10 µm).

LIQUID CHROMATOGRAPHY: ISOCRATIC ELUTION

Column parameters and flow rate

Stationary phase: no change of the identity of the substituent (e.g. no replacement of C18 by C8); the other physico-chemical characteristics of the stationary phase (i.e. chromatographic support, surface modification and extent of chemical modification) must be similar; a change from totally porous particle (TPP) columns to superficially porous particle (SPP) columns is allowed provided the above-mentioned requirements are met.

Column dimensions (particle size, length): the particle size and/or length of the column may be modified provided that the ratio of the column length (L) to the particle size (dp) remains constant or in the range − 25 per cent to + 50 per cent of the prescribed L/dp ratio. For the application of particle-size adjustment from totally porous to superficially porous particles, other combinations of L and dp can be used provided that the plate number (N) is within − 25 per cent to + 50 per cent relative to the prescribed column.

These changes are acceptable provided the system suitability requirements are fulfilled and the selectivity and elution order of the specified impurities to be controlled are demonstrated to be equivalent.

Column dimensions (internal diameter): in the absence of a change in particle size and/or length of the column, the internal diameter of the column may be adjusted.

Caution is necessary when the adjustment results in smaller peak volumes, due to a smaller particle size or a smaller internal diameter, a situation that may require adjustments to minimise extra-column band broadening by factors such as instrument connections, detector cell volume and sampling rate, and injection volume.

When the particle size is changed, the flow rate requires adjustment, because smaller-particle columns will require higher linear velocities for the same performance (as measured by reduced plate height). Flow rate is adjusted for changes in column diameter and particle size using the following equation:

$$F_2 = F_1 \times \frac{dc_2^{\,2} \times dp_1}{dc_1^{\,2} \times dp_2}$$

F_1 = flow rate indicated in the monograph, in millilitres per minute;

F_2 = adjusted flow rate, in millilitres per minute;

dc_1 = internal diameter of the column indicated in the monograph, in millimetres;

dc_2 = internal diameter of the column used, in millimetres;

dp_1 = particle size indicated in the monograph, in micrometres;

dp_2 = particle size of the column used, in micrometres.

When a change is made from ≥ 3 µm to < 3 µm particles in isocratic elution, an additional increase in linear velocity (by adjusting the flow rate) may be justified, provided that the column performance does not drop by more than 20 per cent. Similarly, when a change is made from < 3 µm to ≥ 3 µm particles, an additional reduction of linear velocity (flow rate) may be justified to avoid reduction in column performance by more than 20 per cent.

After an adjustment due to a change in column dimensions, an additional change in flow rate of ± 50 per cent is permitted.

Column temperature: ± 10 °C, where the operating temperature is specified, unless otherwise prescribed.

Further adjustments in analytical procedure conditions (mobile phase, temperature, pH, etc.) may be required, within the permitted ranges described under System Suitability and Adjustment of chromatographic conditions in this chapter.

Mobile phase

Composition: the amount of the minor solvent components may be adjusted by ± 30 per cent relative (see example under Thin-layer chromatography); no component is altered by more than 10 per cent absolute. A minor component comprises less than (100/n) per cent, n being the total number of components of the mobile phase.

pH of the aqueous component of the mobile phase: ± 0.2 pH units, unless otherwise prescribed.

Concentration of salts in the buffer component of a mobile phase: ± 10 per cent.

Flow rate: in the absence of a change in column dimensions, an adjustment of the flow rate by ± 50 per cent is permitted.

Detector wavelength: no adjustment permitted.

Injection volume: when the column dimensions are changed, the following equation may be used for adjusting the injection volume:

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times \frac{L_2 \times dc_2^{\,2}}{L_1 \times dc_1^{\,2}}$$

V_{inj1} = injection volume indicated in the monograph, in microlitres;

V_{inj2} = adjusted injection volume, in microlitres;

L_1 = column length indicated in the monograph, in millimetres;

L_2 = new column length, in millimetres;

dc_1 = column internal diameter indicated in the monograph, in millimetres;

dc_2 = new column internal diameter, in millimetres.

This equation may not be applicable to changes from TPP columns to SPP columns.

Even in the absence of any column dimension change, the injection volume may be varied provided the system suitability criteria remain within their established acceptability limits. When the injection volume is decreased, special attention is given to (limit of) detection and repeatability of the peak response(s) to be determined. An increase is permitted provided that, in particular, linearity and resolution of the peak(s) to be determined remain satisfactory.

LIQUID CHROMATOGRAPHY: GRADIENT ELUTION

Adjustment of chromatographic conditions for gradient systems requires greater caution than for isocratic systems.

Column parameters and flow rate

Stationary phase: no change of the identity of the substituent (e.g. no replacement of C18 by C8); the other physico-chemical characteristics of the stationary phase (i.e. chromatographic support, surface modification and extent of chemical modification) must be similar; a change from totally porous particle (TPP) columns to superficially porous particle (SPP) columns is allowed provided the above-mentioned requirements are met.

Column dimensions (particle size, length): the particle size and/or length of the column may be modified provided that the ratio of the column length (L) to the particle size (dp) remains constant or in the range − 25 per cent to + 50 per

cent of the prescribed *L/dp* ratio. For the application of particle-size adjustment from totally porous to superficially porous particles, other combinations of *L* and *dp* can be used provided that the ratio $(t_R/w_h)^2$ is within − 25 per cent to + 50 per cent relative to the prescribed column, for each peak used to check the system suitability, as stated in this chapter and the individual monograph.

These changes are acceptable provided the system suitability requirements are fulfilled and the selectivity and elution order of the specified impurities to be controlled are demonstrated to be equivalent.

Column dimensions (internal diameter): in the absence of a change in particle size and/or length of the column, the internal diameter of the column may be adjusted.

Caution is necessary when the adjustment results in smaller peak volumes, due to a smaller particle size or a smaller internal diameter, a situation that may require adjustments to minimise extra-column band broadening by factors such as instrument connections, detector cell volume and sampling rate, and injection volume.

When the particle size is changed, the flow rate requires adjustment, because smaller-particle columns will require higher linear velocities for the same performance (as measured by reduced plate height). Flow rate is adjusted for changes in column diameter and particle size using the following equation:

$$F_2 = F_1 \times \frac{dc_2^2 \times dp_1}{dc_1^2 \times dp_2}$$

F_1 = flow rate indicated in the monograph, in millilitres per minute;

F_2 = adjusted flow rate, in millilitres per minute;

dc_1 = internal diameter of the column indicated in the monograph, in millimetres;

dc_2 = internal diameter of the column used, in millimetres;

dp_1 = particle size indicated in the monograph, in micrometres;

dp_2 = particle size of the column used, in micrometres.

A change in column dimensions, and thus in column volume, impacts the gradient volume, which controls selectivity. Gradients are adjusted to the column volume by changing the gradient volume in proportion to the column volume. This applies to every gradient segment volume. Since the gradient volume is the gradient time (t_G) multiplied by the flow rate (F), the gradient time for each gradient segment must be adjusted to maintain a constant ratio of the gradient volume to the column volume (expressed as $L \times dc^2$). Thus, the new gradient time (t_{G2}) can be calculated from the original gradient time (t_{G1}), the flow rate(s) and the column dimensions as follows:

$$t_{G2} = t_{G1} \times \frac{F_1}{F_2} \times \frac{L_2 \times dc_2^2}{L_1 \times dc_1^2}$$

Thus, the change in conditions for gradient elution requires 3 steps:

(1) adjust the column length and particle size according to *L/dp*;

(2) adjust the flow rate for changes in particle size and column diameter; and

(3) adjust the gradient time of each segment for changes in column length, diameter and flow rate.

The example below illustrates this process.

Table 2.2.46.-2. – *Example of adjustments for liquid chromatography - gradient elution*

Variable	Original conditions	Adjusted conditions	Comment
Column length (*L*) in mm	150	100	User's choice
Column diameter (*dc*) in mm	4.6	2.1	User's choice
Particle size (*dp*) in µm	5	3	User's choice
L/dp	30.0	33.3	(1)
Flow rate (*F*) in mL/min	2.0	0.7	(2)
Gradient adjustment factor (t_{G2}/t_{G1})		0.4	(3)
Gradient conditions			
B (per cent)	*Time (min)*	*Time (min)*	
30	0	0	
30	3	(3 × 0.4) = 1.2	
70	13	[1.2 + (10 × 0.4)] = 5.2	
30	16	[5.2 + (3 × 0.4)] = 6.4	

(1) 11 per cent increase within allowed *L/dp* change of − 25 per cent to + 50 per cent;

(2) calculated using $F_2 = F_1 [(dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp_2)]$;

(3) calculated using $t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$.

Column temperature: ± 5 °C, where the operating temperature is specified, unless otherwise prescribed.

Further adjustments in analytical procedure conditions (mobile phase, temperature, pH, etc.) may be required within the permitted ranges described in this chapter under System suitability and Adjustment of chromatographic conditions.

Mobile phase

Composition/gradient: adjustments of the composition of the mobile phase and the gradient are acceptable provided that:

- the system suitability requirements are fulfilled;
- the principal peak(s) elute(s) within ± 15 per cent of the indicated retention time(s) obtained with the original conditions; this requirement does not apply when the column dimensions are changed;
- the composition of the mobile phase and the gradient are such that the first peaks are sufficiently retained and the last peaks are eluted.

pH of the aqueous component of the mobile phase: ± 0.2 pH units, unless otherwise prescribed.

Concentration of salts in the buffer component of a mobile phase: ± 10 per cent.

Where compliance with the system suitability requirements cannot be achieved, it is often preferable to reconsider the dwell volume or to change the column.

Dwell volume

The configuration of the equipment employed may significantly alter the resolution, retention time and relative retentions described. Should this occur, it may be due to a change in dwell volume. Monographs preferably include an isocratic step before the start of the gradient programme so that an adaptation can be made to the gradient time points to take account of differences in dwell volume between the system used for analytical procedure development and that actually used. It is the user's responsibility to adapt the length

of the isocratic step to the analytical equipment used. If the dwell volume used during the elaboration of the monograph is given with the monograph, the time points (t), in minutes, stated in the gradient table may be replaced by adapted time points (t_c), in minutes, calculated using the following equation:

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F}$$

D = dwell volume, in millilitres;

D_0 = dwell volume used for development of the analytical procedure, in millilitres;

F = flow rate, in millilitres per minute.

The isocratic step introduced for this purpose may be omitted if validation data for application of the analytical procedure without this step is available.

Detector wavelength: no adjustment permitted.

Injection volume: when the column dimensions are changed, the following equation may be used for adjusting the injection volume:

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times \frac{L_2 \times dc_2^{\,2}}{L_1 \times dc_1^{\,2}}$$

V_{inj1} = injection volume indicated in the monograph, in microlitres;

V_{inj2} = adjusted injection volume, in microlitres;

L_1 = column length indicated in the monograph, in millimetres;

L_2 = new column length, in millimetres;

dc_1 = column internal diameter indicated in the monograph, in millimetres;

dc_2 = new column internal diameter, in millimetres.

This equation may not be applicable to changes from TPP columns to SPP columns.

Even in the absence of any column dimension change, the injection volume may be varied provided the system suitability criteria remain within their established acceptability limits. When the injection volume is decreased, special attention is given to (limit of) detection and repeatability of the peak response(s) to be determined. An increase is permitted provided that, in particular, linearity and resolution of the peak(s) to be determined remain satisfactory.

GAS CHROMATOGRAPHY

Column parameters

Stationary phase:

- *particle size*: maximum reduction of 50 per cent; no increase permitted (packed columns);
- *film thickness*: − 50 per cent to + 100 per cent (capillary columns).

Column dimensions:

- *length*: − 70 per cent to + 100 per cent;
- *internal diameter*: ± 50 per cent.

Column temperature: ± 10 per cent.

Temperature programme: adjustment of temperature is permitted as stated above; adjustment of ramp rates and hold times of up to ± 20 per cent is permitted.

Flow rate: ± 50 per cent.

The above changes are acceptable provided the system suitability requirements are fulfilled and the selectivity and elution order of the specified impurities to be controlled are demonstrated to be equivalent.

Injection volume and split ratio: may be varied provided the system suitability criteria remain within their established acceptability limits. When the injection volume is decreased or the split ratio is increased, special attention is given to (limit of) detection and repeatability of the peak response(s) to be determined. An increase in injection volume or a decrease in split ratio is permitted provided that, in particular, linearity and resolution of the peak(s) to be determined remain satisfactory.

Injection port temperature and transfer-line temperature in static head-space conditions: ± 10 °C, provided no decomposition or condensation occurs.

QUANTITATION

The following quantitation approaches may be used in general texts or monographs.

External standard method

Using a calibration function. Reference solutions with several graded amounts of a reference standard of the component to be analysed are prepared in a range that has been demonstrated to give a linear response, and a fixed volume of these reference solutions is injected. With the chromatograms obtained, a calibration curve is drawn by plotting the peak areas or peak heights on the ordinate against the amount of reference standard on the abscissa. The calibration function is generally obtained by linear regression. Then a solution of the substance to be examined is prepared according to the procedure specified in the individual monograph. The chromatography is performed under the same operating conditions as for the preparation of the calibration function. The peak area or peak height of the component to be analysed is measured, and the amount of the component is read or calculated from the calibration function.

Using one-point calibration. In an individual monograph, generally one of the reference solutions with a concentration within the linear range of the calibration function and a solution of the substance to be examined with a concentration close to that of the reference solution are prepared. The chromatography is performed under fixed conditions to obtain the amount of the component to be analysed by comparing the responses obtained. In this method, all procedures, such as the injection procedure, must be carried out under constant conditions.

Internal standard method

Using a calibration function. In the internal standard method, a stable component that shows a retention time close to that of the component to be analysed, and whose peak is well separated from all other peaks in the chromatogram, is chosen as an internal standard. Several reference solutions containing a fixed amount of the internal standard and several graded amounts of a reference standard of the component to be analysed are prepared. Based on the chromatograms obtained by injection of a fixed volume of individual reference solutions, the ratio of peak area or peak height of the reference standard to that of the internal standard is calculated. A calibration curve is drawn by plotting these ratios on the ordinate against the amount of reference standard (or the ratio of the amount of reference standard to that of the internal standard), on the abscissa. The calibration function is generally obtained by linear regression. Then a solution of the substance to be examined containing the same amount of internal standard as in the reference solutions used for the preparation of the calibration function is prepared according to the procedure specified in the individual monograph. The chromatography is performed under the same operating conditions as for the preparation of the calibration function. The ratio of the peak area or peak height of the component to be analysed to that of the internal standard is calculated, and the amount of the component is read or calculated from the calibration function.

Using one-point calibration. In an individual monograph, generally one of the reference solutions with a concentration within the linear range of the calibration function and a solution of the substance to be examined with a concentration close to that of the reference solution (both containing a fixed amount of the internal standard) are prepared. The

chromatography is performed under fixed conditions to determine the amount of the component to be analysed by comparing the ratios obtained.

Normalisation procedure

Provided linearity of the peaks has been demonstrated, individual monographs may prescribe that the percentage content of a component of the substance to be examined is calculated by determining the area of the corresponding peak as a percentage of the total area of all the peaks, excluding those due to solvents or reagents, those arising from the mobile phase or the sample matrix, and those at or below the reporting threshold.

OTHER CONSIDERATIONS

Detector response

The detector sensitivity is the signal output per unit concentration or unit mass of a substance in the mobile phase entering the detector. The relative detector response factor, commonly referred to as the response factor, expresses the sensitivity of a detector for a given substance relative to a reference substance. The correction factor is the reciprocal of the response factor. In tests for related substances, any correction factors indicated in the monograph are applied (i.e. when the response factor is outside the range 0.8-1.2).

Interfering peaks

Peaks due to solvents and reagents or arising from the mobile phase or the sample matrix are disregarded.

Measurement of peaks

Integration of the peak area of any impurity that is not completely separated from the principal peak is typically performed by tangential skim (Figure 2.2.46.-9).

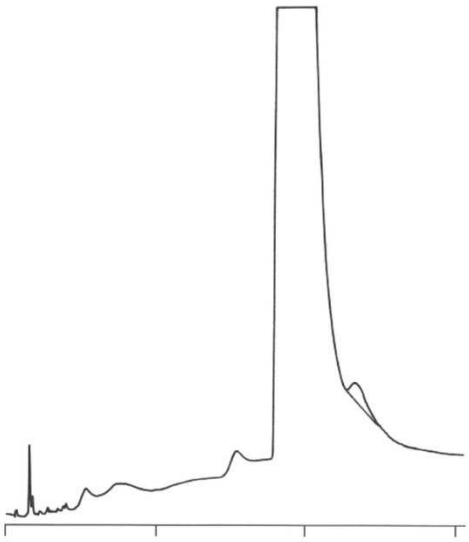


Figure 2.2.46.-9.

Reporting threshold

When the related substances test prescribes a limit for the total of impurities, or a quantitative determination of one impurity, it is important to choose an appropriate reporting threshold and appropriate conditions for the integration of the peak areas.

In such tests, the reporting threshold, i.e. the limit above which a peak is reported, is generally 0.05 per cent.

01/2010:20247
corrected 10.1

2.2.47. CAPILLARY ELECTROPHORESIS[8]

GENERAL PRINCIPLES

Capillary electrophoresis is a physical method of analysis based on the migration, inside a capillary, of charged analytes dissolved in an electrolyte solution, under the influence of a direct-current electric field.

The migration velocity of an analyte under an electric field of intensity E, is determined by the electrophoretic mobility of the analyte and the electro-osmotic mobility of the buffer inside the capillary. The electrophoretic mobility of a solute (μ_{ep}) depends on the characteristics of the solute (electric charge, molecular size and shape) and those of the buffer in which the migration takes place (type and ionic strength of the electrolyte, pH, viscosity and additives). The electrophoretic velocity (v_{ep}) of a solute, assuming a spherical shape, is given by the equation:

$$v_{ep} = \mu_{ep} \times E = \left(\frac{q}{6\pi\eta r}\right) \times \left(\frac{V}{L}\right)$$

q = effective charge of the solute,

η = viscosity of the electrolyte solution,

r = Stoke's radius of the solute,

V = applied voltage,

L = total length of the capillary.

When an electric field is applied through the capillary filled with buffer, a flow of solvent is generated inside the capillary, called electro-osmotic flow. The velocity of the electro-osmotic flow depends on the electro-osmotic mobility (μ_{eo}) which in turn depends on the charge density on the capillary internal wall and the buffer characteristics. The electro-osmotic velocity (v_{eo}) is given by the equation:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \times E = \left(\frac{\varepsilon\zeta}{\eta}\right) \times \left(\frac{V}{L}\right)$$

ε = dielectric constant of the buffer,

ζ = zeta potential of the capillary surface.

The velocity of the solute (v) is given by:

$$v = v_{ep} + v_{eo}$$

The electrophoretic mobility of the analyte and the electro-osmotic mobility may act in the same direction or in opposite directions, depending on the charge of the solute. In normal capillary electrophoresis, anions will migrate in the opposite direction to the electro-osmotic flow and their velocities will be smaller than the electro-osmotic velocity. Cations will migrate in the same direction as the electro-osmotic flow and their velocities will be greater than the electro-osmotic velocity. Under conditions in which there is a fast electro-osmotic velocity with respect to the electrophoretic velocity of the solutes, both cations and anions can be separated in the same run.

The time (t) taken by the solute to migrate the distance (l) from the injection end of the capillary to the detection point (capillary effective length) is given by the expression:

(8) This chapter has undergone pharmacopoeial harmonisation. See chapter *5.8. Pharmacopoeial harmonisation.*

Résumé

La détermination du profil des impuretés des produits pharmaceutiques est cruciale pour approfondir les connaissances sur la dégradation du principe actif et garantir la sécurité et la qualité des médicaments. Cette étude avait pour objectif de mener une dégradation forcée tout en développant, optimisant et validant une méthode indicative de stabilité. Une étude de stabilité post-approbation a été réalisée pour évaluer les résultats du stress testing. Ce travail a été mené sur l'oxomémazine, une substance active non monographiée, et son sirop dosé à 0,33 mg/ml. L'étude de dégradation forcée a démontré une stabilité intrinsèque remarquable de la substance active face aux stress thermique, hydrolytique, oxydatif et photolytique. Un plan central composite a été employé pour optimiser la résolution entre les pics d'un placebo chargé à 100% d'oxomémazine (OXO) et 0,2% de dioxyde de phénothiazine (PDO) et le temps d'analyse. Une validation analytique, conforme aux directives du guide de l'ICH Q2 (R2), a été réalisée sur un intervalle de concentration allant de 0,1% à 0,5%. La méthode était linéaire, sensible, juste et fidèle. Une étude de stabilité post-approbation sur 11 échantillons du produit fini, dont les durées de vie au moment de l'analyse variaient de 3 mois à 46 mois, a confirmé qu'aucune impureté ne dépassait la limite d'identification de 0,2%, corroborant ainsi les conclusions de l'étude de dégradation forcée.

Mots clés : Dégradation forcée, optimisation, plan d'expérience, validation, stabilité.

Abstract

Determining the impurity profile of pharmaceutical products is crucial for advancing knowledge about the degradation of the drug substance and ensuring the safety and quality of drug products. This study aimed to conduct forced degradation while developing, optimizing, and validating a stability indicating method. A post-approval stability study was conducted to evaluate the results of stress testing. This work focused on oxomemazine, an unmonographed drug substance, and its syrup dosed at 0.33 mg/ml. Forced degradation study demonstrated remarkable intrinsic stability of the drug substance against thermal, hydrolytic, oxidative, and photolytic stresses. A central composite design was employed to optimize resolution between peaks of a placebo spiked with 100% oxomemazine and 0.2% phenothiazine dioxide, and analysis time. Analytical validation, in accordance with ICH Q2 (R2) guidelines, was performed over a range of 0.1% to 0.5%. The method was found to be linear, sensitive, accurate, and precise. A post-approval stability study on 11 samples of the drug product, with lifetimes ranging from 3 to 46 months at the time of analysis, confirmed that no impurity exceeded the identification threshold of 0.2%, thus corroborating the conclusions of the forced degradation study.

Keywords: Forced degradation, optimization, experimental design, validation, stability