

La Vague

LE MAGAZINE DE LA PHARMA ET DES BIOTECHS

N° 70 | Juillet 2021
Trimestriel

Quelques bonnes
pratiques de validation
des procédures
analytiques.

Established Conditions
for Analytical
Procedures & QbD.

Apport des études de
stabilités accélérées
prédictives (APS)
au développement
pharmaceutique.

Évaporation des
solutions à base
d'alcool.

Analytique

Validation du Nettoyage

www.a3p.org

ISSN 1298-047



Sommaire

N°70 // Juillet 2021

Édito I.....	3
Ils ont participé à ce numéro I Nos contributeurs	4
Billet d’humeur I Déconfinement, fin de l’isolement mais pas des isolateurs !	5
La Chronique I Le principe de précaution serait-il devenu une arme de destruction massive ?	6
Réglementaire I Toutes les évolutions	7
Actualités A3P I Vos prochains rendez-vous A3P	10
Analytique I Quelques bonnes pratiques de validation des procédures analytiques	12
Analytique I ALCOA... avec un A pour Accuracy.	20
Analytique I Established Conditions for Analytical Procedures & QbD.....	25
Analytique I Quand les vibrations des molécules permettent de les doser : la spectroscopie proche infrarouge en action.	29
Analytique I Apport des études de stabilités accélérées prédictives (APS) au développement pharmaceutique	34
Analytique I Mise en place de la chimie analytique verte au laboratoire contrôle qualité de la société UPSA.....	41
Validation Nettoyage I Évaporation des solutions à base d’alcool.	47

La Vague

Revue trimestrielle N° 70 - Juillet 2021

• Editeur
A3P Association
30, rue Pré Gaudry - 69007 Lyon
Tél. 04 37 28 30 40
Numéro offert aux adhérents de l'Association (valeur 10€)

• Directeur de la Publication
Didier MEYER, Vice-Président A3P
E-mail : dgastonmeyer@gmail.com

• Rédactrice en Chef
Anne RIGOULOT

• Coordinateur
Frédéric ESTASSY
E-mail : festassy@a3pservices.com

• Conception & graphisme
Sophie TORGUE
E-mail : storgue@a3pservices.com
Jérémie COURDOUAN

• Impression
VL développement
42000 Saint-Just-Saint-Rambert

Dépot légal à parution
N° d'ISSN : 1298-047
N° CPPAP : en cours

Tous droits réservés. Les articles publiés dans la revue n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs.

Adhérez à l'Association et profitez de tous les avantages !

Faites partie du **réseau A3P** et **recevez** tous les trimestres **sur votre bureau, la version papier** du magazine. En plus, depuis votre espace personnalisé sur le site A3P, vous pourrez bénéficier de tous les **contenus techniques, scientifiques et réglementaires**, accéder aux **annuaires adhérents et sociétés**, participer à des **événements privilégiés** et utiliser l'**application mobile**.



Tout le contenu des événements A3P
conférences, ateliers, ...



Réglementaire
veille, warning letter, ...



Tous les Guides Techniques & scientifiques



Annuaire des membres du réseau

Toutes les infos sur www.a3p.org/adhesion/



L'adhésion est nominative et annuelle de date à date de facturation (1, 2, 3 ans). Elle est valable dans tous les pays (Belgique, Espagne, Italie, France, pays du Maghreb et Suisse).

Edito

Par Dominique SIERAKOWSKI – membre du bureau A3P



Juin 2021, un éditio pour La Vague sans Covid : possible ?
OUI, avec une réflexion sur une phrase de William Edwards Deming "*In God we trust; all others must bring data*".
Une introduction certes caricaturale mais intéressante à méditer.

Imaginez, toujours en juin 2021 dans la salle de rédaction du magazine, une discussion anime les participants :
"il fait chaud ici !" - "Ah non, il fait froid !" ...
"Augmente la clim." - "Non, baisse la clim." ...
Et nous voilà au cœur d'un débat d'opinions et de ressentis... Au fait, quelle est la température de la salle ?
Mais, connaître la température, est-ce suffisant pour conclure chaud ou froid ?
Et le débat qui peut suivre : mais où se trouve la sonde de température ? et la température dans la salle est-elle homogène, etc.

Nous sommes loin, de nos "préoccupations pharmaceutiques" ; peut-être pas ? Regardons nos "textes de références" et poursuivons la réflexion sur quelques notions récurrentes qui rythment notre quotidien.

- Les équipements peuvent être "similaires ; comparables, équivalents, identiques"
 - Les procédés doivent être "robustes, reproductibles, ... "
 - Les lots de produits doivent être "conformes, homogènes, ... "

Et tous ces points seront évalués lors d'audits et lors d'inspections. il y aura donc des auditeurs et des audités. Côtés audités, nous devons être dans la démonstration rationnelle technique et ou scientifique. il faudra surtout éviter le débat d'idées, d'opinions, éviter "votre avis ne m'intéresse pas ; j'attends des données, des preuves, ... ". Et voilà, nous y sommes, pour avoir des données, il faut faire des mesures, des analyses, des études, des essais, etc.

Au centre de nos préoccupations il y aura : **mesurer et analyser**.

=> pour vérifier, comprendre, expliquer

=> ainsi **pouvoir garantir et démontrer la maîtrise de la Qualité** des produits qui sortent de nos usines.

Et voilà, ce numéro N°70 va comme toujours nous apporter un support, pour collecter des données et des informations scientifiques mais cette fois dans le domaine **Analytique**.

Bonne lecture

"Take Care"

Plus que jamais A3P a besoin de nous tous, acteurs du Propre et du Stérile.

..... Et le Congrès de Biarritz est en vue !

Merci à nos Contributeurs

Ils ont participé à ce numéro



Gérald de FONTENAY, rédacteur en chef invité de ce numéro
CEBIPHAR

Depuis plus de 25 ans, Gérald a assuré différents postes au sein de sociétés de services analytiques et de CDMO. Aujourd'hui Directeur Scientifique et Technique chez Cebiphar, il continue à œuvrer pour garantir le maximum de fiabilité aux résultats qui sont générés dans ses laboratoires. Il apporte son expertise en validation, vérification et transfert de méthodes analytiques auprès des chefs de projets et des clients de Cebiphar, pour assurer le succès des projets qui lui sont confiés.



Eric CHAPUZET
QUALILAB

Rédacteurs de "Quelques bonnes pratiques de validation des procédures" & "ALCOA... avec un A pour Accuracy"

Eric est Directeur Général de QUALILAB, société spécialisée dans le conseil en management de la qualité, sur le cycle de vie de méthodes d'analyse, les systèmes d'informations, l'intégrité des données et l'analyse de données. De formation scientifique (statistique, informatique, qualité, physiologie, pharmacologie, biochimie), il participe régulièrement à des projets de validation et transfert de méthodes analytiques. Éric anime et réalise également des formations et des audits dans le cadre des étapes du cycle de vie des méthodes d'analyse depuis de nombreuses années.



Marc François HEUDE
SIEGFRIED

Titulaire d'un doctorat en chimie organique, Marc assure, depuis 6 ans, des rôles de chef de projets analytiques d'abord à Adocia (Société de biotechnologie Lyonnaise) puis à Bayer Healthcare. Il exerce aujourd'hui en tant que responsable du service de développement analytique chez Siegfried, un CDMO de l'industrie pharmaceutique qui produit des APIs et intermédiaires de synthèse.



Eglantine BAUDRILLART
NEOVIX BIOSCIENCES

Co-rédactrice de "ALCOA... avec un A pour Accuracy"

Eglantine est Responsable Business Development du groupe neovix biosciences. Ingénieur en génie chimique (ENSIC) et diplômée de l'Advanced Management Programme de l'EDHEC BUSINESS SCHOOL, Eglantine a débuté sa carrière au sein des Laboratoires GSK par la mise en place d'un pôle de modélisation mathématique et statistiques puis a rejoint en 2008 les Laboratoires Expansciences au poste de responsable éco-conception procédés puis a repris la direction d'un laboratoire d'analyse accrédité.



Marc FRANCOIS
TECHNOLOGIE SERVIER

Rédacteur de "Apport des études de stabilités accélérées prédictives (APS) au développement pharmaceutique."

Directeur scientifique au sein du Pôle d'Expertise Développement Pharmaceutique du groupe Servier Marc FRANCOIS a dirigé plusieurs départements analytiques. Il est en charge de la recherche et de l'implémentation d'outils de prédiction pour les analystes comme pour les formulateurs, ainsi que du management d'équipes transverses sur des problématiques spécifiques ou d'actualité (propriétés fonctionnelles des excipients et des articles de conditionnement, dioxyde de titane, nitrosamines, ...)



Isabelle MOINEAU
S

Rédacteurs de "Established Conditions for Analytical Procedures & QbD: current situation and future perspectives for enhanced change management paradigm."

Isabelle Moineau is working as an Analytical Expert Consultant for AKTEHOM. She has a PhD in Biochemistry from the University of Lyon specialising in analytical areas. She has been successfully working for over 15 years in Pharmaceutical industry and has gained a vast, solid professional experience. As analytical leader at AKTEHOM, Isabelle is leading the Analytical Quality by Design implementation in pharmaceutical industries in Quality Control and Development laboratories. She is a successful project Leader and she stimulates any mission team with a positive, innovative approach that results in a productive, efficient team effort to respond to the clients exact needs. She listens, guides and assists customers to evolve with the ever changing Pharmaceutical industry.



Jean-Francois DIERICK
GSK VACCINES

Jean-Francois Dierick is Global Subject Matter Expert for Analytical Validation & Lifecycle at GSK Vaccines. He is owning GSK Vaccines processes related to analytical method validation and method lifecycle (assay transfer, change management, performance monitoring...) and this across 10 commercial and 3 development sites. He is participating in the deployment of Analytical QbD and is leading/supporting several programs aiming at developing digital tools to enhance the monitoring of analytical methods and support/secure change management.



Yves Michel GINOT
SERVIER

Rédacteurs de "Quand les vibrations des molécules permettent de les doser : la spectroscopie proche infrarouge en action."

Après un PhD en Biophysique (Paris VI), quelques années de recherche fondamentale et 3 décennies de développement analytique pour les dossiers AMM chez Servier, un passage par l'expertise à la Ph Fr, la présidence de deux commissions SFSTP sur les spectroscopies vibrationnelles, Y.M. Ginot s'intéresse aux voies d'innovation dans le contrôle continu (en temps réel) qui débouchent sur les procédés de fabrication continue. Il est également Président de Le Studium, Institut d'Etudes Avancées en Région Centre Val de Loire.



Yoann GUT
SERVIER

Ingénieur Polytech Orléans, PhD en spectrométrie de masse et traitement du signal, Y. Gut développe le traitement du signal, l'analyse multivariée, dans les différentes applications de spectroscopies vibrationnelles, imageries hyperspectrales, et le contrôle continu de procédés de fabrication pharmaceutiques et/ou chimique au sein du Pôle d'expertise Développement Pharmaceutique de Servier à Orléans.



Eva BELLANGER
COPHACLEAN

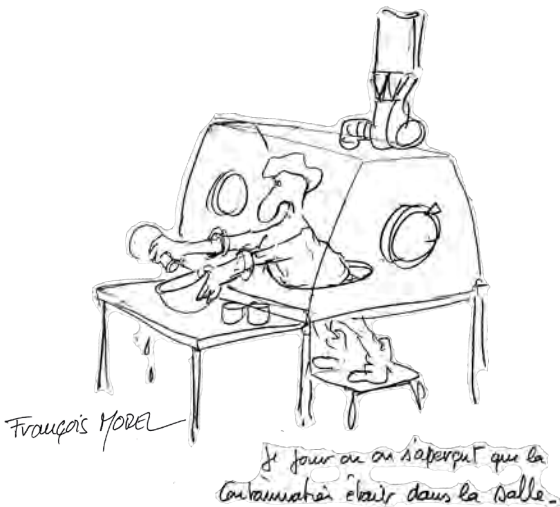
Rédactrice de "Évaporation des solutions à base d'alcool. Quels résidus sur les équipements ?"

Titulaire d'un master, Eva est spécialiste en analyses chimiques à l'état de traces depuis 9 ans. Elle est responsable d'activités analytique chez Cophaclean, société spécialisée en consulting en industries de Santé. Elle intervient pour la réalisation des projets analytiques, formations ou en tant que support technique.

Billet d’Humeur

Par Jean-Charles ROUSSET - Administrateur A3P

Déconfinement, fin de l’isolement mais pas des isolateurs !



Au moment où j’écris ce billet, la terrasse est "the place to be".

Elle est surtout le symbole de la première étape d’un déconfinement progressif à venir. Cela matérialise pour nous tous, la perspective optimiste de retrouver nos plaisirs simples d’avant, d’espérer des congés d’été libérés (même mérités pour certains).

Derrière cette première phase, c’est aussi en ligne de mire un **Congrès A3P en présentiel** à l’automne à Biarritz, avec pleins de gens et d’échanges réels, du partage et de la convivialité.

C’est presque effrayant tellement cela donne envie !

Mais n’oublions pas que tout cela reste encore fragile,

il faut rester humble face aux défis encore à venir causés par cette pandémie : inégalité vaccinale mondiale, dettes publiques abyssales... Ce virus a démontré son imprévisibilité et il reste encore de nombreux challenges à relever pour éviter que ce café (ou autre) en terrasse ne soit qu’une parenthèse entre deux périodes difficiles.

Cette sortie de pandémie est bien sûr le résultat des efforts consentis par tous. Néanmoins, je n’ai jamais été aussi fier de notre industrie pharmaceutique souvent si décriée. **Cette crise a clairement bousculé notre industrie** qui s’est mobilisée comme jamais auparavant et a été **capable de réaliser l’impossible**.

Développer, fabriquer et livrer des centaines de millions de doses de vaccin et tout cela en moins d’un an. C’est fou, quand on sait que les développements de vaccin duraient historiquement plutôt autour d’une dizaine d’années.

Honnêtement, même moi je n’y croyais pas il y a un an.

C’est aussi une toute **nouvelle ère thérapeutique** qui s’ouvre avec les traitements et vaccins à base d’**ARNm**.

C’est en tout cas extrêmement prometteur, excitant et ouvre sur de nouveaux défis (stabilisation des ARNm, optimisation des chaînes logistiques, ...).

Nos isolateurs vont sûrement continuer à tourner à plein régime !
Bonne lecture !

Vous aussi, vous souhaitez participer aux prochains numéros ? Faites-nous parvenir vos propositions d’articles qui seront étudiées par le comité de lecture pour approbation. => Coordonnées des contacts page 2

La Chronique

Par Patrick HIBON DE FROHEN - Chroni-cœur A3P

Le principe de précaution serait-il devenu une arme de destruction massive ?

Le **principe de précaution** est défini comme le principe "selon lequel l'absence de certitudes, compte tenu des connaissances scientifiques et techniques du moment, ne doit pas retarder l'adoption de mesures effectives et proportionnées visant à prévenir un risque de dommages graves et irréversibles à l'environnement, à un coût économiquement acceptable". C'est ainsi qu'est exprimée la loi Barnier du 2 février 1995. Cette loi se basait sur la conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement (Rio de Janeiro, 1992) qui rajoutait : "En cas de risque de dommages graves ou irréversibles, l'absence de certitudes scientifiques absolues ne doit pas servir de prétexte pour remettre à plus tard l'adoption de mesures effectives visant à prévenir la dégradation de l'environnement."

En mots simples, le principe de précaution, tel que défini ci-dessus, exprime l'idée que si les conséquences d'une action sont incertaines et si elles peuvent être potentiellement négatives, alors il vaut mieux s'abstenir de cette action. Concernant les problématiques concernant l'environnement, cela fait sens. Mais **appliqué sans discernement et avec un minimum de bon sens, au système de santé, ce principe a fini par être dévoyé !**

La France l'a inscrit dans sa Constitution en 1995 à la suite d'un certain nombre de crises sanitaires : sang contaminé, vache folle, grippe aviaire. Dans sa version initiale, l'article énonce : "Tout déficit de connaissances scientifiques doit conduire à des mesures effectives mais proportionnées visant à prévenir le risque". Ainsi ce principe s'inscrit clairement dans une conception d'évaluation et de maîtrise du risque. **Il est destiné à restaurer la confiance des citoyens.** Mais, sous la pression de groupes écologistes, la charte de l'environnement de 2005 promulguée par Jacques Chirac a profondément modifié l'esprit de l'article de 1995. Elle a octroyé aux pouvoirs publics le droit d'appliquer ce principe face à toutes incertitudes scientifiques ! Une précision s'impose à ce stade : Il faut distinguer la **prévention**, qui vise les risques avérés, dont l'existence et la fréquence d'occurrence sont connues, et la **précaution**, qui vise les risques hypothétiques, non confirmés scientifiquement. Le plus souvent les législateurs font confiance aux scientifiques pour l'établissement des faits, en pratique, non pas parce que l'esprit et méthode scientifiques sont respectés, mais plutôt en vertu d'une "parole d'experts".

François Rothen s'exprimait ainsi (Quantum – Une histoire de l'atome, PPUR, 2018) : "Ce qui choque dans la formulation du principe, ce n'est pas tant l'adoption de certaines mesures dès qu'un risque est probable ; agir ainsi, c'est faire preuve de prudence. Mais ce qui devrait alerter tout scientifique, c'est l'habitude qui s'installe d'instaurer ces mesures dès qu'il n'existe pas de "certitude scientifique absolue" que ce risque n'existe pas. Or il y a là confusion entre les mondes juridique et scientifique. (...) la méthode scientifique privilégie ce

que l'on pourrait appeler la présomption d'inexistence. Ce n'est pas au scientifique de faire la preuve qu'un risque est inexistant. Si d'aventure il en avait l'intention, la méthode scientifique le lui interdirait. C'est à celui qui redoute un certain risque de faire la démonstration que ce danger existe réellement". Pourquoi, dans ce cas, un tel principe n'a pas été appliqué pour la Chlordécone, le Glyphosate ou les Néonicotinoïdes, aux toxicités pourtant démontrées ?

Et c'est là que ce principe devient une arme de destruction massive. Appliqué sans discernement, comme ce fut le cas, toujours d'actualité d'ailleurs, avec le vaccin Astrazeneca, "**le principe de précaution ne protège pas, il tue**", comme le dit si bien Philippe Charlez (médecin légiste, anatomo-pathologiste, archéo-anthropologue et paléopathologiste). La décision des principaux pays européens de suspendre le vaccin Astrazeneca s'inscrit typiquement "dans cette stratégie de délire idéologique déconnecté de toute considération scientifique".

Au moment où j'écris ces lignes (tout début avril), la Covid a tué en Europe 800 000 personnes sur 750 millions d'habitants soit 0,1 % de la population. Parallèlement, sur les 13 millions de personnes vaccinées avec le vaccin d'Astrazeneca, 33 personnes auraient, je dis bien auraient, succombé à une thrombose. En supposant (ce qui semblerait être le cas selon les dernières informations) que la relation vaccin-thrombose soit établie, le risque en se faisant vacciner avec le vaccin d'Astrazeneca est donc **400 fois inférieur** au risque lié à la Covid-19.

Et c'est ainsi que ce principe est progressivement devenu ... le cancer d'une société européenne en perdition et une arme de destruction massive en regard de tout progrès, de toutes innovations, y compris et surtout dans les domaines scientifiques, comme celui de la Santé. **Il est temps que nos dirigeants en prennent conscience et réinstaurent la confiance des citoyens en matière vaccinale ! C'est le rôle que pourrait avoir un des GIC d'A3P...**

Réglementaire

À ne pas manquer !

Ce point réglementaire trimestriel proposé par la société AKTEHOM, présente les récentes évolutions réglementaires au regard du cycle de vie du produit. Cette sélection des parutions intervenues depuis la précédente édition se focalise sur les grandes thématiques impactant les métiers pharmaceutiques

This quarterly regulatory point presents recent regulatory developments in terms of product lifecycle. Since the previous edition, this selection of publications focuses on the major themes impacting the pharmaceutical professions.

Analytique - Analytical			
Origine	Titre	Type	Date
EDQM	Publication de Pharmedropa 33.3		
	Tous les nouveaux textes et les textes révisés pour des raisons techniques sont publiés dans Pharmedropa pour enquête publique. La date limite de réception des commentaires pour Pharmedropa 33.3 est le 30 septembre 2021	Draft	25/06/2021
FDA	Q3D(R2) Elemental Impurities Guidance for Industry		
	Soumission pour consultation par la FDA du draft guidance ICH Q3D(R2). Les commentaires peuvent être envoyés jusqu'au 12 juillet 2021	Draft	11/05/2021
ICH	Q3C(R8) Guideline on Impurities: Residual Solvents		
	La directive ICH Q3C(R8) sur les solvants résiduels, révisée pour inclure les niveaux d'exposition quotidienne autorisée (PDE) pour le 2-méthyltétrahydrofurane, l'éther méthylique de cyclopentyle et l'alcool butylique tertiaire, a atteint l'étape 4 du processus de l'ICH	Final	23/04/2021
USP	USPNF 2021 Issue 3		
	Publication de nouveaux chapitres généraux et monographies, applicables à partir du 1 ^{er} décembre 2021	Final	1/06/2021

Développement - Development			
Origine	Titre	Type	Date
FDA	Oral Drug Products Administered Via Enteral Feeding Tube: In Vitro Testing and Labeling Recommendations - Guidance for Industry		
	Ce guide fournit des recommandations concernant les tests in vitro des produits médicamenteux oraux, autres que les solutions, administrés par sonde d'alimentation entérale. Les commentaires peuvent être soumis jusqu'au 2 août 2021	Draft	02/06/2021
FDA	Bispecific Antibody Development Programs - Guidance for Industry		
	Ce guide fournit des recommandations d'ordre réglementaire, qualité, non clinique et clinique spécifiques pour les programmes de développement d'anticorps bispécifiques	Final	24/05/2021

Fabrication – Manufacturing			
Origine	Titre	Type	Date
PIC/S	EU GMP Annex 16 on Authorised Person and Batch Release		
	Mise en consultation, pour une période de 3 mois, de l'annexe 16 des GMP, en vue de son adoption par le PIC/S	Draft	15/06/2021

En collaboration avec

AKTEHOM

Dispositifs Médicaux - Produits Combinés

Origine	Titre	Type	Date
EC	Questions & Answers: Application of Regulation on Medical Devices – EU rules to ensure safety of medical devices <i>Clarifications de l'Europe à l'occasion de la mise en application du règlement européen 2017/745 sur les dispositifs médicaux (EU MDR).</i>	Q&A	26/05/2021
FDA	Remanufacturing of Medical Devices - Guidance for Industry <i>Clarifications sur le type d'activités effectuées sur les dispositifs médicaux susceptibles d'être considérées comme du "reconditionnement"</i>	Draft	24/06/2021

Inspection – Inspection

Origine	Titre	Type	Date
FDA	Manufacturing, Supply Chain, and Drug and Biological Product Inspections During COVID-19 Public Health Emergency - Questions and Answers <i>Mise à jour du guidance sur les inspections à distance, pour clarifier certaines questions apparues depuis la première version d'août 2020</i>	Final	17/05/2021
PIC/S	Aide Memoire to Inspections of Blood Establishments and Plasma Warehouses PI 008-4 <i>Mise à jour du guide d'inspection des établissements du sang. Le guide PE 005-4: "PIC/S Good Practice Guidelines for Blood Establishments and Hospital Blood Banks" a également été mis à jour</i>	Final	31/05/2021

Système Qualité - Quality

Origine	Titre	Type	Date
FDA	ICH Q12: Implementation Considerations for FDA-Regulated Products Guidance for Industry <i>Clarifications de la FDA sur l'implémentation de l'ICH Q12. Ce guidance est en consultation jusqu'au 19 juillet 2021</i>	Draft	20/05/2021
FDA	Q12 Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management - Guidance for Industry <i>Adoption par la FDA du guidance ICH Q12</i>	Final	11/05/2021

Conditionnement/Distribution - Packaging/Distribution

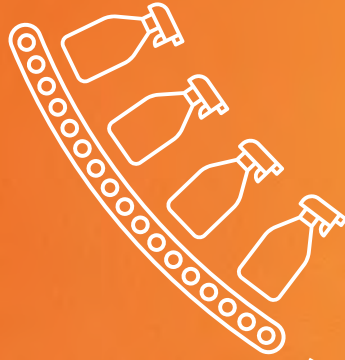
Origine	Titre	Type	Date
ANSM	Décision du 24/06/2021 fixant les modalités et le modèle de déclaration de tout risque de rupture de stock ou de toute rupture de stock d'un médicament d'intérêt thérapeutique majeur prévue à l'article R.5124-49-1 du CSP <i>La déclaration de tout risque de rupture de stock ou de toute rupture de stock d'un médicament d'intérêt thérapeutique majeur mentionné à l'article L.5111-4 est effectuée par télé-déclaration sur la plateforme TRUSTMED accessible sur le site internet de l'ANSM</i>	Décision	25/06/2021
EMA	Frequently asked questions about parallel distribution <i>Clarifications sur les attendus suite à la mise à jour des guidances sur la distribution parallèle, la page Q&A sur le sujet</i>	Q&A	9/06/2021
FDA	Product Identifiers under the Drug Supply Chain Security Act - Questions and Answers <i>Ce guide propose de façon anticipée des réponses aux questions sur les identifiants de produit, tels que requis par le Drug Supply Chain Security Act (DSCSA), pour le conditionnement de certains produits médicamenteux</i>	Final	3/06/2021

En collaboration avec


Ensemble nous sommes plus forts !

En ces temps difficiles, Luke, Lee et Jessica nous aident à poursuivre nos activités de fabrication et d'approvisionnement dans toute l'Europe, l'Amérique et l'Asie. Ils font partie de notre équipe mondiale de collaborateurs qui ont tous pour mission de livrer les produits au moment où vous en avez le plus besoin.

Les petits détails font toute la différence.



Contec est l'un des principaux fabricants de produits de contrôle de la contamination pour le nettoyage des environnements industriels critiques dans le monde entier. Nos lingettes, balais et désinfectants innovants sont utilisés aux quatre coins du globe pour garantir la propreté critique des entreprises pharmaceutiques, biotechnologiques, électroniques, de dispositifs médicaux et de semi-conducteurs.

Pour plus d'informations ou pour échanger avec notre équipe, veuillez nous contacter par e-mail à l'adresse infoeu@contecinc.com ou consulter notre site web.



WHATEVER IT TAKES™

contecinc.com/eu



Vos prochains RDV avec les thèmes abordés en 2021

Après concertation avec nos partenaires locaux et l'application des règles gouvernementales, un ensemble de mesures strictes de santé et de sécurité seront mises en place pour que vous puissiez participer, échanger et partager en toute confiance.



TECHNOLOGIES BARRIÈRES : ISOLATEURS / RABS

14 & 15 SEPTEMBRE

Tours

DOSSIER DE LOT

23 SEPTEMBRE

Lyon

MÉTHODES ANALYTIQUES

28 SEPTEMBRE

Lausanne

COSMETIQUE : AUDIT / NETTOYAGE / DÉSINFECTION

5 OCTOBRE

Lyon

MAITRISE DES PROCÉDES : CPV / QBD / STATISTICAL

6 & 7 OCTOBRE

Lyon

MICROBIOLOGY & ALTERNATIVES METHODS

19 OCTOBRE

Madrid

VALIDATION OF DISINFECTANTS

21 OCTOBRE

Milan

CLOSED SYSTEMS: DISRUPTIVE SOLUTION FOR ASEPTIC PROCESSES

26 OCTOBRE

Belgique

ANNEX1, SINGLE USE, REMOTE AUDIT CONGRES INTERNATIONAL A3P

23,24,25 NOVEMBRE

Biarritz

Programmes & inscription
www.a3p.org



FILLING YOUR NEEDS

ROMMELAG
ENGINEERING

BFS meets COSMECEUTICALS

Ampoules for Skin Care and Anti-Aging

COSMECEUTICALS ARE HIGH-END PRODUCTS THAT ARE COMMONLY USED FOR SKIN CARE AND ANTI-AGEING.

Blow-Fill-Seal ampoules are an innovative packaging technology that is used in pharmaceutical products.

The soft ampoules are made of 100% recyclable materials and are manufactured in pharmaceutical quality.

Most products can be filled without preservatives, a health and marketing advantage.

Blow-Fill-Seal can differentiate your product as a Unique Selling Proposition (USP) in today's congested market.



bottelpack®

BLOW-FILL-SEAL TECHNOLOGY

Quelques bonnes pratiques de validation des procédures analytiques.

Par Eric CHAPUZET - Qualilab, Gérald de FONTENAY - Cebiphar & Marc François HEUDE - Siegfried
GDefontenay@cebiphar.com

Cet article a pour objectif de rappeler quelques fondamentaux de la validation des méthodes physico-chimiques mises en œuvre sur des principes actifs ou des produits finis. Il n'aura toutefois pas la prétention de répondre à tous les cas de figure auxquels un laboratoire de R&D ou de contrôle pourra être confronté.

Les notions d'erreur totale seront développées plus en détail dans l'article suivant ("ALCOA... avec un A pour Accuracy") dans cette revue.



1. Introduction

La validation d'une procédure analytique, qui correspond à l'évaluation approfondie de ses performances (ou de son erreur potentielle), consiste à vérifier, déterminer et estimer plusieurs critères de validation (ou caractéristiques)¹ parmi lesquels :

- la spécificité,
- la fonction de réponse (ou courbe d'étalonnage) si applicable,
- la justesse (nommée "accuracy" dans le texte ICH Q2 (R1)),
- la fidélité qui inclut la répétabilité et la fidélité intermédiaire (la reproductibilité étant généralement évaluée lors d'études de qualification de plusieurs laboratoires),
- la linéarité des résultats,
- la limite de détection/de quantification dans le cadre de la quantification des impuretés/traces/produits de dégradation,
- l'intervalle de travail (appelé aussi "range").

Cette étape de validation n'est qu'une confirmation que la méthode développée répond aux critères fixés par l'utilisateur pour l'usage qui en sera fait en routine. Elle n'intervient en effet qu'après un développement complet et adapté à ce même usage. En amont de la validation, il aura été nécessaire :

- d'évaluer, comprendre et limiter au maximum les sources de variabilité de la méthode analytique (en particulier au travers d'une ou plusieurs études de robustesse) pour les méthodes quantitatives

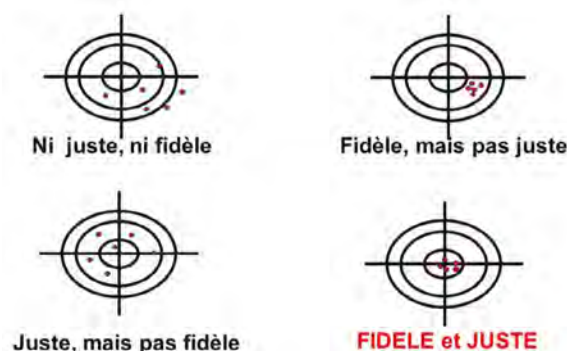


Figure 1 : Représentation de la validation d'une procédure analytique par les cibles.

- d'assurer la spécificité de la méthode avec une étude de dégradations forcées
- de prévalider la technique pour s'assurer qu'elle répondra bien aux critères d'acceptation qui seront fixés dans le protocole de validation (et compléter le développement si ce n'était pas le cas)

Il est en effet inutile de valider une méthode non maîtrisée ou pour laquelle le caractère "stability indicating", s'il est requis, n'est pas assuré. Le développement de la procédure analytique reste une étape cruciale pour une bonne robustesse de la méthode et pour éviter les pertes de temps lors de la validation.

La validation sera alors une confirmation, pour le laboratoire utilisateur et pour les autorités de tutelle, que les performances de la méthode sont en adéquation avec l'usage qui sera fait de la méthode.

Il faut garder en mémoire que l'objectif de toute méthode analytique est de démontrer la Qualité du produit analysé, en particulier en termes d'efficacité (fiabilité du dosage) et de sécurité du patient (déteabilité et quantification des impuretés, substances apparentées et produits de dégradation potentiellement toxiques).

2. Attentes des autorités et besoins scientifiques

Il est intéressant de regarder chaque critère de validation en gardant en mémoire l'impact que cela pourrait avoir sur l'évaluation de l'efficacité du produit ou de la sécurité du patient, tout en veillant de respecter les attentes des autorités : ICH Q2R1^[1], BPF^[2, 3], USP^[4], guide FDA^[5].

Toutefois, il est rarement suffisant de se limiter à "cocher" les cases des requis réglementaires.

Un examen approfondi des résultats de validation est nécessaire pour que l'utilisateur adapte la surveillance de sa méthode selon les performances mesurées en validation.

Ainsi, au lieu de se dire "la méthode est validée, donc mes résultats sont bons", il est vivement conseillé de se donner les garanties que "mes résultats sont fiables, donc ma méthode est valide".

Cela revient à considérer que la connaissance de la méthode et de ses performances, et la surveillance de ces performances permet d'être confiant en permanence sur le fait que les résultats produits par la méthode sont (et demeurent) fiables. Cette vision du cycle de vie de la méthode, avec la validation comme simple étape parmi tant d'autres, est clairement définie dans le draft USP <1220>^[6] et le guide FDA^[5].

La fiabilité d'une mesure dépend des erreurs potentielles liées à cette mesure. Cette erreur peut se décomposer en 2 parties distinctes :

- L'erreur systématique (correspondant à la justesse/ "trueness"). Elle se définit comme l'écart de la moyenne de plusieurs valeurs

obtenues par rapport à la valeur considérée comme vraie (cette valeur vraie n'est souvent qu'une estimation car elle est rarement connue de manière exacte).

• L'erreur aléatoire (correspondant à la fidélité/ "precision"). Elle se définit comme l'erreur sur chaque valeur individuelle, due aux différentes sources de variabilité de la procédure analytique (et qu'on aura cherché à réduire au maximum durant le développement). Autrement dit, il s'agit de la dispersion des résultats que l'on obtiendra si l'on refait l'analyse x fois.

L'illustration de ces 2 types d'erreurs est fréquemment représentée sous forme de cibles (Figure 1) :

- Au centre : la valeur vraie
- Autour du centre, des limites (critères d'acceptation en validation, seuil d'alerte, limite de spécifications, etc.)
- En rouge, les mesures effectuées

Des résultats fidèles et justes seront entachés d'une incertitude plus faible, et seront donc fiables. Sinon, il faut avoir conscience de l'erreur associée aux mesures obtenues avec la méthode, en lien avec l'incertitude de chacune des mesures. Dans la cible de la figure 1, un point rouge en dehors de la cible illustre le "cauchemar" des laboratoires de contrôle Qualité = résultat OOS lié à la variabilité analytique, pour lequel il est compliqué d'assigner une cause formelle.

En résumé, valider une méthode d'analytique revient à démontrer une **capacité à mesurer**, quantifier, qualifier, caractériser **de façon fiable**.

3. Identifier les sources de variabilité et en mesurer l'impact

L'incertitude de mesure peut provenir de nombreuses sources (Figure 2 et Figure 3). Il est important d'identifier les sources de variabilité, puis d'optimiser les conditions opératoires pour réduire au maximum leur impact lorsqu'elles sont détectées.

On peut voir, dans cette Figure 2, que différents critères de validation décrits dans ICHQ2(R1) sont étudiés car ils sont de potentielles sources d'erreurs aléatoires ou systématiques. Mais au final, c'est l'impact global sur l'incertitude du résultat qu'il faut considérer. L'article sur le A de ALCOA, dans la présente revue, approfondira ces notions d'erreur totale, si importantes pour appréhender au mieux la fiabilité des mesures effectuées au laboratoire.

4. Design et documentation

Le processus de validation analytique fait suite au développement de la méthode et inclut une partie expérimentale et une partie documentaire qui permettent d'assurer la traçabilité des données. En particulier un protocole et un rapport doivent être écrits et signés

respectivement avant et après la validation. Ces 2 documents doivent faire l'objet d'un suivi des différentes versions et des différents changements.

- Le protocole doit contenir a minima :
- les critères de validation qui seront évalués (définis en fonction du but de la méthode) et/ou le design choisi,
 - la méthodologie pour réaliser ces tests,
 - la référence de la méthode à valider et sa version,
 - ainsi que les critères ou limites d'acceptation de chaque critère (incluant les attentes en termes de traitements statistiques et/ou graphiques).
- On pourra aussi faire référence dans le protocole aux études de développement dont les résultats seront repris dans le rapport de validation (robustesse et dégradations forcées en particulier)
- Le rapport doit lui contenir a minima :
- La référence de la procédure validée ainsi que sa version.
 - Le cas échéant, les résultats d'études de développement qui complètent la validation.
 - Les différentes déviations rencontrées durant la validation.
 - Les résultats de validation et les conclusions sur les performances de la méthode.
 - Les données brutes pertinentes (résultats, chromatogrammes types).
 - Et les éventuelles modifications à effectuer sur la procédure analytique (compléments d'information en particulier).

Le design de validation, c'est-à-dire les critères à vérifier, sont décrits dans l'ICH Q2(R1) en fonction du but de la méthode (Tableau 1).

Type of analytical procedure	Identification	Testing for impurities		Assay ~ dissolution (measurement only) ~ content/potency
		Quantitat.	Limit	
Accuracy	-	+	-	+
Precision Repeatability Interm.Precision	-	+	-	+
	-	+ (1)	-	+ (1)
Specificity (2)	+	+	+	+
Detection Limit	-	- (3)	+	-
Quantitation Limit	-	+	-	-
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

- signifies that this characteristic is not normally evaluated
+ signifies that this characteristic is normally evaluated
(1) in cases where reproductibility has been performed, intermediate precision is needed
(2) lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s)
(3) may be needed in some cases

Tableau 1 : Paramètres à vérifier pour la validation d'une méthode d'analyse en fonction du but de la méthode.

Spécificité / Sélectivité

Le terme "Spécificité" est aujourd'hui utilisé pour les deux termes.

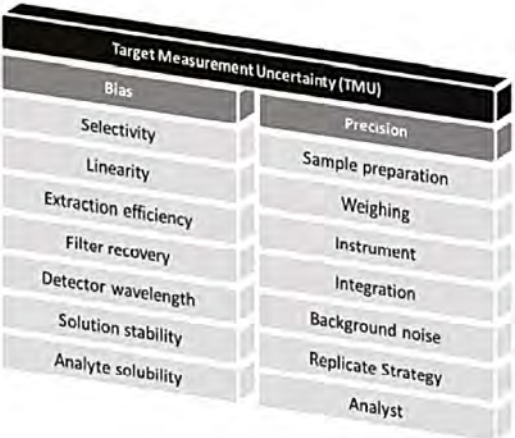


Figure 2 : Résumé des différentes sources de variabilité qui impacte le biais (erreur systématique) et la précision (erreur aléatoire)⁽⁷⁾

Cependant, on utilise souvent le terme de "sélectivité" pour une méthode qui fournit une réponse pour plusieurs analytes (méthodes séparatives en particulier).

La spécificité d'une procédure analytique est donc sa capacité à évaluer sans équivoque l'analyte, c'est-à-dire à vérifier que rien n'interfère avec la réponse de l'analyte (ou alors de manière non significative).

Pour vérifier la spécificité, on analyse a minima : (i) un blanc, (ii) un placebo (mélange d'excipients sans l'analyte d'intérêt), (iii) un standard et (iv) un produit fini. On pourra également inclure des impuretés spécifiques si nécessaire. On vérifie ensuite que dans le placebo, aucune interférence significative n'est observée.

Le pourquoi et le comment

L'absence d'interférence au niveau de la mesure de l'analyte est évaluée afin de garantir que la quantification ne comportera pas d'erreur. Cette erreur pourra être systématique (interférence stable dans le temps) ou aléatoire (si le composé interférant peut être présent à des concentrations variables).

Il est tout à fait possible de tolérer une interférence si cette dernière est assez faible pour ne pas générer un biais inacceptable (moins de 1 ou 2 % du signal à la cible, par exemple). Mais il convient de s'assurer que l'interférence est constante (qu'elle ne varie pas d'une production à l'autre ou qu'elle n'évolue pas durant une étude de stabilité).

Si une méthode n'est pas spécifique (cas des méthodes de dosage titrimétriques ou des dosages par UV direct), il convient d'avoir une autre méthode qui permette de mieux cerner la composition du produit testé (tests additionnels de pureté par méthode séparative)

Linéarité (des résultats)

La linéarité devrait s'entendre comme la linéarité de la procédure analytique, c'est-à-dire sa capacité, dans l'intervalle de dosage considéré, à fournir des teneurs expérimentales strictement proportionnelles à la teneur en analyte dans l'échantillon.

Il ne faut pas confondre la linéarité avec la fonction de réponse (appelée aussi courbe d'étalonnage) qui représente la réponse analytique en fonction de la concentration du/des standard(s). Or, il est tout à fait possible que la fonction de réponse ne soit pas linéaire (par exemple, avec un détecteur ELSD, pour un dosage Elisa..) mais que la linéarité des résultats soit bien assurée. C'est bien cela qui est recherché.

Pour vérifier la linéarité, il convient de tester plusieurs niveaux de concentrations répartis dans l'intervalle de dosage. On trace ensuite le graphe de la concentration de l'échantillon déterminé expérimentalement en fonction de la concentration théorique. Les critères sur les résultats de la régression linéaire peuvent par exemple être d'avoir une droite de pente proche de 1 et une ordonnée

à l'origine proche de 0 avec un coefficient de détermination supérieur à 0.99.

Or, le guide ICH Q2(R1) n'exige qu'un critère sur le coefficient de corrélation, un graphe et l'équation de la régression, ainsi que la somme des carrés des résidus, calculés lors de la régression. Nous vous rassurons, ce dernier paramètre est rarement exigé dans les rapports car son interprétation n'apporte pas de valeur ajoutée à l'objectif d'une validation de procédure analytique.

Le pourquoi et le comment

L'intérêt de ce paramètre est d'identifier un éventuel effet de la matrice, si l'étude est faite sur un reconstitué. C'est pour cela que l'intérêt d'effectuer des linéarités en solution est fort limité, sans cette étude sur reconstitués. Seule cette linéarité des résultats est importante pour garantir la fiabilité des analyses et est totalement liée à l'étude de la justesse, comme l'indique la figure 2.

Pour l'étalonnage, si les réponses obtenues avec la méthode ne sont pas linéaires, il est alors possible de déterminer une autre fonction mathématique (pondérations, modèle quadratique, log/log ou autres transformations) pour obtenir des résultats linéaires.

Justesse

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 soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée (ex : standard international, standard d'une pharmacopée, résultat obtenu par une autre méthode validée). Il s'agit d'une mesure de l'erreur systématique (biais).

Pour la détermination de la justesse, conformément à ICH Q2(R1) dans le paragraphe "Accuracy", il est recommandé de le faire a minima avec 3 niveaux de concentration et 3 réplicas par niveau (9 déterminations). Ces résultats serviront également pour la détermination de la linéarité. Pour l'évaluation de la justesse (et de linéarité), il convient de créer des échantillons reconstitués dont la concentration de l'analyte est connue dans la même matrice que le produit qui sera analysé. Il est parfois délicat d'accéder à ces reconstitués qui soient préparés avec un processus similaire à celui utilisé pour le produit fini. Les reconstitués produits au laboratoire peuvent parfois engendrer des problèmes d'homogénéité qui conduisent à des conclusions erronées sur les performances de la méthode.

Dans le cadre de comprimés ou autres formes galéniques solides ou semi-solides, une solution consiste à ajouter une quantité connue d'analyte sur un mélange d'excipients. Cette voie ne permet pas de mimer parfaitement le mécanisme d'extraction de l'analyte de la matrice. Ce phénomène d'extraction pourra cependant être évalué

partiellement lors des études de fidélité même grossièrement (en vérifiant que la teneur obtenue pour chaque préparation est bien celle attendue).

La justesse est exprimée en termes de pourcentage de recouvrements, c'est-à-dire que l'on calcule pour chaque niveau le recouvrement moyen (quantité calculée/quantité ajoutée, en tenant compte éventuellement de la quantité initiale si on n'a pas de composé sans l'analyte recherché, comme dans le cas des solvants résiduels). En effet, pour chaque détermination on calcule le ratio entre la teneur déterminée expérimentalement par la teneur déterminée théoriquement. On effectue ensuite la moyenne des recouvrements. Les recouvrements de chaque niveau doivent être inclus dans les critères d'acceptation pour la justesse. Limiter le raisonnement sur la moyenne de tous les niveaux pourrait en effet masquer des disparités entre niveaux (il conviendrait alors de limiter la dispersion des données). Il convient également de fournir les intervalles de confiance de la moyenne, conformément à ICH Q2(R1)

Le pourquoi et le comment

La vérification de la justesse est importante. Elle permet de vérifier qu'à chaque niveau de concentration, la procédure analytique va mesurer avec justesse la teneur en analyte (ou, pour reprendre l'image des cibles, si on bouge la cible, on continuera à tirer dedans et pas à l'endroit où était la cible auparavant). La moyenne des recouvrements sur les réplicas de chaque niveau permet de détecter un biais sur un des niveaux. Il est à noter que l'analyse de la linéarité de la méthode et des résultats doit mener à la même conclusion que l'étude de la justesse.

En fonction des niveaux de concentrations, il sera possible de proposer des cibles plus ou moins larges. En effet, plus la concentration est faible, plus l'incertitude de mesure augmente, et il est communément admis d'élargir les critères d'acceptation au point bas du range étudié.

Fidélité

La Fidélité ("precision" en anglais) d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord (mesure de la dispersion) entre une série de mesures obtenue à partir de plusieurs prises d'essai d'un même échantillon homogène, dans les conditions de la procédure analytique.

- C'est une mesure de l'erreur aléatoire qui s'évalue selon plusieurs conditions :
- La répétabilité.
 - La Fidélité intermédiaire.
 - La reproductibilité.

Ces conditions sont schématisées par des couches de "l'oignon de la variabilité" présenté dans la Figure 3.

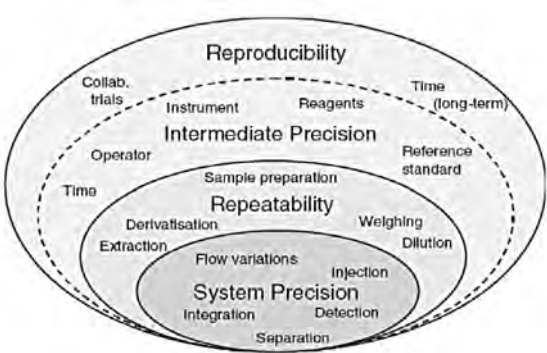


Figure 3 : représentation des différentes couches de variabilité par niveau pour qualifier la précision ou fidélité.⁽⁸⁾

Chaque couche dans cette *Figure 3* se caractérise par des sources de variabilité différentes :

- La première couche correspond aux sources de variabilité du système utilisé. La qualification des équipements doit assurer une couche aussi faible que possible à ce niveau-là.
- La deuxième couche "répétabilité" inclut essentiellement la variabilité de la préparation d'échantillon.
- La troisième couche "Fidélité intermédiaire" inclut les sources de variabilité entre différents étalonnages, différents jours, instruments, différents techniciens, mais potentiellement aussi des variations saisonnières, rarement évaluées en validation (température du laboratoire entre été et hiver, quantité de lumière passant par les fenêtres du laboratoire, etc..).

Une 4^{ème} couche, généralement non évaluée en validation, inclut la variabilité entre laboratoire. Elle est généralement évaluée (ou subie, si on n’y prend pas garde) lors des transferts analytiques ou lors de co-validation entre 2 laboratoires.

La mesure de la Fidélité est souvent effectuée par la détermination des coefficients de variation pour la répétabilité et la Fidélité intermédiaire. La répétabilité est évaluée (selon ICH Q2(R1)) avec :

- 9 déterminations répartis sur 3 niveaux et 3 réplicas par niveau (a minima)

ou

- 6 déterminations à 100% de la cible de validation.

Pour évaluer la Fidélité intermédiaire, il faut multiplier les séries en prenant soin de modifier le technicien et/ou le système utilisé et/ou le jour de la mesure. Un minimum de 3 séries est nécessaire pour pouvoir estimer la variabilité entre les séries.

Les coefficients de variation de la répétabilité et de la Fidélité intermédiaire sont déterminés via une analyse de type ANOVA (analyse de variance). Pour faire ces calculs il est nécessaire de déterminer les variances de répétabilité et de Fidélité intermédiaire (incluant des variabilités INTRA série et INTER série) puis d'en déduire les coefficients de variations. Les définitions sont données dans le *Tableau 2*.

Type	Sous type	Notations
Variances	Répétabilité (intra série)	σ_w^2
	Inter séries	σ_n^2
	Fidélité intermédiaire	$\sigma_{PI}^2 = \sigma_w^2 + \sigma_n^2$
Coefficients de variation	Répétabilité (intra série)	$\frac{\sqrt{\sigma_w^2}}{\bar{X}} \times 100$
	Inter séries	$\frac{\sqrt{\sigma_n^2}}{\bar{X}} \times 100$
	Fidélité intermédiaire	$\frac{\sqrt{\sigma_{PI}^2}}{\bar{X}} \times 100$

Tableau 2 : Définition des variances et des coefficients de variation pour l'évaluation de la précision

La méthode pour la détermination des coefficients de variation de répétabilité et de Fidélité intermédiaire se fait selon la méthodologie présentée dans le *Tableau 3* pour p séries à n valeurs par série.

	Somme des carrés (SS)	Degré de liberté	Variance moyenne	Coefficients de variations
Entre séries globales (entre séries + intra séries)	$\sum_{j=1}^p \square \sum_{i=1}^n \square (x_{ij} - \bar{X}_j)^2$	p - 1	$\frac{SS_{entre\ séries}}{Degré\ de\ liberté}$ (= A)	-
Intra séries	$\sum_{j=1}^p \square n_j (X_j - \bar{X}_j)^2$ Avec nj, le nombre de valeurs de la série j	p x (n - 1)	$\frac{SS_{intra\ séries}}{Degré\ de\ liberté}$ (= σ_w^2)	$\frac{\sqrt{\sigma_w^2}}{\bar{X}} \times 100$ Répétabilité
Entre série pure	-	-	$\frac{(A - \sigma_w^2)}{n}$ (= σ_n^2) Si $\sigma_n^2 \leq 0$ alors $\sigma_n^2 = 0$	-
Fidélité intermédiaire	-	-	$\sigma_{PI}^2 = \sigma_w^2 + \sigma_n^2$	$\frac{\sqrt{\sigma_{PI}^2}}{\bar{X}} \times 100$ Fidélité intermédiaire

Tableau 3 : calcul du coefficient de variation pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire par une analyse de type ANOVA. On considère p séries à n valeurs par série et $\bar{X}_j$ les moyennes des séries j et $\bar{X}_g$ la moyenne globale de toutes les valeurs.

Attention, les formules de calcul présentées dans le *Tableau 3* ne sont valables que que s’il y a le même nombre de répétition par série et dans le cas d’un design avec des préparations indépendantes de mêmes cibles.

Le pourquoi et le comment
L'objectif est d'estimer la variabilité de la méthode qui sera rencontrée en routine, durant le cycle de vie de la méthode. Il n'est donc pas judicieux de travailler "exceptionnellement bien" durant la validation, avec le risque de sous-estimer cette variabilité. Cela reviendrait à minimiser le risque analytique réel, comme souligné dans l'article "ALCOA... avec un A pour Accuracy" dans ce même journal.

Trop souvent le CV de répétabilité est calculé uniquement sur la première série. Dans la méthode proposée, le CV est représentatif de toutes les valeurs générées. En effet, il est important d'estimer le CV de répétabilité sur l'ensemble des valeurs (via les variances de chacune des séries) pour avoir une estimation au plus proche de la vérité. Ce CV est représentatif des 2 premières couches de l'oignon de la variabilité présenté dans la *Figure 3*. De même, le CV de fidélité intermédiaire est parfois calculé comme l'écart-type de toutes les valeurs par rapport à la moyenne générale (sans tenir compte du fait qu'elles proviennent de séries différentes). Ce calcul est erroné et ne rend pas compte de la variabilité inter séries, ce qui a pour conséquence de minimiser le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire. Ce CV est représentatif des 3 premières couches de l'oignon de la variabilité présenté dans la *Figure 3*.

Il est donc impossible que le CV de fidélité intermédiaire soit inférieur au CV de répétabilité. Au mieux, l'épaisseur de la 3^{ème} couche est infime, mais elle ne peut en aucun cas diminuer l'épaisseur de la 2^{ème} couche.

Limite de détection (LOD)/ Limite de quantification (LOQ)

L'analyse des limites d'une méthode est essentielle pour se donner les garanties qu'on est bien capable d'analyser l'analyte recherché en deçà de la limite acceptable pour cette impureté. Pour les méthodes quantitatives, il faudra garantir qu'on peut quantifier de façon fiables tous les résultats rapportables (au-dessus du "reporting threshold", défini selon la posologie, comme décrit dans la série des guides ICHQ3 [9, 10, 11, 12]).

La limite de détection se définit comme la plus petite teneur de l'analyte provenant d'un échantillon pouvant être détectée. La limite de quantification est la plus petite teneur de l'analyte pouvant être dosée de manière exacte (combinaison des erreurs systématique et aléatoire). La détermination de la LOD n'est requise que pour les essais limites alors que la LOQ est déterminée pour les dosages d'impuretés ou de traces. Quelle que soit la méthode de détermination utilisée, il conviendra de vérifier la fiabilité des mesures à cette limite [5]. ---->

La détermination des LOD et LOQ peut se faire selon plusieurs méthodes décrites dans le guide ICH Q2(R1). Chacun peut choisir son mode de calcul. Ces différentes méthodes ne donnent pas toujours le même résultat, mais l'essentiel reste de garantir que la LOQ sera inférieure ou égale au "reporting threshold".

Le pourquoi et le comment
Il n'est pas forcément nécessaire de rechercher la limite la plus basse possible. En effet, l'"Intended Use" est de rapporter des valeurs à partir du "Reporting Threshold". Valider à des niveaux inférieurs n'apporte donc pas de valeur ajoutée. Il est donc possible de définir la "Working LOQ" comme étant le point bas de notre intervalle de dosage souvent définis par les limites de report décrites dans les guides ICH Q3. Ainsi, ce niveau bas de concentration sera bien validé en termes de justesse et de fidélité, comme attendu par les autorités.

Intervalle de mesure

L'intervalle de mesure est l'intervalle dans lequel la méthode assure un degré acceptable de linéarité, justesse et fidélité pour toutes les mesures dont les résultats sont compris dans cet intervalle. Généralement, les intervalles de mesure attendus sont résumés dans le Tableau 4 mais peuvent être plus large si cela est nécessaire.

	Intervalle de mesure
Dosage Substance	80 - 120% de la cible produit
Uniformité de teneur	70 - 130% de la cible produit
Dissolution	+/- 20% de l'étendue considérée
Impuretés	De la limite de report à 120% de la spécification

Tableau 4 : Intervalle de mesure recommandé en fonction du type de procédure analytique

Combinaison de l'erreur systématique et de l'erreur aléatoire

L'exactitude (au sens ISO du terme) est le paramètre qui inclut à la fois l'erreur systématique et l'erreur aléatoire (justesse + fidélité), bien que les notions de justesse et d'exactitude soit parfois confondues dans certains textes réglementaires. Il est donc plus adapté, dans le domaine pharmaceutique, de parler d'erreur totale (ou d'erreur combinée).

Il s'agit de la vraie finalité d'une validation de procédure analytique, qui est de garantir la fiabilité de chacune des mesures (au sens individuel) qui seront obtenues ultérieurement. L'incertitude de mesure et la notion d'erreur totale sont intimement liées.

Un autre intérêt de cette démarche est qu'un potentiel problème d'erreur systématique important peut être compensé par une erreur aléatoire faible et vice-versa.

Ces notions d'erreur totale sont développées dans l'article suivant de cette revue ("ALCOA... avec un A pour Accuracy").

Stabilité des solutions

La stabilité des solutions, souvent incluse dans l'étude de robustesse, est importante pour garantir que les données générées restent exactes et permet de connaître les temps de conservation de ces dernières.

La stabilité doit être effectuée sur les solutions :

- De standards (solutions mère et fille dans les fioles et dans les flacons).
- D'échantillons.
- De phases mobiles.

La stabilité des solutions s'entend au regard du but de la procédure analytique.

Pour un dosage, il s'agira de vérifier que la teneur déterminée ne varie pas au-delà de la variabilité analytique classique. Pour la recherche

d'impuretés, il faudra regarder attentivement les variations des profils chromatographiques, et vérifier qu'aucune nouvelle impureté n'apparaît ou qu'aucune impureté présente dans l'échantillon ne disparaît au fur et à mesure des analyses

L'étude consiste à effectuer une mesure de chaque solution considérée (certains laboratoires faisant des répétitions de ces solutions) à différentes échéances, et de la comparer par rapport à un nouveau standard de référence. L'écart par rapport à la valeur initiale est alors calculé et doit être conforme aux critères d'acceptation définis. Ces critères sont à définir en fonction de ceux définis pour la justesse et la fidélité

On peut citer une autre pratique, pour les méthodes séparatives, qui consiste à suivre l'aire des pics d'une même solution à intervalle régulier. L'absence d'évolution significative des aires est une autre façon de garantir que la fiabilité des mesures n'évolue pas avec l'âge des solutions analysées. Cela ne sera possible que si l'étude est faite en continu, sans arrêter le système d'acquisition, afin de comparer des valeurs comparables.

Critères/limites d'acceptation

Les critères/limites d'acceptation de la validation de la procédure analytique sont à définir en fonction de plusieurs critères et notamment :

- Le domaine d'application (pharmaceutique, agroalimentaire, cosmétique, "medical device"...).
- Les spécifications du produit, définies dans le dossier. Ces spécifications incluent une marge pour la variabilité de production, des prélèvements et la variabilité analytique. Il convient donc de bien partager l'espace "disponible" entre les limites de spécifications entre la production et l'analytique et de se garder une marge de sécurité pour éviter les potentiels résultats OOS du fait de la variabilité analytique.
- L'usage qui sera fait de la méthode et des résultats qui en seront issus.

Beaucoup de critères descriptifs empiriques existent dans le domaine pharmaceutique. Nous pouvons conseiller le visionnage de la vidéo YouTube partagée par Oona McPolin (<https://www.youtube.com/watch?v=Vz2TUleMjY0>) qui explique l'origine de certains des critères classiquement rencontrés.

Nous ne fournirons pas d'exemples dans cet article, car ils ne pourraient être que des exemples, qui doivent être adaptés au contexte de votre analyse, et aux performances déjà connues de votre méthode.

On peut toutefois mettre l'accent sur certaines erreurs classiques à éviter :

- **Critères statistiques inadaptés.** Certains tests statistiques (Cochran, Fisher, Student) peuvent vous apporter des informations sur les données générées en validation. Toutefois, du fait du faible nombre de données générées, ces tests ne sont pas toujours concluants. Et ils sont rarement la preuve que votre méthode génère des résultats fiables ou pas. Utiliser ces tests était une pratique courante, mais il est vivement conseillé de ne pas utiliser les conclusions de ces tests comme étant des critères d'acceptation.
- **Critères trop larges.** Si cela pouvait "faciliter" la rédaction d'un rapport de validation, avoir des critères trop larges ne permettra pas de garantir la fiabilité des mesures qui seront générées ensuite.
- **Critères trop étroits (à mauvais escient).** Un exemple de "mauvaise" pratique parfois constatée est un critère de biais systématique sur des impuretés fixé très bas dans le protocole de validation, sans tenir compte des biais qui seront apportés ensuite en arrondissant les résultats (par exemple : biais maximum = 5% pour une impureté devant être inférieure à 0,5%, alors que le fait d'arrondir un résultat obtenu à 0.25% à 0.3% représente à lui seul un

biais de 20%). Un autre exemple concerne le niveau d'interférence acceptable lors de l'étude de spécificité. Comme signalé dans la *Figure 2*, une interférence peut engendrer un biais systématique. Mais si, par exemple, un biais systématique total de 2% est accepté, il ne paraît pas logique de limiter alors chaque interférence à un niveau extrêmement faible (0.05%, par exemple). Mais si un critère est fixé de façon étroite pour des raisons de sécurité de patient (et donc à bon escient), nous ne pouvons que vous encourager à faire ainsi.

Des limites devront donc être fixées pour chacun des critères de validation, mais sans oublier qu'ils sont inter-reliés, comme illustré en *Figure 2*. Les limites fondamentales sont donc celles fixées sur le l'erreur systématique et sur le l'erreur aléatoire, les 2 piliers de l'incertitudes. Les autres limites permettent de mieux cerner certaines sources de ces 2 erreurs à caractériser.

La combinaison des 2 erreurs par l'erreur totale (combinée) reste le meilleur moyen de contrôler la fiabilité des mesures qui seront générés. Parmi les critères sur la combinaison des 2 sources d'erreur, on peut retrouver des critères sur la capacité d'une méthode ou des graphes incluant des courbes de niveaux de risques (Operating characteristic curves) [12, 13], qui sont des moyens simples pour estimer le niveau de risque analytique, sans toutefois permettre une réelle gestion de ces risques.

La tendance actuelle va vers le profil d'exactitude et son intervalle de Tolérance [13] ou de l'intervalle de Prédiction [4] qui restent des outils statistiques un peu plus complexes mais plus puissants car ils permettent de gérer et contrôler le risque analytique. Dans tous les cas, la détermination de ces limites d'acceptation est cruciale et doit être effectuée, certes pour répondre aux exigences réglementaires, mais également pour s'assurer que la procédure analytique sera scientifiquement performante, c'est-à-dire qu'elle sera juste et fidèle (voir *Figure 1*).

5. Après la validation

Après qu'une méthode a été validée, il est vivement conseillé de la mettre "sous surveillance".

La surveillance au quotidien réside dans la conformité des critères fixés dans les tests de conformité du système d'analyse (SST= System Suitability test). Selon les techniques et l'objectif des méthodes, ces tests incluent des critères de qualité du signal (symétrie de pics, etc...) des critères de bon fonctionnement de l'équipement (répétabilité des mesures en particulier), des solutions de contrôle, des critères chromatographiques pour les méthodes séparatives, etc.

Outre la carte de contrôle classiquement mise en œuvre pour les résultats de différents lots produits, la tendance va vers la mise en place de carte de contrôle des différents paramètres du SST (critère de résolution, symétrie de pic, répétabilité de mesure, suivi de contrôle qualité (interne ou externe), etc) afin d'anticiper sur des dérives ou des dysfonctionnements potentiels, qui seront plus facilement détectables.

Par ailleurs, en cas de changement, il faudra évaluer les besoins de revalidation partielle ou totale selon les besoins. Parmi les changements, non exhaustifs, qui conduisent à une revalidation, l'ICH Q2(R1) [1] cite :

- Les changements de synthèse de la "drug substance" ce qui inclut généralement la source de cette dernière.
- Les changements de composition des produits finis.
- Les changements de procédure analytique.

Un changement de laboratoire est généralement géré sous forme de transfert analytique, qui peut faire l'objet d'études inter-laboratoires ou de revalidation (totale ou partielle) au sein du laboratoire receveur. Dans tous les cas, une connaissance approfondie de la méthode, de ses

sources de variabilité à maîtriser et de ses performances sont autant d'atouts pour alimenter vos analyses de risques et limiter ces besoins de revalidation aux seuls tests pertinents au vu du changement prévu.

Conclusion

Comme signalé en préambule, il n'est pas possible de répondre à tous les cas de figure qui peuvent se rencontrer en validation à travers seulement quelques pages.

ICHQ2(R1) insiste sur la responsabilité des détenteurs d'AMM de démontrer, avec un protocole adapté, que la méthode présente des performances suffisantes pour l'usage qui sera fait de la méthode.

Les tendances actuelles^[5,6] remettent l'exercice ponctuel de validation à sa place, entre un développement analytique qui permette d'atteindre un niveau de maîtrise adéquat, et une utilisation contrôlée. Nous sommes aussi totalement conscients que certaines exigences régionales iront à l'encontre d'éléments proposés dans cet article. Il convient à chacun d'ajouter à leur protocole de validation les critères ou les tests statistiques spécifiquement requis dans tel ou tel pays.

Le message principal restera qu'au final, la connaissance de l'incertitude du résultat est l'objectif principal d'une validation. Cette incertitude est liée à l'erreur totale, combinaison d'une erreur systématique et d'une erreur aléatoire qui restent indissociables lors des analyses en routine. L'article qui suit démontrera l'importance de cette erreur totale.



Références

- [1] : ICH Q2 (R1) "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology", 2005.
 [2] : FDA: 21CFR : Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations, 2020.
 [3] : EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines.
 [4] : US Pharmacopoeia: USP <1210>; <1225>; <1226>.
 [5] : FDA Guidance: "Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics", 2015.
 [6] : Pharmacopeial Forum (PF), 1220 Analytical Procedure Life Cycle — PF 46(5), 2020.
 [7] : USP stimuli to revision process 42(5) ANALYTICAL CONTROL STRATEGY, 2016.
 [8] : J. Ermer, C. Burgess, G. Kleinschmidt, J. H. McB. Miller, D. Rudd, M. Bloch, H. Wätzig, M. Broughton et R. A. Cox, Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice, Wiley, 2005.
 [9] : ICH Q3A(R2) IMPURITIES IN NEW DRUG SUBSTANCES, 2006.
 [10] : ICH Q3B(R2) IMPURITIES IN NEW DRUG PRODUCTS, 2006.
 [11] : ICH Q3C(R8) IMPURITIES:GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENTS, 2021.
 [12] : ICH Q3D(R1) GUIDELINE FOR ELEMENTAL IMPURITIES, 2019.
 [13] : P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg et M. Lallier, «Validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches», S.T.P. Pharma Pratiques, vol. 13, p. 101, 2003.
 [14] : USP <1080> "BULK PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS— CERTIFICATE OF ANALYSIS", 2021.
 [15] : Small Molecules Collaborative group and USPC Staff. Pharm Forum 35(3) page 765 - 771, 2009.
 [16] : G. de Fontenay, J. Respaud, P. Puig, C. Lemaire, «Analysis of the performance of analytical method, Risk Analysis for routine use», S.T.P. Pharma Pratiques, vol. 21, n°12, pp. 123-132, 2011.

See The Light



*The Future of Sustainable LAL
Recombinant Cascade Reagent
Has Arrived!*



PYROSMART™
NEXT GEN

Recombinant *Limulus* Amebocyte Lysate

Keep Your Method, Make An Impact

- **No Animal Content - Horseshoe Crab Blood Free**
- Same Cascade, Instrument & Preparation Steps
- No Cross Reactivity With 1,3-β-D-Glucans



Associates of Cape Cod Int'l, Inc.

Your Endotoxin & Glucan Experts

www.acciuk.co.uk • (+44) 151.547.7444

Associates of Cape Cod, Inc. - a Seikagaku Group Company



ALCOA... avec un A pour Accuracy.

Par Eglantine BAUDRILLART - Neovix Biosciences, Eric CHAPUZET - Qualilab, Gérald de FONTENAY - Cebiphar & Marc François-HEUDE - Siegfried
e.chapuzet@qualilab.com

Générer des données analytiques, c est très facile. Il suffit de mettre en œuvre une analyse, d obtenir une réponse, et de l interpr ter en générant un résultat chiffré. Générer un résultat fiable, qui soit représentatif du produit qu on souhaite caractériser, et permette d apporter des garanties sur sa Qualité, est un processus bien plus complexe. Les BPF⁽¹⁾ comme tout autre système de management de la Qualité ou réglementation, exige d ej  d avoir un équipement qualifié, utilisé par un personnel formé, dans un environnement contrôlé. Les fondamentaux...

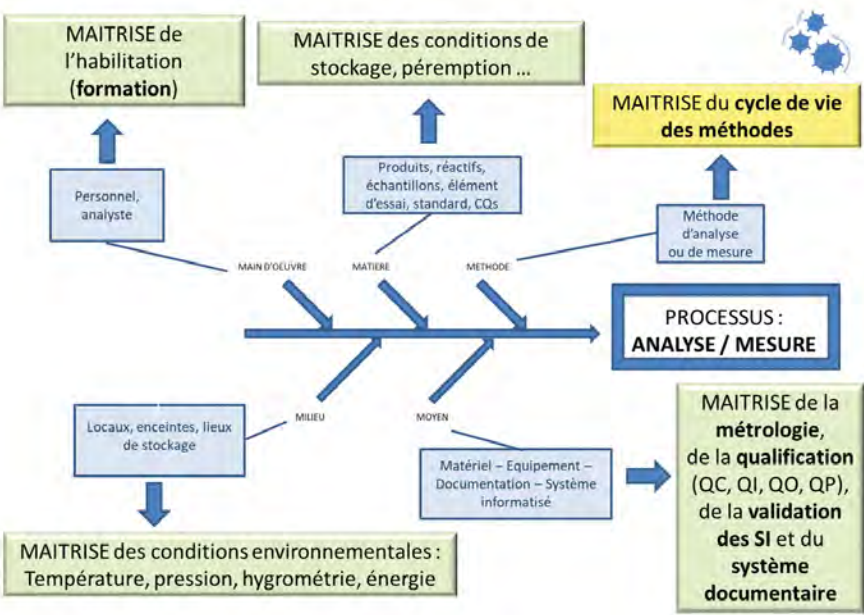


Figure 1 : Diagramme 5 M

Avec cet équipement, il faudra aussi mettre en œuvre une méthode d'analyse d ument validée. Et si cet équipement inclus un système informatisé, la validation informatique sera de rigueur. L'intégrité des données occupe largement les esprits et en particulier chez les garants de l'Assurance de la Qualité. Il est en effet important de s'assurer que les données générées par un système sont exactes, complètes, et qu'elles n'ont subi aucune altération tout au long de leur cycle de vie.^[2]

Bien au-delà de la qualification de l'équipement et de la validation des systèmes générant des données analytiques, il faut considérer la méthode analytique elle-même, qui est la source initiale de ces données. Cette méthode analytique a été développée pour caractériser un ou plusieurs Attributs Qualités Critiques du produit analysé, afin d'en garantir, au moins partiellement, la Qualité intrinsèque.

Durant le cycle de vie de la méthode, qui tourne en parallèle du cycle de vie du produit, la fiabilité de la mesure devra donc être connue et maîtrisée sur le long terme. Et cette fiabilité de la mesure est caractérisée, durant la validation d'une procédure analytique, à travers l'analyse séparée de l'erreur systématique (biais/ "bias"), et de l'erreur aléatoire (dispersion/ "precision"), qui peuvent être combinés par une évaluation de l'erreur totale.^[3, 4] Les résultats de cette étude de validation, éventuellement complétée par des cartes de contrôles des performances de la procédure analytique, sont donc, en plus des exigences pour la constitution des dossiers d'enregistrement, les principaux garants de l'exactitude ("ACCURACY") des données générées.

Un des 2 A de ALCOA (A comme "ACCURACY") est donc dépendant, en tout premier lieu, de la fiabilité des mesures générées, et doit mettre en avant l'importance de la validité des données, garantiss...

Entité	Moyen de maîtrise
Main d'œuvre (analyste, vérificateur, chefs de projet, Assurance Qualité, tout le personnel)	Formation et maîtrise de l'habilitation
Formation et maîtrise de l'habilitation	Maîtrise des conditions de stockage, de transport des dates de péremption, des potentielles risques de contaminations croisées
Milieu (locaux, enceintes et autres lieux de stockage)	Maîtrise des conditions environnementales (températures, pression, hygrométrie, énergie, etc.)
Moyens (matériel, équipement, systèmes informatisés (SI) et documentations associées)	Maîtrise de la métrologie, de la qualification du matériel (QC, QI, QO, QP), de la validation des SI, et de la gestion du système documentaire
Méthode d'analyse et de mesure	Maîtrise du cycle de vie de la méthode

Tableau 1: Moyens de maîtrise des différentes composantes de la génération d'une mesure

par une validation de méthode et par des garde-fous quotidiens (SST : System Suitability Test ou "tests de conformité" en Français) pour éviter toute dérive de l'équipement ou de l'analyste durant la mise en œuvre de la procédure analytique.

1. Qu'est-ce que l'intégrité des données ?

La MHRA (Medicines and Healthcare Products and Regulatory Agency), d fini  dans son guide paru en 2018 "GxP Data Integrity Guidance and Definitions"^[2] l'intégrité comme étant l'assurance que les données produites par un système sont exactes, complètes et qu'elles n'ont subi aucune altération tout au long de leur CYCLE DE VIE.

Pour assurer l'intégrité des données, il convient de vérifier que les données sont :

- **Exactes** (Accurate) - pas d'erreur ou correction sans modifications documentées.
- **Lisibles** (Legible) - facilement lues.
- **Contemporaines** (Contemporaneous) - documentées au moment de l'activité.
- **Originales** (Original) - tous les documents ou observations sont écrits et imprimés (ou copie certifiée du dit document).
- **Attribuables** (Attributable) - savoir qui génère la donnée ou effectue une action sur celle-ci et quand.
- **Complètes** (Complete) - toutes les données sont présentes et disponibles.
- **Cohérentes** (Consistent) - tous les éléments de l'enregistrement, telles que la chronologie sont suivis et datés ou horodatés dans l'ordre attendu.
- **Durables** (Enduring) - conservées sur média de stockage approuvés (papier ou électronique).
- **Disponibles** (Available) - pour revue, audit ou inspection durant la durée de vie de l'enregistrement.

Ces 5 premiers termes constituent l'acronyme : **ALCOA**
Les 4 derniers constituent le + dans l'acronyme : **ALCOA +**

2. Le processus analytique

L'analyse est un processus comme un autre. La maîtrise complète de ce processus aura autant d'importance, au final, que la maîtrise du processus de fabrication. Un certificat d'analyse conforme n'est en effet que la combinaison d'une fabrication conforme et d'une analyse représentative du produit contrôlé.

Chaque entité, chaque "M" de ce process (Main d'œuvre, Matières, Milieu, Moyens et Méthodes) doit être maîtrisé (Figure 1 et Tableau 1), c'est-à-dire être conforme aux exigences prescrites dès sa mise en place, mais également dans le temps.

3. Cycle de vie de la méthode

Bien trop souvent, la maîtrise d'une méthode se limite à connaître son état validé ou pas. L'édition récente dans Pharmacopeial Forum du draft de l'USP <1220>^[5] aura permis d'ouvrir les yeux sur l'importance de toutes les autres étapes de ce cycle de vie, déjà mise en avant dans le guide FDA sur les validations en 2015.^[6]

- Un développement analytique complet, permettant de connaître les forces et les faiblesses de la méthode utilisée, de diminuer autant que possible toutes les sources de variation potentielles (comme décrit dans l'article précédent sur "Quelques bonnes pratiques de validation" dans cette même revue) et d'en définir les conditions d'application à travers une étude de robustesse menée en amont de la validation
- Une validation de la méthode dans les conditions prédéfinies durant le développement, avec une analyse approfondie de la réelle fiabilité des mesures générées par la procédure analytique.
- Une surveillance de la procédure analytique, avec des SST (System Suitability Test) spécifiquement définis pour la méthode employée, permettant d'éviter ou d'identifier toute erreur de l'analyste ou toute dérive de la méthode ou de l'instrument permettant de générer ces données.

Au cœur de ce cycle de vie, la validation de la méthode reste toutefois une étape importante. Dans une version antérieure du chapitre <1220>, la notion de TMU = Target Measurement Uncertainty était représentée par un "temple" avec 2 piliers majeurs : «Bias» et "Precision", comme illustré sur Figure 2.

La "Target Measurement Uncertainty" (incertitude maximale ciblé) peut être fixé comme objectif en amont du développement de la méthode.

Les développeurs s'assureront donc que la somme des différentes sources d'erreur (erreur systématique ("Bias") et erreur aléatoire ("Precision")) n'impacteront pas trop la fiabilité de la mesure. Pour cela, certains facteurs seront fixés de façon stricte pour minimiser leur potentiel impact.

En validation, l'objectif principal sera de mesurer l'erreur résiduelle, celle qu'on ne peut pas éviter.

L'erreur systématique résiduelle sera estimée durant l'étude dénommée Accuracy dans ICH Q2(R1)^[7] (le terme adéquat étant justesse ("Trueness" en Anglais). L'étude de l'erreur aléatoire résiduelle sera estimée durant l'étude de la fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire). Et la combinaison de ces 2 sources d'erreur, sous forme de l'analyse de l'Erreur Totale ou erreur combinée,^[3, 4] permettra de réellement appréhender l'incertitude de chaque mesure individuelle, comme décrit dans la section suivante de cet article.

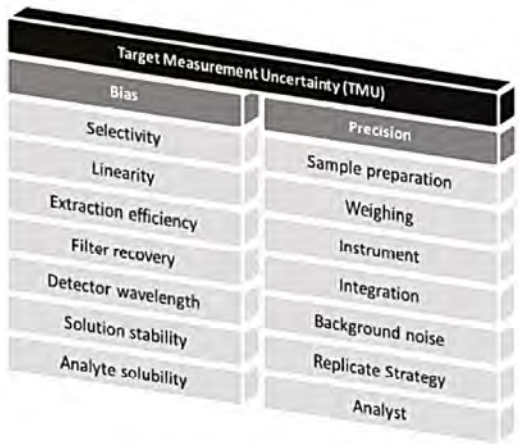


Figure 2 : sources of variability including in the Target Measurement Uncertainty (TMU)

Une étape ultime sera de définir ce que sera le résultat rapporté dans les certificats d'analyse ("reportable result"). Ce résultat rapporté peut être une mesure individuelle ou la moyenne de plusieurs mesures obtenue selon une stratégie justifiée et documentée, comme déjà décrit dans la Vague n°68 (article "Replicate strategy").^[8]

4. Les "pourquoi" de la validation

Pourquoi valide-t-on nos procédures analytiques ? Si beaucoup des questions posées ci-dessous paraissent simplistes ou répétitives, il reste important de garder les réponses en tête. Et surtout de ne pas s'arrêter après le premier "pourquoi"...

Pourquoi N°1. Exigences réglementaires

Utiliser des méthodes d'analyse validées est une exigence des autorités de santé. Quel que soit le texte de référence (BPF ^[1], USP ^[9], ICH Q2R1 et bientôt Q14 ou autre), tous sont unanimes : les méthodes d'analyses utilisées doivent être validées avant leur utilisation en routine, et telles qu'elles seront utilisées en routine. En d'autres termes, valider ses méthodes de contrôle et mesure sert donc à démontrer aux autorités, via des preuves tangibles et objectives, que les techniques développées répondent à la fois aux besoins et aux exigences pour lesquelles elles ont été développées et qu'elles donnent des résultats fiables et intègres.

Pourquoi N°2. Démontrer sa capacité à mesurer

Une méthode d'analyse, aussi performante soit-elle, est nécessairement entachée d'une erreur. Tous les statisticiens vous le diront : on ne peut jamais connaître avec certitude la valeur vraie caractéristique d'un produit ou d'un procédé mais uniquement s'en approcher. Tout est une question d'erreur et de probabilité, qui peut se résumer en un mot "incertitude" .

Valider une méthode, d'un point de vue statistique, revient à évaluer l'erreur totale inhérente à cette dernière et à la comparer à des critères d'acceptation que l'on peut considérer comme une erreur acceptable. Par erreur totale d'une méthode analytique on entend la somme de l'erreur systématique ou biais de la méthode et de l'erreur aléatoire ou fidélité de la méthode, qui sont explicités, séparément, dans l'article précédent de cette revue ("Quelques bonnes pratiques de validation des procédures analytiques"). Valider une méthode c'est aussi estimer la probabilité que, quel que soit le jour, l'heure, le technicien, l'équipement, le lot de réactif, ... utilisés pour conduire l'analyse, les résultats obtenus seront assez proches de la valeur réelle qui, elle, restera inconnue. En résumé, valider une méthode analytique revient à démontrer une **capacité à mesurer**, quantifier, qualifier, caractériser **de façon fiable et sécurisée**.

Pourquoi N°3. Garantir l'intégrité des données

En validant leurs méthodes d'analyse, les laboratoires évaluent leur

justesse et , leur fidélité. ; par cet exercice, ils vérifient également que les données générées sont exactes et cohérentes, attribuables à un échantillon donné, lisibles, ... Valider les méthodes d'analyse permet donc aux laboratoires de répondre en partie à une seconde exigence des autorités de santé : celle de garantir, au moins partiellement, l'intégrité de leurs données, en accord avec les définitions fournies en section 1 de cet article. **NB** : La validation est une étape essentielle mais ne suffit pas – l'intégrité des données demande d'autres éléments tels que la sécurisation de la donnée qui passe entre autres par la validation des systèmes d'information utilisés pour les générer, traiter, stocker, archiver...

Pourquoi N°4. Réduire les risques de nos prises de décisions

Aujourd'hui nous disposons d'une multitude d'informations : nous mesurons, collectons, enregistrons, stockons, analysons tout un tas de données. Mais dans quel but ? Toujours le même : réduire les risques liés à nos prises de décisions.

Dans le cadre des industries de santé, ces prises de décisions sont pour certaines critiques car susceptibles d'avoir un impact direct sur la santé d'un patient. Il est donc essentiel que les données sur lesquelles s'appuient ces décisions soient complètes, fiables et sûres ; en d'autres termes qu'elles soient **intègres**. En réalisant des validations de méthode et évaluant l'erreur totale de leurs méthodes d'analyse, les laboratoires viennent renforcer la confiance dans les données sur lesquelles ils s'appuieront pour prendre des décisions, telles que des libérations de lots.

Pourquoi N°5. Répondre aux objectifs des autorités de santé

Garantir l'efficacité, la pureté et la qualité des produits fabriqués, au travers d'une analyse fiable.

5. Le profil d'exactitude, une réponse adaptée à ces "pourquoi"

Le profil d'exactitude est un outil statistique et graphique utile pour l'évaluation de la performance d'une procédure analytique basé sur l'erreur totale (biais + dispersion) et les principes d'intervalle de tolérance.

Le rôle du profil d'exactitude est d'estimer, à partir des résultats obtenus, quelle garantie aura l'utilisateur que la méthode utilisée en routine fournira des résultats acceptables. Il permet de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation. L'utilisation du profil d'exactitude (Figure 3) passe par la fixation des deux critères de décision suivants :

- **Limites d'acceptabilité de la méthode.** Elles servent à traduire les objectifs pratiques des utilisateurs. Elles délimitent un intervalle autour de la valeur de référence. Le plus souvent, ces limites sont

réglementaires ou issues de la réglementation. Mais dans le cas où il n'existe pas de référence établie, il convient de prendre en compte les attentes des utilisateurs finaux (comme une limite de quantification donnée), et la nature des décisions à prendre à partir des résultats de mesure. • **Proportion BETA.** Elle représente la proportion de futurs résultats qui seront compris dans les intervalles de tolérance. La valeur choisie pour BETA dépend largement du champ d'application (contrôle sanitaire, contrôle de fabrication, etc.). Il est évident que plus le BETA est petit, par exemple 80 %, plus la méthode risque de produire des résultats qui ne correspondent pas aux spécifications annoncées.

Depuis sa mise en place, bien que cet outil soit :

- très utile et efficace pour l'évaluation de la vraie erreur des méthodes,
- appliqué,
- et reconnus dans différents secteurs d'activité (pour tous les types de méthodes de mesure et contexte (produit ou matrice biologique ...), quelques freins ou réticences ont été soulevés, auxquels on peut apporter des réponses.

- a. Quelques confusions résiduelles de terminologie dans certains secteurs d'activités entre notamment entre Justesse et exactitude, ou entre reproductibilité et fidélité intermédiaire *Alors que les définitions étaient claires depuis 30 ans.* ^[10]

- b. Dans certains laboratoires, l'erreur totale gêne dans la mesure où le profil d'exactitude montre une erreur plus grande qu'avant ... *Oui mais avant ce n'était pas tout à fait la vraie erreur de la méthode et la validation n'est pas uniquement une histoire de tests statistiques.* Pour rappel, avant le profil d'exactitude, les statistiques appliqués (ANOVA, STUDENT ...) entraînaient les remarques suivantes dans les laboratoires : "... La statistique nous pénalise..."; "...plus nous travaillons bien, plus nous sommes pénalisés statistiquement..."; "... nous avons du mal à conclure quant à la performance globale de la méthode avec tous ces tests statistiques imbriqués"

- c. Pour certains, les calculs d'intervalle de tolérance étaient complexes *Mais au final l'interprétation des résultats est plus simple*

- d. Résistance au changement par exemple pour les aspects dossiers réglementaires *Oui mais travailler en erreur totale n'empêche pas de proposer dans les rapports chacune des erreurs ?*

- e. Pour certains, les profils ne sont pas une obligation dans les dossiers *Oui mais c'est dans les tendances AQbD, futur ICH Q14, futur USP 1220 ou existante (USP 1210, normes V03-110, T90-210, normes pour les méthodes Q-PCR ...) et cela apporte des opportunités au-delà des requis actuels : c'est une réponse à un besoin de l'utilisateur qui doit comprendre, lors de la gestion d'OOS, la part potentiellement due à l'analytique et celle qui serait un problème de fabrication.*

Toutefois, il faut bien rappeler que la proposition de ce profil a été introduit en 2003 dans la mesure où il avait été constaté très régulièrement que valider une méthode en "erreurs dissociées" (Biais d'un côté et dispersion de l'autre (et non la somme des 2 erreurs)) entraînaient 2 questions récurrentes :

- Comment se fait-il que nous ayons autant de difficultés à transférer cette méthode alors qu'elle avait été déclarée VALIDE (... oui mais en "erreurs dissociées") ?
- Comment se fait-il que nous ayons autant de re-dosage /réanalyse en routine ?

La plupart des arguments "contre" sont souvent générés par la classique résistance aux changements. Les auteurs de cet article espèrent que le point 5 aidera un maximum de personnes à sauter le pas.

En effet, l'apport du profil d'exactitude permet :

- D'être plus proche de la réalité
- De faciliter les transferts analytiques
- De réduire les re-dosages
- D'être dans une démarche de gestion des "RISQUES"
- De faire moins d'analyses statistiques
- De disposer d'un outil simple d'interprétation
- De mieux maîtriser la procédure analytique et son erreur
- De contribuer à l'estimation des incertitudes de mesure
- De rassurer les évaluateurs, auditeurs, inspecteurs, clients, consommateurs

Et donc au final, de participer à l'amélioration de l'intégrité des données (A de ACCURACY dans les principes ALCOA)

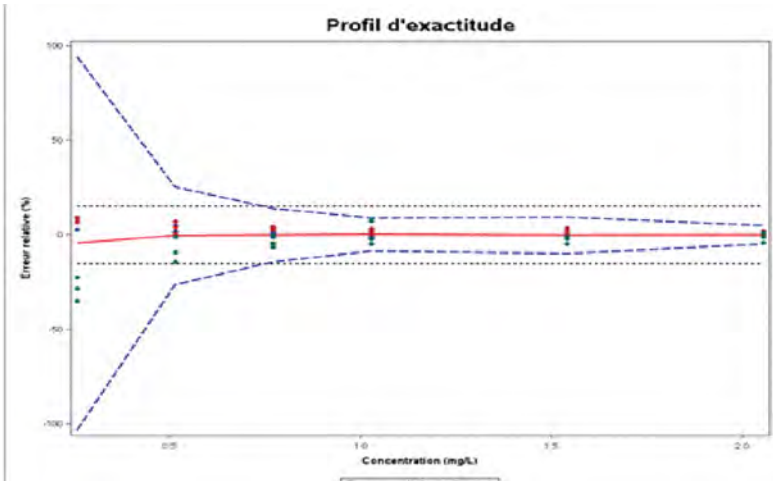


Figure 3 : EXEMPLE de profil d'exactitude avec un beta = 95%. En noir, les limites de la cible, en bleu, les limites de l'intervalle de tolérance, défini à partir des données de la validation de la procédure analytique. Ces limites correspondent à l'espace dans lequel 95% des mesures qui seront réalisées avec cette procédure analytiques seront observées. A la 1ere intersection des 2 : la limite de quantification ! en effet, si on analyse à une concentration plus faible, le risque de sortir de la cible est trop important. On n'a plus la fiabilité espérée

Sans détailler les différences entre le profil d'exactitude (avec intervalle de tolérance) expliqué ici et l'intervalle de prédiction décrit comme alternative dans le chapitre USP <1210>, il est bon de noter que les 2 démarches sont basées sur des approches similaires. L'arrivée récente dans l'USP du concept permettra de démocratiser ce type d'approche connu dans d'autres domaines scientifiques depuis plus de 30 ans.

Conclusion

Au-delà du requis réglementaire, chaque laboratoire doit se donner le maximum de garanties pour que les résultats générés soient fiables.
L'approche de "Erreur totale", qui est représentative de l'erreur inconnue à laquelle tout analyste est confronté à chaque analyse de lot, répond à la majorité des questions qui peuvent se poser lorsqu'on aborde le rôle de la validation des procédures analytiques de façon plus large.
Et cette "erreur totale", nommée Accuracy dans le vocabulaire des normes ISO, est bien la même qu'un des 2 A de ALCOA. Donc, avant d'assurer les L, les C, les O, l'autre A et le + de ALCOA+, il est bon de déjà garantir l'Accuracy des données générées !

Références

[1] : EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines.

[2] : MHRA (Medicines and Healthcare Products and Regulatory Agency), «GxP Data Integrity Guidance and Definitions, 2018.

[3] : P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg et M. Lallier, «Validation des procédures analytiques quantitatives

harmonisation des démarches,» S.T.P. Pharma Pratiques, vol. 13, p. 101, 2003.

[4] : US Pharmacopoeia: USP <1210>.

[5] : Pharmacopeial Forum (PF), 1220 Analytical Procedure Life Cycle — PF 46(5), 2020.

[6] : FDA Guidance: "Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics", 2015.

[7] : ICH Q2 (R1) "Validation of Analytical Procedures: Text and

Methodology", 2005.

[8] : G. de Fontenay, «"Replicate Strategy" : mais quel est ce concept ?», La Vague, vol. 68, p. 34, 2021.

[9] : US Pharmacopoeia: USP <1210>; <1225>; <1226>.

[10] : NF ISO 5725. Application de la statistique. Fidélité des méthodes d'essai. Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais interlaboratoires., 1987.

.....



L'avenir du contrôle microbiologique en ligne

BWT AQU@SENSE MB



La qualité de l'eau purifiée et de l'eau pour préparations injectables, parfaitement démontrable à chaque instant.

BWT présente l'AQU@Sense MB, un système fiable, éprouvé et précis de mesure en continu des TCC (total cell count) grâce à la cytométrie de flux.

bwt-pharma.com

Established Conditions for Analytical Procedures & QbD: current situation and future perspectives for enhanced change management paradigm.

By Jean-Francois DIERICK - GSK Vaccines & Isabelle MOINEAU - Aktehom Sante
jean-francois.m.dierick@gsk.com / isabelle.moineau@aktehom.com

Established conditions (EC) are defined for manufacturing and control as elements considered necessary to assure product quality (for EC related to manufacturing process parameters) and to assure method performance (for EC related to analytical procedure variables). ECs for analytical methods maintain reliable results that ensure the efficient product control strategy during the product life cycle.

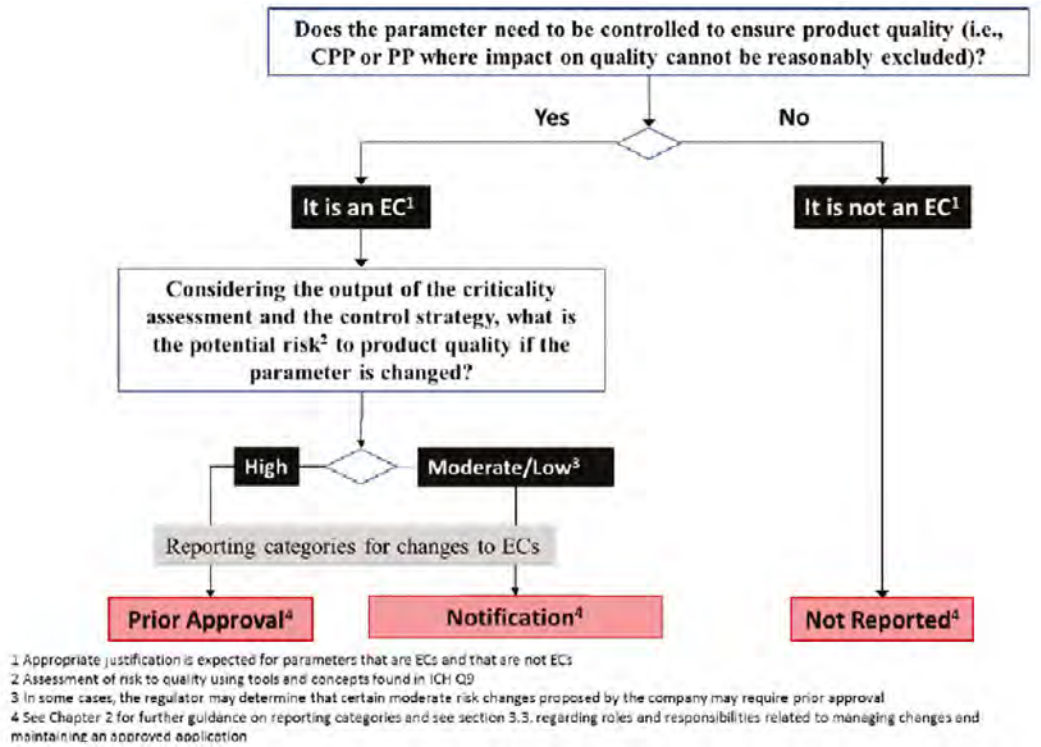


Figure 1 (extracted from ICH Q12): Decision tree for identification of ECs and associated reporting categories for manufacturing process parameters

Therefore, changing ECs of analytical methods require a certain level of regulatory activity as discussed later. This level of regulatory activity can be dramatically different depending on the type of changes, the ECs filed, as well as the strategy followed to build these ECs.

A harmonized scientific risk-based approach can be applied to define ECs for manufacturing processes and analytical procedures and their associated reporting categories. A decision tree which illustrates the specific approach to identifying ECs and reporting categories for manufacturing processes has been proposed by ICH Q12 (See Figure 1). In this paper, we will discuss how to translate this methodology to ECs for analytical methods. Then, we will share our view about what could be the evolution of EC and change management for analytical procedures in the future; when the use of ECs and analytical QbD principles will have reached a level of maturity allowing further improvements.

1. Application for analytical ECs

The principles described in this decision tree for the manufacturing process can be applied to identify ECs for analytical methods. The extent of ECs and their reporting categories could vary depending on the degree of the understanding of the relationship between method variables and method

performance, the method complexity, and analytical control strategy. A justification to support the identification of ECs and corresponding reporting categories for changes to ECs and those that are not ECs based on risk management should be provided.

The recommended approach to identify ECs for analytical procedures is to apply the enhanced approach of analytical quality by design (AQbD) for method development. Based on development studies, risk analysis and robustness studies, the relationship between the analytical procedure variables (for example analytical procedure parameters or operating conditions) and the performance of the analytical procedure can be demonstrated and completed by data generated during the life cycle of the analytical procedure.

Depending the relevance of the method in the product control strategy and on the risk represented by the method for product quality monitoring, an MODR can be established. Method operable design region (MODR) can be established for operating variables having numerical target (for example, incubation time and temperature, reagent concentration, centrifugation time or speed). Non-quantifiable variables may also be considered and evaluated in the risk assessment (for example references to or batches numbers of chromatographic columns, or of critical reagents). Results evaluation from risk analysis allows differentiation between critical and non-critical analytical procedure variables. This will allow the design of the method to be set, to define ECs and the associated analytical procedure control strategy. It is obviously very important to describe in ECs the critical variables affecting method performance as well as their associated MODR if appropriate (in case of numerical target). It is equally important for the non-critical variables to take the strategic decision between the two following options:

- Consider these variables as non-ECs or
- Consider these variables as part of ECs but being under control with a lower notification category.

These decisions are critical in order to obtain an alignment with authorities on the change level that will need to be considered when preparing a change affecting that method variable. ECs and non-ECs should be described in the dossier in the section related to the analytical procedure description and for non-ECs, justifications should be as solid as those provided for ECs.

During the life cycle management of the method, stage 1 (procedure design and development) and stage 2 (procedure performance qualification) are used to generate data, rationale, and knowledge of the method. Rationale and knowledge can be generic or specific in case they are related to the analytical technology or the matrix of the product. Data are always specific to a situation as they are linked to the analytical technology and the matrix of the product. The risk assessment and categorization applied at end of stage 2 allow identification of high and low risk elements. Control of changes of ECs and non-ECs will be managed during the stage 3 as part of the continued procedure performance verification (USP <1220>).

The proposed change management approach for a product as described in ICH Q12 can be applied to analytical methods. As for product, type of notifications to health authorities will depend to the categorization of the analytical method variables. These categorizations and the change strategy should be included in the dossier. For a non-EC, a change will not be reportable to the health authorities. Therefore, such change will need low effort and provide high benefits if recognized as low risk in the context of change. In case of an EC, if the change is related to a variable with a high risk on the method performance, submission will be needed and if the change is related to a variable with a medium or low risk, a notification will be acceptable. Additionally, for EC with a high-risk level, a refined strategy to reduce the level of change submission can be proposed. If during ECs registration, a post-approval change management protocol

(PACMP) for change management is also submitted, that allows to reduce the high risk related to the change to a moderate or low risk of this change. As an example, it could be a change of reference standard or a change of chromatographic column, both could be controlled by a qualification protocol including a study design and acceptance criteria. This change strategy is presented in *Figure 2*.

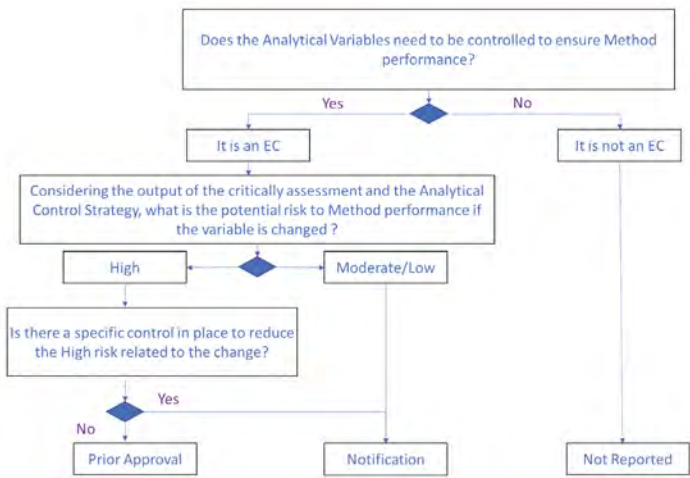


Figure 2: Decision tree for identification of ECs and associated reporting categories for analytical method variables

2. Changes affecting ECs

In this section we discuss the situation where EC are changed and the considerations around such changes. The principles of QbD lead us to consider the EC related to product attributes and the EC related to analytical procedures as intimately connected and thus the impact of a change in EC at the product level must be evaluated on the EC at the procedures level and reciprocally.

A change in EC related to a product attribute will obviously induce to challenge the fitness-for-purpose of the analytical methods measuring this attribute. The interconnection between QbD and AQbD workflows are illustrated in *Figure 3*.

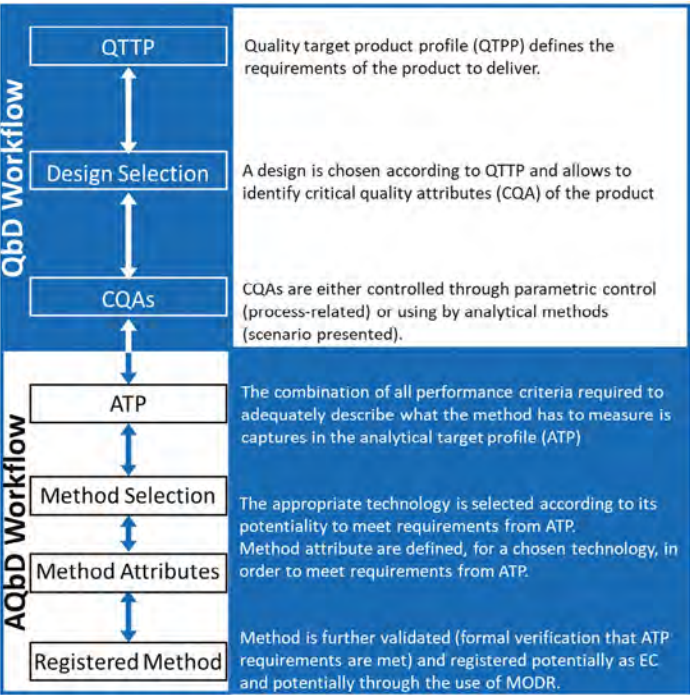


Figure 3: Interconnexions between QbD and AQbD workflows (derived from Jackson et al.).

For instance the change in purification technology may change the impurities present in the product and that will lead to the revision of the

ATP of existing procedures related to purity/impurity measurements or to the creation of a new ATP for an analytical procedure aiming to measure the new impurities. Moreover, this change in product matrix composition also leads to revise the ATP of all analytical procedures applied on this product production stage. After ATP revision, all analytical procedures will be assessed for capability to meet all ATP requirements in the newly described matrix conditions. This assessment will rely on 1) pre-existing generic information relative to the technology used for a given method, 2) pre-existing theoretical information relative to the specific procedure in use such as risk assessments, 3) existing experimental data on the specific procedure in use or 4) specifically generated experimental data on the specific procedure in use.

As illustrated above, this change in EC of the product might have multiples impact on analytical procedures. It will also generate at least a peak of assessment and justification activities if not massive experimental analytical work. It is therefore reasonable to consider this change as an opportunity to revise a significant part of the control strategy in place and evaluate for instance, if selecting a new technology that may be used develop multi-attribute procedures. Indeed, this may finally present a case of positive return on investment and, on the long term, represent a more versatile technology regarding future similar changes in EC.

What about the reciprocal situation? Could the change of EC in analytical procedure induce a change of EC at the product level and therefore require a formal assessment? Even if less obvious and less frequent the answer can be yes. Two illustrative examples are presented hereunder.

When, in the context of the improvement of an analytical method, a change of technology or a change of nature of reference standard (e.g.: change from in vivo to in vitro potency in Vaccines) induces a recalculation of product specification expressed in the new referential used, the EC on the product must be adapted to reflect that change even if as such the product quality is not modified.

The second example is also in the context of a change of analytical technology that leads to discover yet unknown product properties. For instance, when thanks to the better resolution provided by a new type of HPLC column or by the translation of a method from HPLC to UPLC, a new chromatographic peak is resolved. This new peak will be characterized and might be identified as a new impurity, that may require testing in routine, and therefore included in product specification. This situation would require adapting ECs even if product quality remains unchanged.

Finally, as stage 3 allows to cumulate data and knowledge about the product and about analytical procedures, investing in a change in EC (at the product or the analytical level) should always be considered as an opportunity to revise ECs globally. Indeed, the new knowledge gathered over time might allow justified simplification of control strategy.

3. Perspective of AQbD on analytical EC

In this section we share our thoughts about what the evolution of EC and change management for analytical procedures in the future could be; when the use of EC and AQbD principles will have reached a level of maturity allowing further improvements. These visions are purely speculative but worth to be shared in order to stimulate reflection and discussion. It may also be used to stimulate the industry to engage into the application of current enhanced approaches as these first steps are essentials for allowing further evolutions of the systems ensuring the quality of the pharmaceutical products, the efficacy of the pharmaceutical supply chains and the efficient dialog between industries and health authorities.

Digitalization. One significant element coming into the global picture is data digitalization. In this discussion we will focus on analytical data

but most of the elements can easily be translated to other types of data from the pharmaceutical industry. Increasingly industries are digitalizing their data allowing to massively cumulate, structure, organize and - as a more impactful consequence - analyze information that was present but hibernating into well-arranged paper binders waiting for the next inspection or investigation to reveal its tremendous contributing value to the understanding of the effectivity of a quality system and all activities related.

When all these data will be digitally available, it will be possible to perform massive retrospective data analysis exercises which - if properly designed - could transform these data into knowledge to be used for improving analytical procedure performances and also the control of these analytical procedures through the identification of yet unknown or underestimated analytical control attributes. Moreover, when these data will be instantly available digitally, the current practices used for analytical control strategy (e.g. control charting, system suitability) could/should be adapted according to the new possibilities provided by instant access to a comprehensive set of analytical control attributes. The direction of these adaptation could/should be the early or the instant detection of changes in procedure performance or even the prediction of changes in procedure performances based on multivariate analysis of a complete set of analytical control attributes. Allowing to move from a paradigm where method performances are measured at the moment of procedure validation (and then deemed as being maintained through surrogates) to a new paradigm where methods performances are evaluated in a continuous manner through digital exploitation of routine data and specific analysis of analytical control attributes.

Analytical Quality by Design is the other transformative element that is being put in place. As presented in USP <1220> and in several stimuli articles from USP, the principles of AQbD allow to develop better analytical procedures through systematic use of quality risk management together with oriented knowledge production that allows to control/lower the risks identified. Another important outcome expected from the AQbD approach is the knowledge generated and the identification/objectivation of the risks per se. These are critical elements that are generated during stage 1 (analytical procedure development) and stage 2 (analytical procedure qualification/validation) and that will be used and maintained/enriched during the entire remaining life of the procedure: stage 3.

AQbD principles insist on the knowledge-driven development and implementation of an Analytical Control Strategy to ensure the procedure performs as expected and also on the effectiveness of ACS - together with risk assessment and knowledge available - and its role in determining the level of activities required to confirm that a changed analytical procedure is producing fit-for-purpose data.

Considering these AQbD principles and the potentialities offered by digitalization described above, one can imagine that ACS in use may be part of EC and that submission will be of a different level if normal or enhanced ACS is applied. Indeed, currently the risk related to a change is mitigated / objectivated through a qualification or validation study that is performed "offline" from routine activities and that is, in fact, a prediction of the impact of the implementation of the change. The decision to implement is taken based on data predicting that implementing the change will not affect significantly the performances of procedure. In case of failure in the prediction study, it is only after implementation that this failure will be detected. If enhanced ACS are implemented on one hand, and if knowledge is increased to a level allowing better risk assessment on the other hand, more changes should be eligible as requiring less preliminary qualification or validation activities and lower submission levels.

The evolution of safety elements in the automotive is a good illustrative example of this purpose. In a recent past, safety of a car was

relying mainly on the management of impact of accidents: a crash test measured the level of protection of the passengers in case of crash. And the driver had to be skilled and fortunate enough to reduce risk of occurrence. Today, improvements are still made on the management of the impact but a lot is happening to reduce the occurrence of the risk through systems helping the driver, compensating for his potential inattentions, mistakes or sleepiness and even ultimately compensating for his lack of skills by driving safely the car without his intervention. Is the pharmaceutical world ready to move from the crash test era betting on robust validated procedures to an era where validated robust procedures will be controlled using systems measuring continuously procedure performances allowing therefore seamless changes throughout lifecycle? Today, we are certainly not yet ready, but we need to take the first step now and adopt the current proposals for enhanced approaches and start the work and the dialog leading to the next era.

Sources

Concept paper ICH Q14: Analytical procedure development: Text & methodology	Analytical Control Strategy
Proposed new USP General Chapter <1220>: The Analytical Procedure Lifecycle	ICH Q12: Technical and regulatory
Pharmacopeial Forum 42(5): Stimuli to the Revision Process: Analytical Target Profile: Structure and Application Throughout the Analytical Lifecycle	Pharmacopeial considerations for pharmaceutical product lifecycle management
Forum 42(5) Stimuli to the Revision Process:	Concept paper ICH Q2(R2): Validation of analytical procedures: Text & methodology
	Patrick Jackson et al. 2019, Analytical Chemistry 91 pp 2577-2585

Conclusion

The principles of ECs and change management applied to analytical methods will allow regulators and companies to know exactly what will be provided or not and what is expected for a given pre-defined change. The implementation of EC for a product / method represents a real benefit for the patients, the health authorities and the pharmaceutical manufacturers and should be considered as a cornerstone for analytical life cycle management.

Disclosure

This work was sponsored by GlaxoSmithKline Biologicals SA. Jean-Francois Dierick is an employee of the GSK group of companies.



Acronyms

EC: Established Conditions	CPP: Critical Process Parameter
ATP: Analytical Target Profile	PP: Process Parameter
QbD: Quality by Design	MODR: Method Operable Design Region
AQbD: Analytical Quality by Design	ACS: Analytical Control Strategy

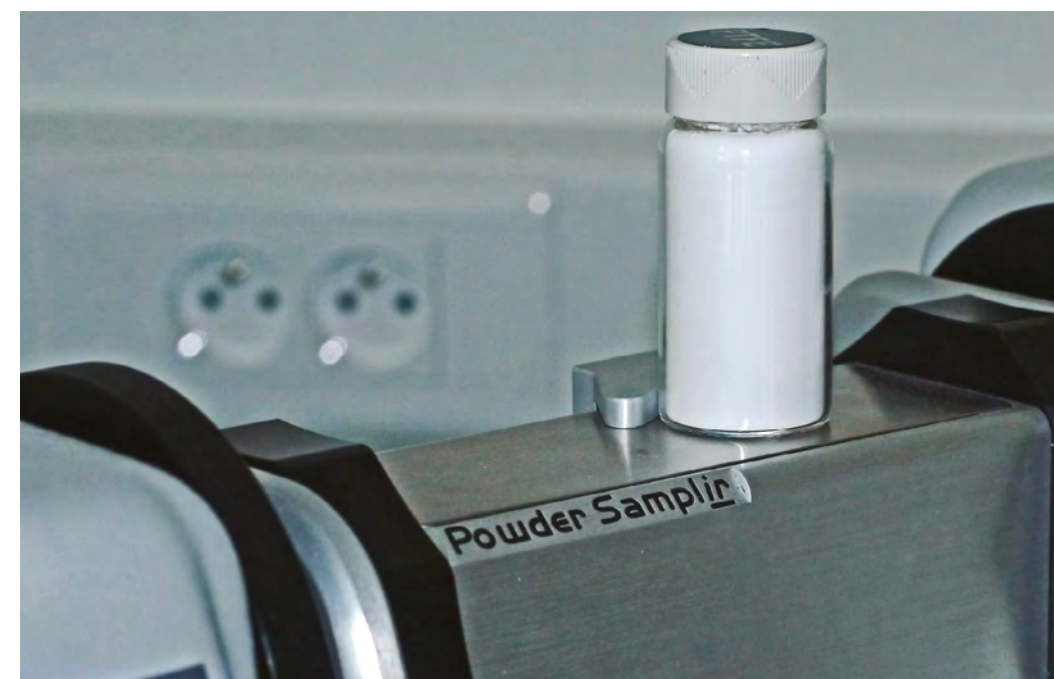
Quand les vibrations des molécules permettent de les doser : la spectroscopie proche infrarouge en action.

Par Yves Michel GINOT & Yoann GUT - Servier

yves-michel.ginot@servier.com & yoann.gut@servier.com

C'est à la base une évidence sensorielle partagée par chacun que de connaître le monde qui nous entoure en l'observant visuellement... à condition qu'il soit éclairé !

Et si l'on nous dit qu'il est possible de "voir" les molécules en les éclairant, l'évidence s'évanouit car chacun sait qu'il est impossible de voir de si petits objets de cette façon. Et pourtant...



C'est bien ce que cet article propose d'illustrer, en tirant profit du fait que le monde qui nous entoure, et déjà les atomes constitutifs des molécules, est un monde en perpétuel mouvement. Les atomes s'associent les uns aux autres au travers de liaisons chimiques animées de mouvements vibratoires de très faible amplitude mais de très haute fréquence (10^{14} Hz). Et comme la lumière possède aussi cette nature vibratoire, lumière et molécules sont en capacité d'interagir, de résonner. C'est ce qu'ont bien compris les physiciens qui ont développé les spectroscopies vibrationnelles (mIR, pIR, Raman) qui mesurent, collectent et interprètent ces signaux porteurs d'informations. Cet article va se concentrer sur l'une d'entre elles, la spectroscopie proche infrarouge (pIR), moins familière que la spectroscopie moyen Infrarouge (communément appelée Infrarouge) car elle nécessite plus d'efforts pour interpréter l'origine des signaux. En spectroscopie mIR, les signaux mesurés proviennent de modes fondamentaux de vibrations, ils sont majoritairement intenses et fins, et il suffit le plus souvent de se reporter à une base de données pour identifier les liaisons responsables des spectres obtenus.

En spectroscopie pIR les signaux observés sont peu spécifiques. La raison en est que ces signaux proviennent de liaisons chimiques communes à la totalité des molécules organiques : les liaisons CH, OH, NH, SH. Ce que capte le spectrophotomètre pIR est une suite de mélanges provenant de la diversité moléculaire de l'échantillon observé (les liaisons CH de toutes les molécules par ex), à laquelle se superposent des mélanges des modes de vibrations eux-mêmes (élongation, torsion, rotation, cisaillement, etc.) et de leurs harmoniques. Si un spectre pIR est un objet complexe à manipuler, sa complexité recèle en contrepartie une vraie richesse, celle de délivrer deux types de messages : une première information sur la nature chimique de l'échantillon et une seconde

....>

interscience

ScanStation

Station d'incubation et de comptage de colonies en temps réel

Obtenez des résultats anticipés

DATA INTEGRITY | 21 CFR PART 11 | AUDIT TRAIL



Suivi en temps réel des analyses et résultats anticipés dès 45 heures au lieu de 5 jours pour *Aspergillus brasiliensis* sur gélose Sabouraud

sur son état physique. Encore faut-il pouvoir extraire ces informations ! C’est là que l’usage du pIR se démarque de celui du mIR, utilisé dans tous les laboratoires d’analyse. En spectroscopie pIR, il faut nécessairement traiter au préalable les signaux pour en extraire l’information adéquate contenue dans ces mélanges. La chimiométrie, discipline composite de mathématiques, statistiques, informatique en mesure de développer des algorithmes de traitement des signaux complexes pour en extraire l’information utile, est l’incontournable compagnon d’usage de la spectroscopie pIR. Cette contrainte culturelle est certainement une première "bonne" raison de son moindre attrait auprès des analystes. S’intéresser au décodage des vibrations des liaisons chimiques par la spectroscopie pIR ouvre sur un univers étonnant car il permet non seulement d’identifier la nature chimique des produits dans un échantillon, par exemple le principe actif et les excipients dans un comprimé, mais renseigne aussi sur un état physique, par exemple l’état amorphe ou telle forme cristalline de ce principe actif dans ce comprimé (parfois primordial pour la propriété intellectuelle) voire de sa provenance (sur quel site a été fabriqué ce comprimé). Voilà pourquoi cet outil analytique, plus exigeant culturellement dans son usage, est fort apprécié de ceux qui veulent en savoir plus. Et comme la lumière va vite, qu’elle ne fait qu’effleurer les échantillons sans les modifier, elle est également fort appréciée pour cette rapidité à livrer de l’information sur des échantillons tels quels.

Pour atteindre ces performances analytiques, il reste une étape à franchir, relier la position spectrale et la part de l’intensité des signaux mesurés à la propriété recherchée. Si l’on veut doser un composé au sein de son environnement, il convient de s’assurer au préalable de son identité. Attribuer des signaux à une espèce donnée est une opération de classification réalisable à partir d’algorithmes spécialisés.

Si l’on peut accéder ainsi, à partir d’un spectre mesuré sur un échantillon tel quel, sans avoir eu besoin de lui faire subir une quelconque préparation (une dissolution par ex) préalable à la mesure, il est alors tout à fait envisageable de pousser l’analyse plus loin, pour savoir combien de milligrammes de principe actif (par exemple) sont contenus dans ce comprimé. Et ce, à la vitesse (ou presque) de la lumière. C’est cet aspect quantitatif qui va être survolé dans la suite de cet article. Si les applications présentées sont issues de l’expérience acquise dans l’industrie pharmaceutique, elles sont bien sûr tout à fait applicables aux industries chimique, cosmétique, et agro-alimentaire. Si les applications présentées mettent à l’évidence l’accent sur la matière solide (des poudres, des comprimés) c’est que l’on tire profit d’une propriété spécifique du rayonnement pIR. Très peu absorbé par la matière, il peut y pénétrer suffisamment pour en explorer une épaisseur conséquente, celle d’un comprimé par exemple, ce qui rend accessible plusieurs types d’applications qualitatives (identification, imagerie) et quantitatives bien différentes des techniques conventionnelles.

1. Doser l’eau dans un flacon de poudre

Toutes les poudres étant issues d’un procédé de séchage, doser l’eau résiduelle est une opération courante dans les laboratoires d’analyse pour connaître l’état de la poudre, qu’elle soit fraîchement produite ou à l’issue d’études de stabilité destinées à préciser l’hygroscopicité de ce type de poudre. Deux techniques sont couramment déployées dans ce but, la réaction de Karl Fisher et la coulométrie. Toutes deux nécessitent une mise en œuvre au-delà de la dizaine de minutes. Alors

que poser le flacon sur un spectrophotomètre et obtenir l’information en quelques secondes, sans avoir à réaliser un prélèvement ni peser quoi que ce soit, relève de l’efficacité en plus du confort.`

Reste à étalonner le système, en sélectionnant les bandes de l’eau dans le spectre pIR et en associant de façon convenable les signaux sélectionnés avec une gamme d’échantillons contenant des quantités croissantes d’eau, quantités précisément mesurées par une technique de référence. L’étalonnage est une démarche classique, et totalement incontournable, en chimie analytique.

En guise de résultat, l’analyste ou un technicien non spécialiste, n’aura qu’à poser un flacon de poudre sur l’analyseur pIR, attendre dix secondes et voir apparaître à l’écran ou sur un ticket la teneur en eau de son échantillon.

Si l’on excepte le temps consacré au développement de la méthode, la performance de mesurage n’a quasiment pas de concurrent dans les techniques conventionnelles. Certains laboratoires ont remplacé plusieurs appareils de Karl Fisher par un spectrophotomètre pIR.

2. Doser le principe actif dans un comprimé

Encore une opération classique et fréquente en développement et production pharmaceutique.

La démarche de développement de l’outil analytique^(1,2,3), ici la spectroscopie pIR, suit le même cheminement : il convient tout d’abord de sélectionner les bandes ou la/les parties du spectre pIR susceptibles de contenir l’information se rapportant au principe actif contenu dans les comprimés. Puis de préparer des séries de comprimés témoins contenant des quantités croissantes du principe actif à doser, d’acquérir les spectres de tous ces échantillons avant de déterminer individuellement leur contenu par une méthode de référence (souvent la chromatographie liquide haute performance, HPLC, pour les formes solides) et de construire le modèle convenable associant les signaux pIR aux teneurs croissantes en principe actif. L’ensemble de la démarche est plus chronophage que pour les méthodes conventionnelles car elle demande une attention particulière portée à l’échantillonnage.

La grande majorité des techniques de dosage utilisées dans les laboratoires (HPLC, spectroscopie UV Visible) opère sur des échantillons en solution, ce qui exclut toute information sur l’état solide d’origine. En spectroscopie pIR, et sur des échantillons solides, comme les signaux portent deux types d’informations, nature chimique et état solide, l’analyste chargé de modéliser une corrélation se doit de penser aux interférences possibles entre ces sources s’il veut obtenir un modèle robuste.. Les signaux complexes collectés, pouvant varier au gré de contributions diverses, sont prétraités mathématiquement pour faire un tri, une sélection, mais à condition d’avoir rencontré des échantillons contenant ces variabilités plausibles. Il faudra donc intégrer, aux étapes de validation, des échantillons à la valeur nominale fabriqués par exemple à différentes périodes de l’année pour intégrer des petites variations de paramétrage des lignes de fabrication, des petites variations des lots de matières premières, voire sur des matériels ou des opérateurs différents, toutes choses susceptibles d’interférer dans un sens ou un autre et affecter la robustesse de la prédiction quantitative.

....→

Dans le métier de la modélisation, l’usage est de parler de modèle et de prédiction.

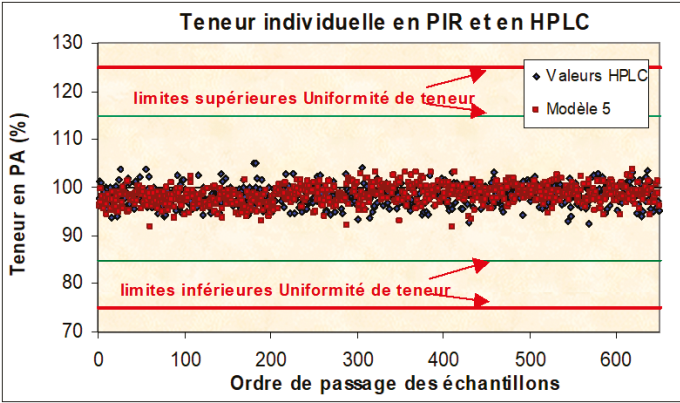
Ce que l’on ne fait pas pour les techniques de dosage conventionnelles en solution, qui requièrent quasiment toutes un étalonnage (donc un modèle), mais comme l’algorithme de traitement est la linéarité, algorithme univarié le plus simple, sensible essentiellement à la précision des pesées et des volumes, il n’est pas pensé comme tel.

Ces considérations amènent ainsi à se poser la question du nombre d’échantillons nécessaires pour élaborer un modèle. L’expérience⁽²⁾ montre que le nombre n’est pas très élevé. Pour construire un modèle dédié au test d’uniformité de teneur des comprimés en sortie de production, un classique du genre, il aura fallu seulement 85 comprimés pour réaliser un étalonnage sur une gamme comportant sept niveaux de concentration entre 70% et 130% de la valeur nominale, à raison de cinq comprimés par niveau de gamme. Pour densifier le modèle autour de la valeur nominale, des échantillons de dix lots, issus de deux années de production, à raison de cinq comprimés par lot, ont été injectés dans le modèle. Soit cinquante comprimés.

La difficulté ne réside pas tant dans le nombre d’échantillons que dans leur qualité. La sensibilité de cette spectroscopie à l’état physique des échantillons est tout à la fois une opportunité et une difficulté quand il faut obtenir des témoins différents de la valeur nominale, ce qui est le cas pour l’étape d’étalonnage. Il convient qu’ils soient préparés sur du matériel aussi proche que possible de celui utilisé en production. Et cela mobilise du temps et des moyens adéquats. Tout comme le recours à une méthode de référence pour assurer la qualité des témoins, dans ce cas l’HPLC. La modélisation nécessite de tester différents "réglages" des algorithmes, donc différents modèles avant de sélectionner le meilleur, sur des critères de performances statistiques.

Au final, la performance analytique est attrayante. Pour doser dix comprimés en routine, il faut environ 300 minutes (5h) par HPLC avec destruction des comprimés dosés, consommation de solvants et réactifs, mais seulement 15 minutes par pIR, sans solvants ni réactifs, et des comprimés intacts, disponibles au besoin pour un autre test. Pour l’opérateur, la technicité est ultra simple : disposer des comprimés sur un passeur d’échantillons, lancer la séquence d’acquisition, récupérer le rapport sur l’imprimante. Tout l’effort repose sur le développeur. L’utilisateur en routine dispose ainsi d’une méthode analytique simple à mettre en œuvre tout en étant plus respectueuse de l’environnement, qui s’insère naturellement dans un contexte de responsabilité sociétale d’entreprise (RSE).

A titre d’illustration, voici ce que donne la comparaison d’un dosage par spectroscopie pIR puis par la méthode de référence, en l’occurrence l’HPLC, sur 1.000 comprimés dragéifiés prélevés sur 3 années de production d’une spécialité pharmaceutique.



Chaque comprimé a été dosé individuellement de deux façons : d’abord par spectroscopie (non destructive) puis par la méthode (destructive) de référence. Cet exemple illustre aussi le fait que l’enrobage de comprimés n’interdit pas de sonder l’intérieur, sous la couche d’enrobage.

Le prix de cette performance définit en pratique son périmètre d’application. Pour une vision plus juste, il convient de préciser que la mise au point d’une telle méthode nécessite au minimum du temps, de l’ordre de quelques semaines, la culture et l’expertise spécifique du pIR (spectroscopie et chimiométrie) et une grande attention aux facteurs d’influence⁽³⁾. L’analyste en charge de ce type d’outil est en mesure de détecter un biais, une dérive mais sans pouvoir en identifier aisément le motif. Il faut alors mener l’enquête pour impliquer tel ou tel changement, souvent opéré à son insu par le fabricant.

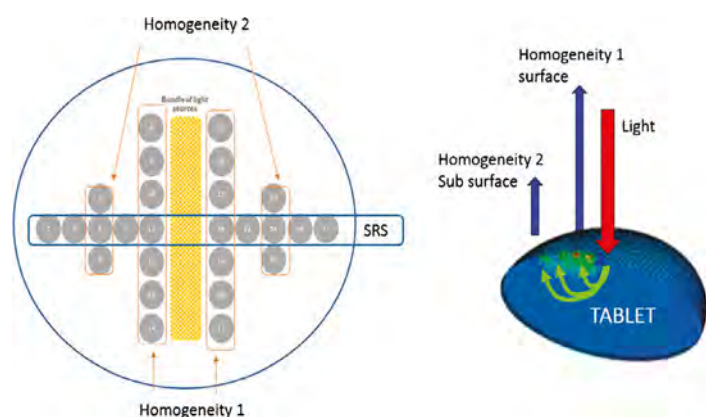
Dans une pratique industrielle, il faut aussi régulièrement s’assurer que le modèle n’est pas dépassé par des changements d’environnement ou de pratiques. Il y a donc un suivi des modèles à mettre en place avec parfois une maintenance corrective nécessaire. Ces éléments font que cette approche quantitative convient parfaitement aux grandes séries, fréquentes, bien stabilisées dans leur procédé de fabrication. C’est le cas de certaines productions. A contrario, ce n’est pas la méthode de choix dans un environnement de développement de formulations où les ingrédients changent continuellement en qualité et/ou quantité d’une série à l’autre. Reste que la lumière va vite, est éco responsable, et que les informations qu’elle nous rapporte valent l’effort consenti dans certains cas.

3. Dosage en temps réel en sortie de ligne de fabrication

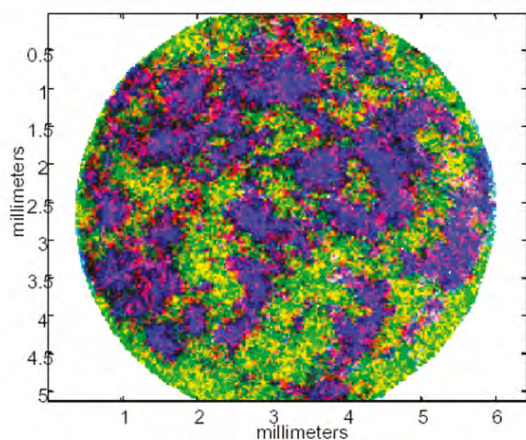
Cette application présente l’intérêt de fabriquer et doser dans le même mouvement, sans avoir à attendre le retour d’analyses d’un laboratoire de contrôle. Elle constitue une évolution prévisible, et déjà accessible, de l’analytique de laboratoire qui devient analytique de procédé, plus connue sous son sigle PAT (process analytical technology), fortement promue par la FDA dès 2004⁽⁵⁾ pour maîtriser la qualité d’une production pendant qu’elle s’opère plutôt que de constater le résultat final sans pouvoir corriger la trajectoire du procédé. Le défi est de concevoir des capteurs en mesure d’acquérir très rapidement des spectres sur des échantillons en mouvement sur un convoyeur (tapis roulant)⁽⁶⁾.

....→

Cela est possible en recourant, dans l'exemple présenté (with permission of the authors), à plusieurs fibres optiques intégrées dans une sonde, chacune collectant les signaux d'une partie de la surface de l'échantillon. Par réflexion diffuse au sein de l'échantillon, chaque fibre retourne une information de la zone qu'elle observe, l'ensemble formant une image basse résolution.



Le dispositif mentionné est en mesure de "capturer" 26 images distinctes d'un échantillon en mouvement et d'autoriser une prise de décision en moins de 100 msec. Cette rapidité de capture et de traitement permet d'éliminer en temps réel les comprimés hors spécification et de ne conditionner que des produits testés conformes. En sortie de machine à comprimer, les comprimés sont alignés sur un tapis roulant, le convoyeur. Une caméra optique détecte si chaque comprimé se présente sur une même face ; si ce n'est pas le cas, un dispositif d'éjection le renvoie en amont jusqu'à ce qu'il revienne sous la bonne présentation. Il passe ensuite sous la sonde pIR qui, elle, va certifier ou non sa conformité avant conditionnement. La sonde multifibre peut renvoyer deux informations : une, qualitative, sur l'homogénéité de répartition des composants au sein de chaque comprimé, l'autre quantitative, la teneur en substance active de chaque comprimé. Seuls les comprimés conformes aux spécifications continuent leur route pour être conditionnés.



Ces quelques exemples illustrent ce que peut déjà apporter la spectroscopie vibrationnelle pIR, qui permet de visualiser et différencier les constituants chimiques d'un échantillon, que ce soit au laboratoire par la spectroscopie, ou de façon plus spectaculaire au travers de l'imagerie hyperspectrale⁽⁴⁾ (tel ce comprimé où apparaissent en fausses couleurs le principe actif en rouge, le lactose en bleu et la maltodextrine en vert), et enfin en ligne par une imagerie basse résolution en temps réel. L'application de ces outils à bon escient est un gage de valeurs ajoutées.

Ce qu'il faut aussi retenir est que ces outils performants font entrer la chimie analytique dans une autre pratique que celle des analystes recourant à la panoplie commune des laboratoires de contrôle. Non seulement il leur faut apprendre à maîtriser la chimiométrie pour en tirer le meilleur profit, mais en plus ces outils vont les faire sortir des laboratoires de contrôle pour rejoindre les ateliers de fabrication et devenir des experts incontournables du contrôle continu et des procédés de fabrication continue⁽⁷⁾. En sachant que tant la FDA que l'EMA, pour ne citer que ces deux grandes Agences, sont en capacité experte de recevoir et accepter des dossiers d'AMM et des variations⁽⁸⁾.

Bibliographie

(1) Le dosage par spectroscopie proche infrarouge. Application au test de l'uniformité de teneur des comprimés. I. Méthodologie

Commission SFSTP, Y.-M. Ginot

P. Bernard-Moulin, R. Cinier, F. Despagne, J.P. Dubost, L. Francès, M. Le Bihan, M. Le Page, A. Michelet, L. Meunier, G. Monteillet, A. Quintana, A. Rieutord, I. Storme, F. Thevenot, E. Ziemons

STP PHARMA PRATIQUES - volume 20 - N° 2 - mars-avril 2010

(2) Tablet potency of Tianeptine in coated tablets by near infrared spectroscopy: model optimization, calibration transfer and confidence intervals

Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 54 (2011) 510 – 516

Mathieu Boiret, Loïc Meunier, Yves-Michel Ginot

(3) Le dosage par spectroscopie proche infrarouge. Application au test de l'uniformité de teneur des comprimés. II.

Commission SFSTP, Y.-M. Ginot

P. Bernard-Moulin, M. Boiret, R. Cinier, F. Despagne, J.P. Dubost, L. Francès, M. Le Page, A. Michelet, L. Meunier (†), E. Ziemons

STP Pharma Pratiques - volume 24 - N° 1 - janvier-février 2014

(4) Chemical imaging: an essential contribution to assess pharmaceutical quality, STP Pharma Pratiques, mai/juin 2019 – n°03 p24-37

STP Pharma Pratiques, juillet/août 2019 – n°04, p. p38-55

Commission SFSTP, Y.-M. Ginot,

F. Bonnier, F. Chauchard, Y. Gut, A. Michelet, A. Tfayli, E. Ziemons

(5) Guidance for Industry : PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, FDA, 2004

(6) Use of near infrared spectroscopy and multipoints measurements for quality control of pharmaceutical drug products Anal Bioanal Chem, 2016, 409, 683-691, 2017

Mathieu Boiret, Fabien Chauchard,

(7) Quality Considerations for Continuous Manufacturing - Guidance for Industry, FDA, 2019

(8) Continuous manufacturing: could 2021 be year of the first biologic approval ? Pharmaceutical Technology, dec 2020

TRACKSENSE® LYOPRO



Qu'est-ce-que-c'est ?

Solution multiformats pour lyophilisateurs à chargement automatique. Cartographie - Validation - Contrôle des lots

COMMENT ÇA MARCHE ?



CARACTÉRISTIQUES & AVANTAGES

Plus de **100 capteurs** par étude

Accès aux données en temps réel

Logiciel leader sur le marché

Aucune perte de données

Aucune immobilisation pour l'étalonnage

Le plus compact du marché

Intégrité, conformité FDA & centralisation des bases de données.

Piles remplaçables. Ex. autonomie 2 400h à -60°C avec échantillonnage 30 sec. Visualiser l'autonomie des piles dans le logiciel.

100 000 points de mémoire / capteur

Intégrité des échantillons

Seulement **32mm** de hauteur

Étalonnages sur site par l'utilisateur grâce au logiciel ValSuite.



Thermocouples interchangeables et positionnables au millimètre près. Aucun impact thermique.

2R au 100R et personnalisé



Apport des études de stabilités accélérées prédictives (APS) au développement pharmaceutique.

Par Marc FRANÇOIS - Servier
marc.francois@servier.com

La ligne directrice ICH Q1A(R2)⁽¹⁾, dont la première version date de 1993, est certainement le texte qui génère le plus d’analyses au sein des entreprises pharmaceutiques. Bien qu’il ait permis une harmonisation des pratiques, ce texte reste axé sur les études de stabilité destinées aux enregistrements et correspond à une approche descriptive du comportement des principes actifs et des formes pharmaceutiques.



La ligne directrice complémentaire ICH Q1E⁽²⁾ recommande 12 mois de recul en stabilité pour réaliser une analyse statistique afin d’extrapoler, dans le conditionnement étudié et pour une condition de température et d’humidité donnée, la date de retest ou la péremption de 12 mois au maximum. Les approches prédictives, qui émergent depuis quelques années, se révèlent très utiles lors des phases de développement car elles permettent de mieux appréhender le comportement des produits tout en étant plus rapides et plus économes en ressources.

1. Loi d’Arrhenius – application aux formulations liquides

La loi d’Arrhenius, qui traduit l’effet de la température sur la vitesse d’une réaction chimique⁽³⁾, est applicable aux réactions chimiques en milieu homogène donc aux gaz et liquides. La loi d’Arrhenius peut s’écrire de deux façons (équations 1 et 2). Il est reconnu qu’elle peut être utilisée pour les formulations pharmaceutiques liquides et qu’elle permet de modéliser la vitesse d’une réaction chimique de dégradation en fonction de la température. A partir d’un plan d’expérimentation basé sur un vieillissement accéléré d’un produit à des températures élevées, il est possible d’en déduire la cinétique de la réaction à une température plus faible et par conséquent sa péremption⁽⁴⁾.

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

ou

$$\ln \ln k = \ln \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

- Avec :
- k : coefficient de vitesse de la réaction
 - A : facteur préexponentiel (très peu dépendant de la température)
 - Ea : énergie d’activation de la réaction (en J.mol-1)
 - R : constante des gaz parfaits (8,314 J.mol-1.K-1)
 - T : température en Kelvin

Il faut cependant veiller à ne pas induire de facteur de dégradation supplémentaire. Ainsi il convient de s’assurer qu’il n’y a pas de variation de pH engendrée par le produit de dégradation formé et il est conseillé de protéger les échantillons de la lumière. Enfin, comme la réaction d’Arrhenius est relative à une réaction de dégradation donnée, si plusieurs produits de dégradation sont formés, le comportement de chacun d’entre eux doit être modélisé.

2. De la modélisation des formulations liquides à celle des formulations solides

Les formes pharmaceutiques solides sont essentiellement inhomogènes et l’état solide diminue drastiquement la mobilité moléculaire des entités réactives. De ce fait, il a longtemps été admis qu’elles ne pouvaient pas suivre la loi d’Arrhenius. De plus, les modes de dégradation peuvent y être complexes du fait de possibles changements d’état de la structure solide du principe actif ou d’interactions entre le principe actif et les impuretés réactives des excipients. Les principaux facteurs de dégradation sont la température, l’humidité, l’oxydation, la lumière et le pH⁽⁵⁾.

Une forme pharmaceutique solide subit la température extérieure au conditionnement et est plus ou moins protégée de l’humidité relative selon la nature de son conditionnement. Elle peut être plus ou moins protégée de l’oxydation par son conditionnement en cas de réaction avec l’oxygène de l’air, ou par sa formulation en cas d’interaction avec une substance oxydante de la matrice. En cas de sensibilité à la lumière, il est aisé de protéger le produit de celle-ci. Enfin le pH, qui joue un rôle direct pour les formulations liquides, intervient également en phase solide selon le caractère acide ou basique de certains excipients, mais comme dans le cas d’une substance oxydante, il est possible d’ajuster la composition de la formulation pour atténuer son effet. Ce sont donc la température et l’humidité relative qui interviennent systématiquement et de manière prépondérante sur la stabilité de la majorité des formes pharmaceutiques solides.

La démonstration de l’action conjointe de la température et d’un facteur représentant l’influence de l’eau a été réalisée en 1977 par un suivi, en chromatographie sur couche mince, de la décomposition du Nitrazepam dilué dans de la cellulose microcristalline⁽⁶⁾. La prise en compte d’une variation exponentielle de la vitesse de dégradation avec l’humidité relative a été reprise en 2007 par Waterman⁽⁷⁾ avec l’ajout d’un terme à la loi d’Arrhenius (équations 3 et 4). Le logiciel ASAPprime® de la société FreeThink Technologies⁽⁸⁾ a été construit à partir de ce modèle. Il est à noter que l’effet de l’humidité peut être modélisé en exprimant autrement le facteur lié à l’humidité⁽⁹⁾.

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \cdot e^{B \cdot HR}$$

ou

$$\ln \ln k = \ln \ln A - \frac{E_a}{RT} + B \cdot HR$$

- Avec :
- k : coefficient de vitesse de la réaction
 - A : facteur préexponentiel (très peu dépendant de la température)
 - Ea : énergie d’activation de la réaction (en J.mol-1)
 - R : constante des gaz parfaits (8,314 J.mol-1.K-1)
 - T : température en Kelvin
 - B : facteur de sensibilité à l’humidité
 - HR : humidité relative (%)

Afin de faire subir l’humidité relative réellement souhaitée aux produits étudiés, le plan d’expérimentation est réalisé avec des échantillons non conditionnés. Les températures et les humidités relatives mises en œuvre peuvent s’échelonner de 40 °C à 90 °C et de 10 % à 90 %. La figure 1 représente graphiquement les conditions mises en œuvre pour une étude de stabilité accélérée prédictive et les conditions ICH usuelles. Du fait de la diversité des conditions à mettre en œuvre, les humidités relatives sont générées par des solutions salines sursaturées placées dans des contenants étanches qui contiennent également les échantillons de produits et éventuellement un capteur d’enregistrement de température et d’humidité relative.

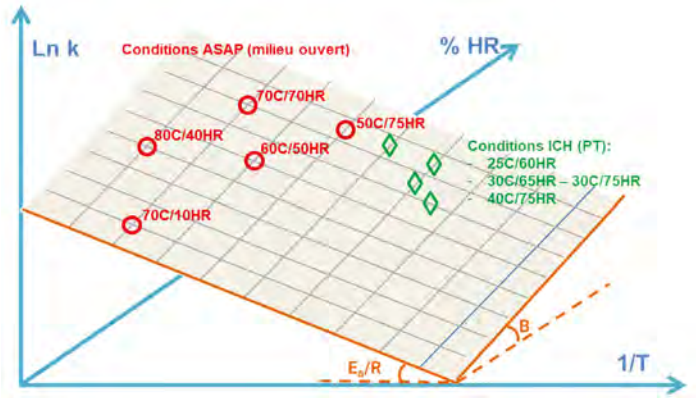


Figure 1 : Comparaison des conditions de stabilité d’une étude ASAP plus des conditions ICH et projection sur les axes des paramètres de la loi d’Arrhenius

Comme pour le cas des liquides, il convient de se placer dans des conditions où il est observé les mêmes réactions pour chacune des conditions de température et d’humidité relative (T/HR). Pour ce faire il est nécessaire :

- De cibler les mêmes taux de dégradations pour toutes les conditions T/HR afin d’observer la même réaction et d’éviter des réactions en chaîne pour les conditions les plus sévères. Des taux de dégradation cible limités à 2 ou 3 fois la spécification permettent de se placer dans des conditions optimales.
- D’éviter tout changement de forme solide du principe actif étudié en tant que tel ou au sein d’une formulation. En effet, un changement de forme polymorphe ou une formation d’hydrate modifie la structure physique du principe actif qui ne se dégrade plus selon la même cinétique du fait d’une énergie d’activation différente ou de la même façon si d’autres produits de dégradation

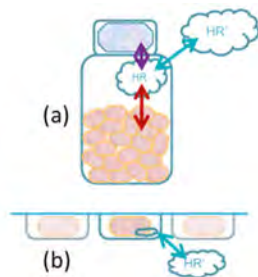


Figure 3 : Echange entre l'humidité relative interne du conditionnement et celle de l'extérieur (a) pour un pilulier avec l'éventuel équilibre dû à un déshydratant et (b) pour un blister

sont formés. En présence de ce type de phénomène, il faut éliminer les conditions concernées lors de l'exploitation des résultats, mais si des connaissances préalables permettent de connaître les limites à ne pas dépasser il suffit de réduire l'étendue des conditions T/HR appliquées lors de la mise en œuvre du plan d'expérimentation.

3. De l'étude en milieu ouvert à la modélisation d'une formulation conditionnée

La loi d'Arrhenius modifiée permet de simuler le comportement du principe actif en présence d'une humidité relative constante. Une fois formulé, celui-ci est exposé à une source d'humidité supplémentaire liée à la teneur en eau des excipients de la matrice et à l'eau éventuellement apportée par le procédé de fabrication. Sous humidité relative constante un équilibre est rapidement atteint, mais une trop forte humidité relative peut induire une déliquescence due à un début de solubilisation d'un des composants. Comme pour les transformations d'état solide du principe actif, cette humidité relative critique constitue une limite à ne pas dépasser dans le plan d'expérimentation. L'hygroscopicité du produit en fonction de l'humidité relative est déterminable par des mesures de sorption/désorption de vapeur ce qui permet de construire un isotherme de sorption comme illustré par la Figure 2.

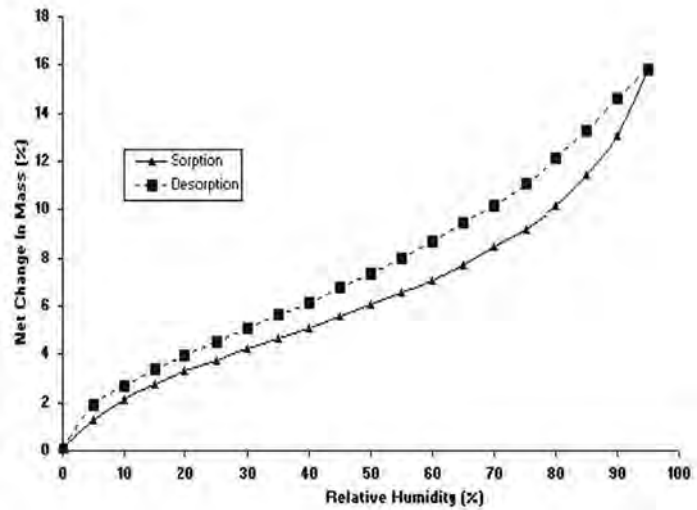


Figure 2 : isotherme de sorption/désorption d'un produit caractérisant son comportement sous différentes humidités relatives

Les conditionnements utilisés sont rarement totalement imperméables à l'humidité excepté les flacons en verre et les conditionnements en double feuille d'aluminium. Une fois le principe actif ou le produit fini conditionné, l'humidité relative à l'intérieur du conditionnement évolue vers une valeur d'équilibre en fonction de l'hygroscopicité des composants et de l'éventuelle présence d'un déshydratant. Par ailleurs, la perméabilité du matériau de conditionnement entraîne un échange d'humidité relative entre l'extérieur et l'intérieur du contenant comme schématisé sur la Figure 3. Cette perméabilité à la vapeur d'eau (MVTR) est également dépendante de la surface d'échange et de la température.

La combinaison des calculs cinétiques issus du plan d'expérimentation en milieu ouvert et des calculs thermodynamiques liés à l'évolution de l'humidité relative dans le conditionnement permet de calculer une cinétique de dégradation pour une condition donnée de température et d'humidité relative selon les caractéristiques du conditionnement. L'utilisation d'une densification statistique basée sur la méthode de Monte Carlo permet de construire un intervalle de prédiction autour de la cinétique de dégradation calculée. Le logiciel ASAPprime®, dont le principe de fonctionnement est illustré par la Figure 4, intègre des données d'hygroscopicité des excipients usuels et de perméabilité des principaux conditionnements mais il est également possible de saisir ses propres valeurs⁽⁸⁾.

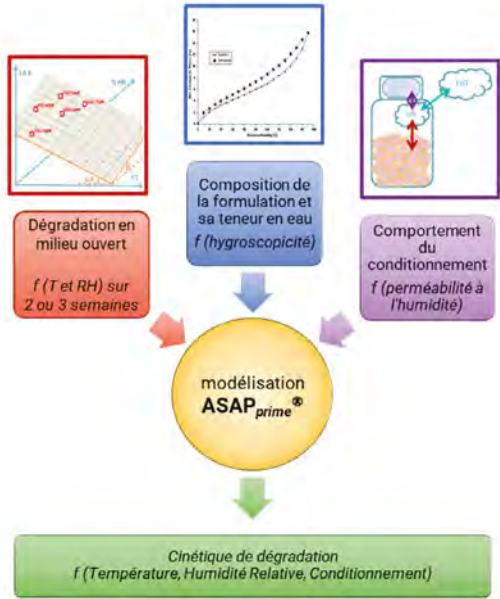


Figure 4 : Schéma fonctionnel du logiciel ASAPprime® de modélisation d'une APS

Le logiciel ASAPprime® présente l'intérêt, outre l'accès à des calculs validés, de proposer des outils d'aide à la modélisation (conception du plan d'expérimentation, graphes des résidus, graphes de l'influence des conditions ou paramètres Ea et B sur la modélisation).

4. Particularités des études de stabilités prédictives

4.1 Principe d'isoconversion

Toutes les réactions chimiques n'étant pas d'ordre zéro, les cinétiques de dégradation ne sont pas forcément linéaires. Le recours à une méthode d'isoconversion permet d'éviter de prendre en compte les équations cinétiques en ciblant le temps nécessaire pour obtenir un niveau de dégradation raisonnable pour chacune des conditions T/HR (d'où le terme d'isoconversion). Cibler un taux de dégradation autour de la spécification pour toutes les conditions T/HR permet d'obtenir

des cinétiques de dégradation cohérentes, c'est-à-dire ne risquant pas d'induire des réactions secondaires^(7,10). Idéalement les durées de conservation appliquées à chaque condition T/HR sont réparties entre la limite de quantification de la procédure analytique et 2 à 3 fois la spécification. Ce principe d'isoconversion est illustré sur la Figure 5.

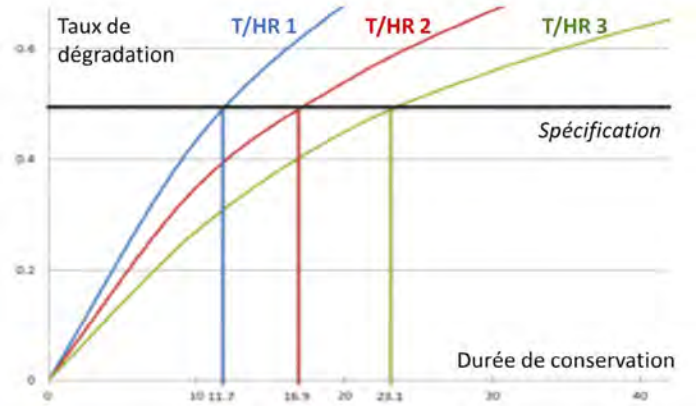


Figure 5 : Principe d'isoconversion : cibler le même taux de dégradation pour toutes les conditions afin de s'affranchir d'une cinétique non linéaire

4.2 Résolution de l'équation d'Arrhenius

La résolution de l'équation d'Arrhenius sous sa forme logarithmique (équation 2) consiste en une régression linéaire de ln k en fonction de 1/T dont la pente correspond à -Ea/R, ce qui permet d'extrapoler le taux de dégradation à des températures inférieures.

La résolution de l'équation d'Arrhenius modifiée pour tenir compte de l'humidité (équation 4) nécessite de calculer les 3 coefficients A, -Ea/R et B. Une régression multi linéaire de ln k en fonction des variables 1/T et le %HR permet d'obtenir la projection planaire de la figure 1 dont les pentes du plan correspondent aux valeurs de -Ea/R et B. De la même manière, il devient possible d'extrapoler le taux de dégradation à des températures et humidités relatives différentes.

Avec 3 inconnues, 3 conditions T/HR suffisent pour résoudre l'équation d'Arrhenius modifiée. Mais afin de se donner la latitude d'éliminer une condition qui s'avérerait trop ou pas assez dégradante et de réduire l'incertitude sur les paramètres calculés, il est conseillé d'utiliser au moins 5 conditions T/HR de vieillissement.

4.3 Considérations pratiques

Les taux de dégradation étant limités et la durée de l'étude de vieillissement des échantillons étant très courte, il n'est pas utile de prévoir beaucoup de temps de conservation. Ainsi 3 ou 4 temps par conditions T/HR suffisent. Au total 15 à 30 échantillons sont collectés sur 2 à 3 semaines pour une étude de stabilité accélérée prédictive. Pour obtenir une bonne modélisation, il convient de réduire au maximum les sources de variabilité. Ainsi pour une analyse chromatographique il est préférable, autant que faire se peut, de quantifier les analytes par normalisation interne en tenant compte des surfaces du principe actif et de tous les produits de dégradation. En s'affranchissant de l'impact lié à la variabilité due à la prise d'essai (pesée pour un principe actif et teneur en principe actif pour un comprimé) et de celui lié à la répétabilité du système chromatographique, cette méthodologie de quantification permet de réduire au maximum l'échantillonnage. Ainsi une dizaine de mg de principe actif ou un seul comprimé peuvent suffire pour déterminer le taux de dégradation de chaque point de stabilité. Cette spécificité est très utile dans les étapes de développement pré-clinique lorsque les quantités de produits disponibles sont très limitées.

De ce fait des bocaux d'un volume de quelques centaines de millilitres fermant hermétiquement sont usuellement utilisés comme boîtes de vieillissement. Les échantillons et la solution saline destinée à générer l'humidité relative y sont placés dans de petits contenants ouverts^(11,12), plus éventuellement un capteur pour enregistrer soit la température soit la température et l'humidité relative. Les bocaux sont placés dans des étuves de paillasse uniquement régulées en température.

La qualité du modèle est très dépendante de la précision des données d'entrées. Les données relatives au vieillissement des échantillons dépendent des équipements utilisés et de l'organisation mise en place :

- La température est facilement contrôlable avec précision : les températures relevées pour les étuves ou par les capteurs placés dans les boîtes de vieillissement sont utilisables,
- L'humidité relative est plus difficilement mesurable avec précision : les valeurs issues des abaques [sel / température / humidité relative] ou enregistrées par les capteurs sont utilisables selon le mode de fonctionnement mis en place,
- Le temps est très facilement mesurable : la durée exacte de la durée de vieillissement des échantillons est à prendre en compte. La qualification et le raccordement métrologique des équipements utilisés (étuves, capteurs température, capteurs température et humidité relative) est à définir selon le type d'étude réalisée – orientation de développement ou réglementaire pour déterminer une péremption – et selon les usages en place dans le laboratoire.

Par ailleurs la précision obtenue pour la détermination des teneurs des analytes dépend directement de la performance de la procédure d'analyse et des critères suivants :

- La sélectivité du système chromatographique : la résolution entre les pics doit permettre une intégration aussi spécifique que possible,
- La limite de quantification : le rapport signal sur bruit doit permettre de déterminer les taux de dégradation en pourcentage avec deux décimales.

La procédure analytique pourra être légèrement adaptée afin d'améliorer ces deux critères. Des compléments de validation seront alors à prévoir en fonction des critères de validation impactés par l'adaptation de la procédure.

Enfin afin de limiter les sources de variabilité, l'analyse des échantillons est à réaliser de manière isochrone, c'est-à-dire en une seule manipulation et au sein de la même séquence d'analyse de façon à s'affranchir des variations liées à la fidélité intermédiaire de la procédure d'analyse.

Au fur et à mesure du développement pharmaceutique, il est usuel d'augmenter le nombre de conditions T/HR ou de temps de sortie par condition en fonction des connaissances acquises dans les études précédentes. Ceci permet d'améliorer la précision du modèle ou d'augmenter la taille de l'échantillonnage afin de disposer d'une marge de sécurité au niveau analytique, voire de mettre en œuvre d'autres techniques d'analyse.

Une étude de stabilité accélérée prédictive mobilise donc peu de ressources puisqu'elle peut être réalisée avec quelques centaines de milligrammes de principe actif ou quelques dizaines de comprimés, en seulement 2 à 3 semaines de vieillissement des échantillons et en ne nécessitant la mise en œuvre que d'une seule analyse des échantillons.

5. Exemple

L'exemple présenté ci-après correspond à une étude réalisée sur des comprimés pour lesquels une précédente étude de modélisation a permis d'ajuster les conditions de température et d'humidité relative afin d'être dans des conditions d'isoconversion optimisées. La spécification de l'impureté suivie est de 0.2%.

Les conditions T/HR ont été générées par des solutions salines. Les températures et les humidités relatives relevées correspondent à celles des capteurs placés dans les boîtes de vieillissements avec les échantillons.

La mise en œuvre de cette étude a été réalisée en abaissant la limite de quantification de la procédure analytique à 0.02 %. Pour chaque point de stabilité, une solution a été préparée à partir de deux comprimés et injectée une seule fois. Les taux de dégradation reportés dans le *Tableau 1* correspondent à une quantification par normalisation interne des pics d'intérêts (principe actif et 3 produits de dégradation). Le point à t0 a été tripliqué afin déterminer la déviation standard de la méthode à renseigner dans le logiciel.

	t0	1j	2j	3j	4j	7j	8j	10j	14j
	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
80°C/13%HR	-	0.08	-	0.13	-	0.21	-	-	-
70°C/27%HR	-	0.06	-	0.09	-	-	0.14	-	-
71°C/56%HR	-	0.09	-	0.15	-	0.30	-	-	-
60°C/11%HR	-	-	-	-	0.05	-	-	0.06	0.08
60°C/68%HR	-	-	0.07	-	0.10	0.14	-	-	-
50°C/75%HR	-	-	0.03	-	0.05	0.07	-	-	-

Tableau 1 : Pourcentages de dégradation obtenus pour une impureté spécifiée à 0,2 %

La modèle construit avec les données du tableau 1 donne les paramètres suivants pour l'équation d'Arrhenius :

- LnA : 30,01 ± 6,4
- Ea : 99,42 ± 18,7 kJ.mol-1
- B : 0,03 ± 0,1

avec des coefficients d'ajustement du modèle de 0,997 pour R2 et 0,987 pour Q2.

Le taux de dégradation en fonction du temps pour une condition donnée de température et d'une humidité relative est déterminé à partir des paramètres de l'équation d'Arrhenius modifiée (*Figure 6*). L'intervalle de prédiction, construit à partir de la densification statistique, est important mais il convient de garder à l'esprit qu'il correspond à une extrapolation à 1 an des valeurs obtenues sur 14 jours de vieillissement. La durée de péremption à retenir correspond à l'intercept de la limite haute de la prédiction (courbe verte) avec le taux de dégradation représenté par la spécification (ligne jaune).

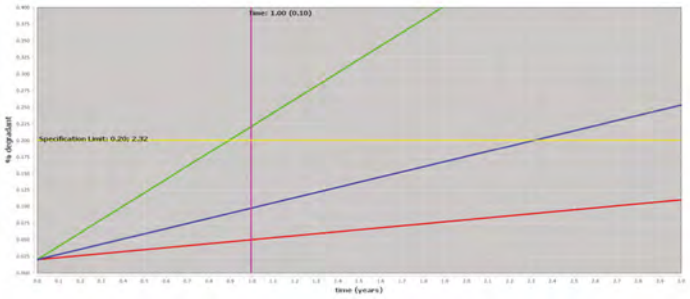


Figure 6 : Profil de dégradation en milieu ouvert à 25°C/60%HR (la courbe bleue représente le taux de dégradation moyen et les courbes verte et rouge à l'intervalle de prédiction)

A partir du modèle établi en milieu ouvert, et une fois les données relatives à la composition de la formulation et à la teneur en eau initiale des comprimés intégrées, l'impact de différents conditionnements est simulé in-silico. Le *Tableau 2* présente les durées de péremption estimées pour différents conditionnements.

Type de conditionnement	Nature du conditionnement	Nombre unités	Déshydratant	Péremption à 25°C/60%HR	Péremption à 30°C/75%HR
Blister	PVC/Alu	n/a	n/a	11 mois	5 mois
Blister	Aclar	n/a	n/a	11 mois	6 mois
Blister	Alu/Alu	n/a	n/a	11 mois	7 mois
Pilulier	HDPE (50mL)	3	sans	11 mois	5 mois
Pilulier	HDPE (50mL)	30	sans	11 mois	6 mois
Pilulier	HDPE (50mL)	3	1g silice	21 mois	11 mois
Pilulier	HDPE (50mL)	30	1g silice	20 mois	11 mois

Tableau 2 : Péremptions prédites pour différents conditionnements

En cas de présence de plusieurs produits de dégradation, un modèle doit être construit pour chaque produit de dégradation, et c'est le produit de dégradation le moins stable au regard de sa spécification, donc avec la péremption la plus courte, qui correspond à la péremption à prendre en compte pour le produit étudié.

6. Domaines d'applications des APS et recevabilité réglementaire

Les études de stabilités accélérées prédictives peuvent être utilisées pour répondre à différents cas de figure et pour supporter différents points au cours du cycle de vie du produit. Ainsi elles peuvent être utilisées pour :

- Déterminer les dates de retest des principes actifs et les péremptions des formes pharmaceutiques destinées aux études cliniques. Il est recommandé de ne pas dépasser 12 mois de péremption, ce qui s'avère généralement suffisant pour initier une étude clinique de Phase I ou Phase II. Le suivi du lot clinique dans des conditions de stabilité ICH et une adéquation entre les résultats obtenus et les valeurs prédites permet ensuite d'étendre la retest date ou la péremption,
- Comparer des lots de principe actif afin d'évaluer l'impact d'un changement dans le procédé de synthèse ou du taux d'amorphe pour un produit cristallisé,
- Comparer différentes formulations afin de sélectionner rapidement la plus stable d'un point de vue chimique,
- Evaluer l'impact d'un changement de fournisseur d'excipient ou d'une modification de procédé sur la stabilité de la forme

- pharmaceutique,
- Évaluer in-silico de nombreux conditionnements afin de sélectionner les plus adaptés à la conservation du produit et justifier, lorsqu'un déshydratant est nécessaire, sa nature et la quantité nécessaire,
- Renforcer l'argumentation scientifique apportée dans les dossiers d'AMM, vis-à-vis des points précédents,
- Évaluer l'impact des excursions de température sur la conformité du produit.

Ces exemples d'application montrent que les études de stabilités accélérées prédictives s'inscrivent complètement dans la démarche 'Quality by Design' décrite dans la ligne directrice ICH Q8(R2) sur le développement pharmaceutique en apportant une meilleure connaissance du comportement du produit et de son procédé de fabrication⁽¹³⁾. Elles permettent également, pour ce qui concerne la stabilité chimique des principes actifs et des formes pharmaceutiques, une évaluation des risques basée sur les connaissances scientifiques comme le préconise la ligne directrice ICH Q9 sur le management des risques qualité⁽¹⁴⁾. De ce fait, ces études prédictives représentent un outil performant utilisable ou mobilisable tout au long du cycle de vie du produit comme décrit par l'ICH Q10⁽¹⁵⁾.

Une enquête publiée en 2020⁽¹⁶⁾, réalisée auprès des industriels utilisant les méthodologies accélérées prédictives, présente une vingtaine de cas d'études ayant été incorporées dans des dossiers d'enregistrement. Alors que la proportion d'études acceptées pour soutenir une péremption initiale est très importante, il y est constaté que l'acceptabilité directe des études de stabilité accélérées prédictives sans demande de données additionnelles est très dépendante des pays dans lesquels les dossiers ont été déposés.

Conclusion

Les études de stabilités accélérées prédictives permettent de modéliser la dégradation chimique des principes actifs et des formes pharmaceutiques ce qui correspond au principal risque patient. Même si elles ne permettent pas de modéliser tous les tests et essais d'une monographie, des travaux ont reporté leur utilisation pour la modélisation de l'évolution de la couleur des comprimés et dans une moindre mesure du test de dissolution. Elles peuvent être utilisées pour obtenir rapidement des informations utiles pour orienter le développement des produits tout en nécessitant moins de ressources matérielles et humaines.

Le recours aux études de stabilités prédictives au cours du développement pharmaceutique s'inscrit donc totalement dans les concepts de 'Quality by Design' et de 'Life Cycle Management'. Gageons que les lignes directrices ICH relatives aux stabilités évolueront prochainement afin proposer de prendre en compte ce type d'études et de bénéficier pleinement des gains qualitatifs qu'elles permettent de générer.



Acronymes

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	ICH : International Council for
APS : Accelerated Predictive Stability	Harmonisation of Technical Requirements for
ASAP : Accelerated Stability Assessment	Pharmaceuticals for Human Use
Program	MVTR : Moisture Vapour Transmission Rate
DVS : Dynamic Vapor Sorption	T/HR : température et humidité relative

Références

- (1) : ICH Q1A(R2) : Stability testing of new drug substances and products, 2003
- (2) : ICH Q1E : Evaluation of stability data, 2003
- (3) : Arrhenius S.A., "Über die reaktionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren", Z Physik Chem, 1989
- (4) : Porter W.R., "Thermally accelerated degradation and storage temperature design space for liquid products", J Val Technology, 2012 – 18(3) p 73-92
- (5) : Waterman K.C. and Adami R.C., "Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals", Int. J. Pharm., 2005 – 293(1-2) p 101-125
- (6) : Genton D. and Kesselring U.W., "Effect of temperature and relative humidity on the stability of nitrazepam in solid state", J Pharm Sci, 1977 – 66(5) p 676-680
- (7) : Waterman K.C., Carella A.J., Gumkowski M.J., Lukulay P., MacDonald B.C., Roy M.C. and Shamblin S.L., "Improved protocol and data analysis for accelerated shelf-life estimation of solid dosage forms", Pharm Res, 2007 – 24(4) p 780-790
- (8) : FreeThink Technologies, <https://freethinktech.com>
- (9) : Clancy D., Hodnett N., Orr R., Owen M. and Peterson J., "Kinetic model development for accelerated stability studies", AAPS PharmSciTech, 2017 – 18(4) p 1158-1176
- (10) : Qiu F. and Scrivens G., "Accelerated Predictive Stability – fundamentals and pharmaceutical industry practices", Academic Press, 2018
- (11) : J. F. Young; Humidity Control in the Laboratory using Salt Solutions – A Review – J. Appl. Chem, 1967, vol 17, September, p 241-245.
- (12) : L. Greenspan; Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions – J of Research of the National Bureau of Standards – A Physics and Chemistry - 1977, vol 81 A, p 89-96.
- (13) : ICH Q8 (R2) : Pharmaceutical development, 2009
- (14) : ICH Q9 : Quality risk management, 2005
- (15) : ICH Q10 : Pharmaceutical quality system, 2008

PHARMACEUTIQUE

NUTRACEUTIQUE

ENVIRONNEMENT

COSMÉTIQUE

DISPOSITIFS MÉDICAUX

MICROBIOLOGIE

- Contamination microbienne, DGAT sous isoteur
- DMLT et germes spécifiés
- Essais de stérilité
- Efficacité de la conservation anti-microbienne (Challenge-tests)
- Endotoxines bactériennes
- Identification bactérienne et fongique par spectrométrie de masse, MALDI-TOF
- Analyses des mycoplasmes par QPCR
- Aérobiocontamination et contrôles de surface
- Qualification et monitoring des installations d'eaux (pharmacopées US, européenne, chinoise et japonaise) : prélèvements sur site / collecte et analyses



PHYSICO-CHIMIE

CONTRÔLE QUALITÉ

- Analyses physico-chimiques et micro-biologiques (matières premières, vrac et produits finis selon tout types de pharmacopées ou dossier pharmaceutique)
- Qualification et monitoring des installations d'eaux (prélèvements sur site /collectes et analyses)
- Recherche des solvants résiduels
- Recherche d'oxyde d'éthylène et dioxane
- Recherche des métaux lourds par ICP/MS (ICHQ3D)



DÉVELOPPEMENT PHARMACEUTIQUE

- Développement et validation de méthodes (ICHQ2R1)
- Études de stabilité
- Études des contaminants
- Études d'interaction contenant / contenu
- Validation de nettoyage
- Recherche de nitrosamines
- Recherche et dosage de nitrosamines
- Recherche et dosage d'allergènes

TROUBLE SHOOTING

ICP MS, MET, MEB, **MALDI-TOF, ORBI-TRAP**,
LC-MS-MS, LC-Q-TOF-MS, DSA-TOF-MS, GC-MS haute définition

ENVIRONNEMENT

Analyses air, surface, eau

Mise en place de la chimie analytique verte au laboratoire contrôle qualité de la société UPSA.

Par Myriam DESCAZAL - François-Xavier MARTIN - - Mylène RABINEAU - Amandine VISENTIN
siegfried.steinbruckner@upsa-ph.com

Le Ministère de l'économie, des finances et de la relance décrit la Responsabilité Sociétale Économique (RSE) comme "la contribution des entreprises aux enjeux du développement durable" avec en ligne de mire notamment les conditions de travail ainsi que l'environnement. Bien avant cette notion récente de RSE, le laboratoire Contrôle Qualité d'UPSA a, dès 2004, introduit un concept de chimie analytique verte afin de prévenir ou de réduire la pollution à sa source.

Solvant #	Pictogrammes Système Général Harmonisé			
Méthanol				
Acétonitrile				
Hexane				
Toluène				
Chloroforme				
Dichlorométhane				

Tableau 1 : Dangers de quelques solvants utilisés au laboratoire Contrôle Qualité

Le laboratoire Contrôle Qualité s'est ainsi inspiré des principes de la chimie verte(1) afin de développer de nouvelles méthodes analytiques minimisant le risque et maximisant leur efficacité. L'accent a ainsi été mis sur la suppression des solvants organiques toxiques et du phosphate, la réduction de la quantité de solvants organiques, la réduction de la consommation d'eau et la réduction d'énergie.

1. Conception de la chimie analytique verte pour les laboratoires UPSA

Dans cette étude, 3 solutions alcooliques, représentatives de produits utilisés sur le terrain, ont été étudiées : une solution stérile d'éthanol à 70%, une solution stérile d'isopropanol à 70% et de l'isopropanol pur à 99,6%. Les analyses ont été réalisées via un COT-mètre de marque et modèle Sievers M9 Portable équipé d'un passeur d'échantillons (Suez). Les flacons utilisés pour la préparation des échantillons sont des flacons traités spécifiquement pour les analyses au COT-mètre, certifiés faible teneur en COT.

2. Pourquoi changer les méthodes d'analyses ?

Jusqu'alors, les méthodes analytiques appliquées au laboratoire stipulaient l'utilisation de nombreux solvants organiques comme l'acétonitrile, le méthanol, le toluène, l'hexane, le chloroforme ... tant pour les préparations d'échantillons que pour les phases mobiles en CLHP (Chromatographie liquide haute performance) ou CCM (chromatographie sur couche mince) par exemple entraînant une consommation d'atome élevée.

NOS ACCRÉDITATIONS CERTIFICATIONS/AUTORISATIONS

- Accréditations COFRAC NF EN ISO 17025*
- Éligible Crédit Impôt Recherche
- Établissements pharmaceutiques fabricant (ANSM) :
 - Décision n° F 17/134 - site de Vénissieux (69)
 - Décision n° F 19/111 - site de Neuilly-en-Thelle (60)
- Certificats BPF** :
 - n°2019/HPF/FR/188
 - n°2019/HPF/FR/189
- Certificat cGMP :

DUNS Number 89-608-5560 / FEI 3013221811

NOS POINTS FORTS

- Nos laboratoires fonctionnent 24h/24 et 365 jours / an
- Des plateformes analytiques de haut niveau équipées des dernières technologies (ICP-MS, ICP-AES, LC-MS-MS, GC-MS-MS, HRMS, MET, séquenceurs haut débit, ...)
- Un vaste réseau de préleveurs et de collectes d'échantillons au service de nos clients
- Contact privilégié avec les clients

GRUPE
CARSO

GRUPE CARSO
4 avenue Jean Moulin
69200 VÉNISSIEUX
Mail : carso-pharma@groupecarso.com
www.carso-pharmaceutique.fr

* 1-1531. Liste des sites et portées d'accréditation disponible sur le site www.cofrac.fr ** certificat de conformité disponible sur le site www.eudragmdp.ema.europa.eu

Or tous ces solvants organiques ont des dangers. De fait, sont-ils incontournables ou est-ce une simple habitude des chimistes développant les méthodes d'analyse ?

Par conséquence, l'utilisation de tels réactifs toxiques implique des besoins en sorbonnes de laboratoire consommatrices d'énergie. Ces équipements de protection collective sont néanmoins à considérer comme une mesure palliative et donc insuffisante dans l'esprit chimie verte où les sources de contamination sont à considérer. L'utilisation aveugle de ce type de réactifs pose question en termes de protection des personnes et de l'environnement, de la préservation des ressources et des traces laissés par les déchets pour les générations futures. Ainsi, à partir de 2004, le défi de rendre les méthodes d'analyse conformes aux principes d'Environnement, d'Hygiène et de Sécurité a été relevé.

Une phase de transformation des méthodes d'analyse s'est enclenchée et s'articule en trois étapes distinctes :

- 1. Elaboration des 10 règles d'or du développement.
- 2. Développement et validation de méthodes suivant ces règles et en accord avec les référentiels ICH opposables.
- 3. Dépôt de variation des méthodes analytiques dans les dossiers d'Autorisation de mise sur le marché auprès des Autorités de Santé.

2.1. Les 10 règles d'or du développement d'une méthode analytique verte

Le développement d'une méthode de chimie analytique verte passe par l'élaboration de principes définissant cette première.

A partir des principes de la chimie verte (1), bien avant l'apparition de publications sur la chimie analytique verte (2, 3, 4), 10 règles d'or ont été édictées afin de réaliser cette transition.

1. Éduction des déchets

Mieux vaut éviter de produire des déchets que d'avoir ensuite à les traiter ou s'en débarrasser.

2. Économie de l'atome

Mise en œuvre de méthodes d'analyses qui réduisent ou suppriment la consommation d'atome (réactifs, solvants, matériels, consommables, ...).

3. Pas ou moins de produits chimiques dangereux

Tout doit être étudié pour qu'une méthode d'analyse utilise et produise des substances peu ou pas toxiques pour l'homme et l'environnement.

4. Solvants et auxiliaires plus sûrs

Renoncer à utiliser des auxiliaires de synthèse (solvants, agents de séparation, etc.) ou choisir des auxiliaires inoffensifs lorsqu'ils sont nécessaires.

5. Efficacité de la fonction préservée

La méthode analytique préserve l'efficacité de la fonction tout en réduisant la toxicité.

6. Conception de l'efficacité énergétique

La dépense énergétique nécessaire à la mise en application d'une méthode analytique doit être examinée sous l'angle de son incidence sur l'environnement et l'économie et être réduite au minimum. Dans la mesure du possible, les opérations doivent s'effectuer dans les conditions de température et de pression ambiantes.

7. Utilisation d'appareils existants et de ressources renouvelables

La dépense énergétique nécessaire au remplacement d'un appareil ou d'une technologie existante doit être examinée sous l'angle de son incidence sur l'environnement et l'économie.

La dépense énergétique doit intégrer : la destruction du matériel existant et la fabrication de l'appareil de remplacement, la robustesse du nouveau matériel par rapport à l'existant (usure des pièces détachées, nature des composites entrant dans les matériels, consommables, consommation d'électricité, informatique, ...).

Utiliser une ressource naturelle ou une matière première renouvelable plutôt que des produits fossiles ou de synthèse, dans la mesure où la technique et l'économie le permettent.

8. Réduction des dérivés ou des extractions

Tout mettre en œuvre pour supprimer ou réduire à minima les extractions avec solvants organiques dans les préparations d'échantillons

Les opérations de séparation et de purification doivent être évitées afin de minimiser la consommation d'énergie et la production des déchets.

9. Conception pour la dégradation

Les produits chimiques utilisés en chimie analytique doivent pouvoir se décomposer en déchets inoffensifs biodégradables. Ils ne doivent pas persister dans l'environnement.

10. Chimie analytique plus sûre pour la prévention des accidents du travail / maladies professionnelles

Les substances chimiques et les matériels entrant dans un processus d'analyse chimique doivent être choisis de façon à prévenir les accidents tels que les émanations dangereuses, explosions et incendies, risque chimique (non-utilisation de composés toxiques ou cancérogènes, mutagènes, reprotoxiques), troubles musculo squelettiques.

2.2. Développement d'une méthode HPLC analytique verte

Le développement d'une méthode "verte" en CLHP, s'articule comme suit :

- Fixation des critères de la méthode CLHP "verte"

** Les critères pour une méthode CLHP verte ont été la suppression des solvants organiques toxiques et du phosphate, la réduction de la consommation d'énergie, la réduction de la quantité de solvants organiques, le remplacement des solvants organiques par le solvant aqueux (si possible) et la réduction de la consommation d'eau.*

- Choix de la technologie

- Recherche et développement

o Bibliographie

- Structure chimique et propriétés physico chimiques des composés à analyser
- Bibliographie des méthodes analytiques existantes pour un composé donné (ex : paracétamol)

o Modélisation d'une méthode potentielle

- Intégration du plan d'échantillonnage
- Préparation des échantillons pour analyse
- Choix de la méthode analytique (CLHP, Chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie UV..)
- Choix de la phase mobile (CLHP)
- Choix de la colonne (CLHP)
- Choix du détecteur

o Développement

- Application du modèle
- Optimisation

o Validation et rapport

2.3. Résultats

Deux approches ont été réalisées au laboratoire Contrôle Qualité UPSA pour un passage à une chimie analytique verte.

La première approche a été de réduire le nombre de chaînes CLHP et le nombre de méthodes utilisées au laboratoire (pour un volume constant d'analyse) en développant des méthodes avec des couplages de colonnes et/ou en des double détections UV avec des trajets optiques différents. Le couplage de colonnes a permis de développer des méthodes permettant de réduire deux méthodes d'analyses en une seule réduisant ainsi le temps d'occupation et le nombre des chaînes CLHP.

La deuxième approche a été de travailler avec des solutions concentrées en analytes afin de réduire les volumes des solutions essais et de pouvoir analyser des échantillons en accord avec les plans d'échantillonnage. Afin de ne pas saturer les détecteurs, des volumes de l'ordre du 1/10 du µL ont été injectés pour les solutions standards et essais en utilisant des étalons internes pour corriger les variations dues

aux très faibles volumes d'injections. En complément, des cellules de 3 mm de trajet optique ont été utilisées. Le développement de méthode CLHP dites vertes est passé par la suppression des phosphates et des solvants organiques toxiques (méthanol et acétonitrile) dans les phases mobiles. Les phosphates ont été remplacés principalement par des succinate, formiate ou acétate.

En outre, il y a eu une réduction importante de la proportion des solvants organiques dans les phases mobiles. Ces dernières contiennent des pourcentages de solvants organiques compris entre 0,8 % et 30 % (plus souvent proche de 3 %) contre 30 % à 85 % dans les phases mobiles précédentes.

Les préparations des solutions essais ont aussi intégré les principes de la chimie analytique verte. Les solvants organiques (méthanol, acétonitrile, hexane, toluène, chloroforme) ont été remplacés par des solutions aqueuses pour la préparation des solutions essais. Les principes de la chimie des solutions ont été mis en œuvre pour solubiliser les échantillons en jouant sur les solubilités conditionnelles des analytes (exemple : solubilité en fonction du pH). Dans quelques cas, de l'éthanol a été ajouté en faible quantité pour aider à la solubilisation des analytes.

Afin de respecter le point 7 des 10 principes de chimie verte analytique, l'option retenue par le laboratoire est de développer avec les dispositifs CLHP existants. Le choix de l'UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) n'a pas été retenu.

Les développements des méthodes ont été effectués avec des colonnes courtes pour réduire les temps d'analyses et en raison de la robustesse des colonnes CLHP contre celles de l'UHPLC.

I. Méthode utilisant des couplages colonnes et/ou une double détection

Le couplage de colonnes est une association de colonnes en série. Le principe est de coupler des colonnes ayant des phases stationnaires différentes permettant de séparer les analytes par des chromatographies différentes.

Dans les exemples suivants, des couplages de colonnes de chromatographie en phase inverse (C1, C8 C18 ...) avec une colonne de chromatographie échangeuse d'ions (NH₂) permettent de réaliser en série de la chromatographie en phase inverse et de la chromatographie par échange d'ion.



Figure 1 : couplage colonne

I.1. Dosage des acides acétylsalicylique, salicylique et ascorbique dans des comprimés effervescents

Deux colonnes courtes (50 mm x 3 mm) ont été couplées en série. La première colonne est une colonne C1 (phase inverse) et la seconde est une colonne NH₂ (chromatographie ionique).

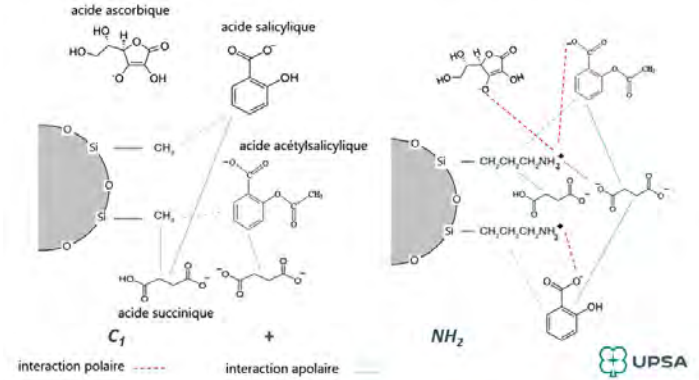
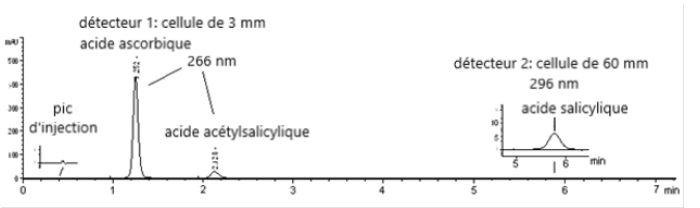


Figure 2 : interactions polaires et apolaires couplage colonne/phase mobile/analytes

La phase mobile est un mélange d'éthanol et de tampon succinate de Na 0,05M pH=5,5 (6 % / 94 % v/v). L'acide succinique (composé naturel) permet une élution plus rapide des acides retenus par la colonne NH₂. La chaîne CLHP est munie de deux détecteurs (DAD : Diode-Array Detection) en série avec des trajets optiques différents. Le premier détecteur avec un trajet optique de 3 mm permet la quantification de l'acide ascorbique et de l'acide acétylsalicylique à λ=266 nm et le second avec un trajet optique de 60 mm permet la recherche des produits de dégradation comme l'acide salicylique à λ=296 nm. Les quantifications de ces trois analytes sont effectuées sur un même run de 7 minutes. La préparation de l'échantillon s'effectue dans un mélange d'éthanol / 0,1 M HCl (5% / 95 % : v/v).



Cette méthode a remplacé deux méthodes CLHP dosant pour l'une l'acide ascorbique et pour l'autre l'acide acétylsalicylique et l'acide salicylique dont les caractéristiques d'analyse sont détaillées ci-dessous :

Méthode	Phase mobile	Temps de run	Préparation échantillon
Acide ascorbique	méthanol (30%) / phosphate 0,05 M - bromure de té-trabutylammonium 0,01 M (70%)	15 minutes	Mélange méthanol (5 mL) / eau (245 mL)
Acide acétylsalicylique et acide salicylique	méthanol (35%) / phosphate 0,05 M - bromure de té-trabutylammonium 0,01 M (65%)	10 minutes	mélange propanol (125V), d'acétonitrile (125V), d'acide phosphorique 85% (5V) et d'eau (250V)

Les gains du développement d'une méthode analytique "verte" sont multiples : nombre de méthodes avec une conséquence directe sur le parc CLHP nécessaire, temps d'analyse et avant tout, suppression de réactifs chimiques néfastes pour l'homme et l'environnement.

I. 2. Dosage du paracétamol, de la phéniramine et de l'acide ascorbique dans des poudres en sachets.

Dans ce cadre, deux colonnes ont été couplées en série. La première colonne est une colonne C18 (150 mm x 4,6 mm) et la seconde est une colonne NH₂ (50 mm x 4.6 mm). La phase mobile est un mélange d'éthanol et d'un tampon succinate de sodium 0,05M pH=5,5 (19 % / 81 % v/v).

La chaîne CLHP est munie de deux détecteurs (DAD) en série avec des trajets optiques différents (3 mm pour la quantification du paracétamol et de l'acide ascorbique – 60 mm pour quantification de la phéniramine). Les quantifications des trois analytes sont effectuées sur un même run (13 minutes). La préparation de l'échantillon s'effectue dans de l'eau purifiée.

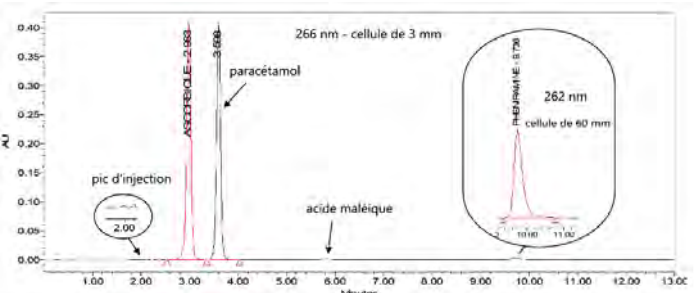


Figure 3: Chromatogramme – paracétamol, acide ascorbique et phéniramine.

Les gains ainsi obtenus sont identiques à ceux obtenus dans l'exemple précédent.

1.3. Méthode d'analyse utilisant un étalon interne
- Dosage de l'acide ascorbique dans des comprimés effervescents. Cette méthode a été développée pour réduire au maximum la consommation du solvant de préparation de la solution pour analyse. La préparation de l'échantillon s'effectue dans de l'eau purifiée contenant de l'acétylcystéine comme anti oxydant. La concentration finale en acide ascorbique des solutions échantillon est de 20 mg/mL. Une telle concentration en acide ascorbique sature les détecteurs DAD classiques ayant un trajet optique de 10 mm pour des volumes d'injections de quelques µL. L'utilisation d'un étalon interne (acésulfame de potassium) a permis de s'affranchir des variations liées à des volumes d'injections de l'ordre du 1/10 de µL. La colonne utilisée dans ce cas est une colonne NH₂ (50 mm x 3 mm). La phase mobile est un mélange d'éthanol et d'un tampon acétate de sodium 0,05M/acide acétique 0,05M (10 % / 90 % v/v). Le temps d'analyse par CLHP est de 14 minutes. Le volume d'injection est de 0,1 µL.

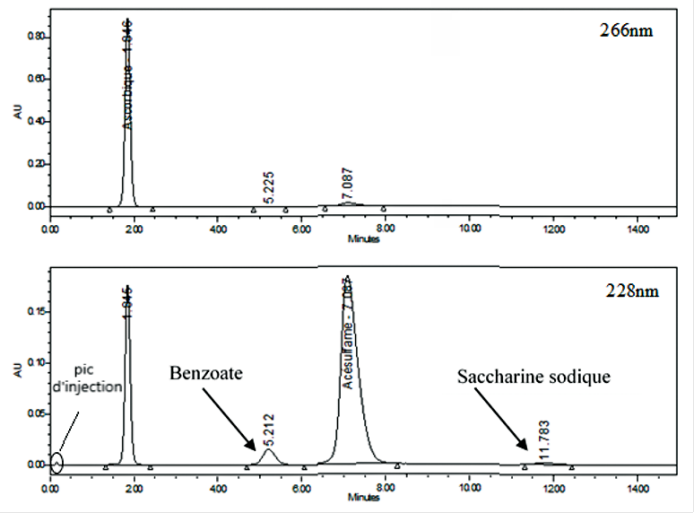


Figure 4: Chromatogramme - dosage acide ascorbique

Le gain dans ce cadre correspond à l'utilisation de verrerie de laboratoire de plus faible volume ayant pour conséquence directe une consommation d'eau purifiée réduite ; la manipulation chronique de plus petits contenants réduisant le risque d'apparition de troubles musculosquelettiques.

1.4. En quoi ces nouvelles méthodes développées au Laboratoire de Contrôle respectent les 10 principes de chimie analytique verte ?

Les méthodes développées ont répondu aux règles de chimie analytique verte initialement fixées :

1)Réduction des déchets : moins de phases mobiles, moins de

consommation volumes de solutions essais ...). Les nouvelles méthodes CLHP ont permis la réduction du temps d'analyse en utilisant des colonnes courtes ou des couplages de courtes colonnes. Réduction des volumes de solvants (eau ou solvants organiques) pour la préparation de l'échantillon : utilisation d'étalons internes permettant d'injecter des petits volumes (0,1 µL à 0,4 µL). Couplage de détecteur permettant de coupler des méthodes d'analyses en une seule.

2)Economie d'atome : baisse importante de consommation de solvant, moins de consommation de colonne CLHP). Mise en œuvre de méthodes d'analyses avec réduction de solvants organiques entrant dans les phases mobiles et remplacement des solvants organiques par des solvants aqueux dans les préparations d'échantillons.

	2005 ⁽¹⁾	2011 ⁽²⁾	2021 ⁽³⁾
Méthanol	1068 L	296 L	109 L
Ethanol	0 L	148 L	173 L
Isopropanol	0 L	59 L	59 L
Acétonitrile	653 L	260 L	127 L
Somme (HPLC – 70 000 préparations d'échantillons)	1721 L	763 L	468 L
Chloroforme	119 L	37 L	6L

Evolution consommation solvants pour analyses HPLC – Laboratoire Contrôle Qualité

(1) : développements, validations et dépôts dans dossiers d'AMM d'une méthode générale du dosage du paracétamol
(2) : mise en application méthode après retour Agences et continuité des développements et validations pour autres analytes
(3): volume résiduel de méthanol lié à l'analyse des matières premières selon les méthodes PE⁽⁶⁾

3)Pas ou moins de produits chimiques dangereux
Suppression des solvants organiques toxiques (méthanol, acétonitrile, hexane, toluène, chloroforme...)

4)Solvants et auxiliaires plus sûrs
L'eau, l'éthanol et l'isopropanol ont remplacé le méthanol, l'acétonitrile, l'hexane, le toluène, le chloroforme...

5)Concevoir pour préserver l'efficacité de la fonction
Les méthodes alternatives sont plus robustes que celles remplacées tout en augmentant les précision, répétabilité et exactitude.

6)Conception de l'efficacité énergétique
. En utilisant une chaîne HPLC avec deux détecteurs pour remplacer deux chaînes CLHP.
. En réduisant les temps d'analyse par CLHP.
. En ayant des méthodes robustes en termes de consommation de colonnes CLHP.
. En développant des méthodes d'analyses ne nécessitant pas de hottes de laboratoire pour la préparation des échantillons pour analyses.

. En développant des méthodes CLHP à température ambiante (colonne CLHP et préparation des échantillons).

7)Utilisation d'appareils existants et de ressources renouvelables

....→

Le développement a été réalisé avec des équipements existants (utilisation des chaînes CLHP existantes et non au profit de chaîne UHPLC). Durabilité des matériaux par le choix de petites colonnes CLHP plus robustes par rapport à des colonnes UHPLC (tests comparatifs réalisés au laboratoire de contrôle : durabilité des colonnes CLHP vs UHPLC : 5 à 50 fois plus d'injections pour les colonnes CLHP). L'eau et l'éthanol (ressource naturelle ou une matière première renouvelable) ont substitué l'acétonitrile et le méthanol, très largement utilisés en CLHP, car issu de synthèses chimiques. L'acétonitrile est un sous-produit de la production de l'acrylonitrile lui-même issu de la pétrochimie n'est pas une ressource renouvelable. Le méthanol est produit industriellement car il n'est pas présent en quantité importante dans la nature.

8)Réduire les dérivés ou les extractions
Les opérations de séparation et de purification ont été évitées afin de minimiser la consommation d'énergie et la production des déchets.

9)Conception pour la dégradation
Des solvants aqueux ont remplacé le méthanol, l'acétonitrile, le toluène, le chloroforme et l'éther pour la préparation des échantillons pour analyses. Les solutions échantillons sont pour la plupart préparées dans de l'eau. La solubilisation des analytes a été optimisée en agissant essentiellement sur le pH. Lorsque cela a été nécessaire, de l'éthanol a été ajouté dans les phases aqueuses pour augmenter la solubilisation de certains composés. Les tampons phosphates des phases mobiles ont été remplacés par des acétate, formiate ou succinate (composés organiques naturels et non toxiques).

10)Chimie analytique plus sûre pour la prévention des accidents
La préparation en méthode pondérable a remplacé le volumétrique. Les préparations sont ainsi faites dans des erlenmeyers en remplacement des fioles supprimant par là même les agitations manuelles. La non-utilisation de composés toxiques ou cancérogènes, mutagènes, reprotoxiques par le remplacement des solvants méthanol*, acétonitrile*, toluène* et chloroforme* par des solvants aqueux dans lesquels peut être ajouté de l'éthanol si besoin.

*Méthanol classé toxique avec risque avéré d'effets graves pour les organes, l'acétonitrile classé Catégorie D - Matières toxiques et infectieuses, 1. Matières ayant des effets toxiques immédiats et graves par l'autorité de santé du Canada, le toluène classé mutagène, cancérogène, reprotoxique (CMR), le chloroforme classé Toxique et CMR.

Prise en compte des troubles musculo squelettiques dans la préparation des échantillons pour analyse (suppression des agitations manuelles, suppression des broyats de comprimés au mortier).

3. Conclusions

A partir de 2004, le laboratoire Contrôle Qualité de la société UPSA a développé plusieurs méthodes d'analyses permettant la suppression des solvants organiques toxiques et le phosphate, l'utilisation de composés non persistants ou bio- accumulateur dans les organismes ou l'environnement, la réduction de la consommation d'énergie, la réduction de la quantité de solvants organiques, le remplacement des solvants organiques par un solvant aqueux si possible, la réduction de la consommation d'eau et l'utilisation des dispositifs existants.

Au total, une douzaine de méthode a été développée pour les dosages des principes actifs, des produits de dégradation et des conservateurs pour plus de cinquante formules de produits finis. Toutes ces méthodes ont été déposées dans les dossiers d'AMM (autorisation de mise sur le marché) correspondants et mises en application dès approbation des Autorités de Santé. Tous ces développements ont été réalisés sans investir. Les seuls achats effectués concernant quatre détecteurs avec des longueurs optiques différentes. Ces détecteurs permettent le regroupement de méthodes analytiques sur une seule chaîne CLHP.

Ce travail a permis de réduire la consommation globale de solvant organique (1721 L de solvants organiques en 2005 contre 468 L en 2016) et des baisses très significatives des solvants toxiques (exemple : 1068 L de méthanol en 2005 contre 109 L en 2016).

Le nombre de chaînes CLHP est passé de 22 chaînes en 2005 à 16 en 2016 puis à 12 en 2021 pour les analyses des produits finis pour un volume d'analyse a minima constant voire croissant.

La diminution du nombre de chaînes CLHP a permis des baisses de consommation en énergie et des consommables ainsi qu'une simplification en termes de maintenance et de métrologie.

Le choix de développement de méthodes analytiques par CLHP a été fait du fait de la présence de ce type de matériel au laboratoire. L'UHPLC n'a pas été retenu pour plusieurs raisons : problématique de robustesse des colonnes UHPLC, consommables plus importants pour la maintenance des systèmes et des saturations de détecteurs (du fait de pic plus fin) impliquant des étapes de dilutions supplémentaires lors de la préparation des solutions essais.

A la question : "Pouvons-nous développer des méthodes analytiques soucieuses des conditions de travail et soucieuses de l'environnement ?", la réponse est très certainement oui.

Références

1: PAUL T. ANASTAS - JOHN C. WARNER, Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York, 1998.	2012	5 : MARTIN F-X., Suppression des solvants toxiques et diminution de la consommation de solvants, Troisième journée de conférences du club Sud-Ouest de l'AFSEP, 11/2012.
2: MIGUEL GUARDIA AND SERGIO ARMENTA, Green Analytical Chemistry, 1st Edition, Volume 57, Elsevier, 2010	4: KUROWSKA – SUSDORFA A., ZWIERZĄDŹYŃSKI M., MARTINOVIĆ BEVANDA A., TALIC S., IVANKOVIĆ A., JUSTYNA PŁOTKA – WASYLKA - Green analytical chemistry: Social dimension and teaching, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 111, February 2019, PP 185-196	6 : Pharmacopée Européenne.
3: MIGUEL DE LA GUARDIA ET SALVADOR GARRIGUES, Handbook of Green Analytical Chemistry, 1st Edition, Wiley,		



AUGMENTEZ VOS CAPACITÉS ANALYTIQUES

Que cela soit en support de vos projets R&D ou au sujet du contrôle qualité de vos produits et procédés, nos équipes vous aident à établir la conformité, l'efficacité et la sécurité de vos produits.

ANALYSES MENÉES SELON LES RÉFÉRENTIELS EN VIGUEUR :

- ▶ Contrôle microbiologique des produits non stériles
 - Essais de dénombrement microbiens
 - Recherche de microorganismes spécifiés
 - Recherche ou dénombrement de *Burkholderia Cepacia Complex*
- ▶ Contrôle des produits stériles
 - Tests de stérilité
 - Recherche de pyrogènes/endotoxines
 - Contamination particulaire visible ou sub-visible
 - Recherche de mycoplasmes
 - Détection d'ADN résiduel bactérien et fongique dans le cadre d'investigations
- ▶ Efficacité de la conservation antimicrobienne
- ▶ Titrage des antibiotiques
- ▶ Monitoring environnemental
 - Prélèvement et analyse des eaux purifiées et pour injection
 - Prélèvement et analyse des gaz pharmaceutiques et air comprimé
 - Contrôle des surfaces et de l'air
 - Qualification des flux
 - Qualification des salles propres
- ▶ Identification et caractérisation des microorganismes
- ▶ Conservation sécurisée des produits biologiques
- ▶ Évaluation de l'activité des désinfectants



Une expertise technique et scientifique depuis plus de 20 ans



Des laboratoires certifiés BPF



Des équipes expérimentées, flexibles et réactives pour répondre à vos besoins dans des délais impartis

Évaporation des solutions à base d'alcool. Quels résidus sur les équipements ?

Par Eva BELLANGER - Cophaclean
eva.bellanger@cophaclean.fr

Il est commun de ne pas rechercher de potentiels résidus de produits alcooliques car il est entendu par tous que ces produits volatils ne laissent aucun résidu sur les équipements après évaporation. L'objectif de cet article est de présenter les résultats obtenus lors d'une étude en laboratoire qui démontre scientifiquement et de manière pragmatique, cette théorie. Ces essais permettent ainsi d'apporter un argumentaire scientifique justifiant de pouvoir s'affranchir d'une recherche de résidus d'alcool sur les équipements.



1. Objectif et principe de l'étude

L'objectif de cette étude est de démontrer la présence, ou non, de résidus carbonés après évaporation de produits constitués de différentes natures d'alcools, couramment utilisés sur les équipements de production dans l'industrie pharmaceutique ou cosmétique. En effet, la présence de résidus d'alcools ou d'additifs (identifiés ou non) pourrait potentiellement contaminer la production à suivre sur l'équipement concerné. Cette étude permet également de s'assurer que l'utilisation de ces produits dits "sans rinçage" n'influence pas les analyses COT dans le cadre de la validation du nettoyage ou de monitoring, en générant des résultats faux positifs.

2. Matériels

Dans cette étude, 3 solutions alcooliques, représentatives de produits utilisés sur le terrain, ont été étudiées : une solution stérile d'éthanol à 70%, une solution stérile d'isopropanol à 70% et de l'isopropanol pur à 99,6%. Les analyses ont été réalisées via un COT-mètre de marque et modèle Sievers M9 Portable équipé d'un passeur d'échantillons (Suez). Les flacons utilisés pour la préparation des échantillons sont des flacons traités spécifiquement pour les analyses au COT-mètre, certifiés faible teneur en COT. L'eau utilisée pour l'ensemble de l'étude est de l'eau ultrapure dont la teneur en COT est vérifiée périodiquement. Les préparations ont été réalisées à l'aide de Multipette E3X qualifiées de marque Eppendorf® et les combitips associés.

3. Mode opératoire

Afin de pouvoir juger de la quantité de carbone résiduelle après évaporation, des échantillons d'alcools évaporés et non évaporés ont été analysés en COT-mètre, puis les teneurs obtenues pour chaque type d'échantillon ont été comparées.

Outre la nature des produits, il a été jugé important de vérifier l'influence de la concentration de la solution initialement présente sur la quantité de résidus retrouvée après évaporation. Par conséquent, pour chaque type de solution alcoolique, 3 niveaux de concentrations ont été déposés de manière à obtenir des résultats de l'ordre de 10, 30 et 50 ppm de COT après dilution dans 40 ml d'eau ultrapure.

De plus, afin de confirmer les résultats obtenus, deux séries d'essais indépendantes ont été réalisées sur deux jours distincts, à plusieurs jours d'intervalle. Ainsi, pour chaque concentration et pour chaque type de solution étudiée, deux tests ont été réalisés à partir de préparations différentes.

Les essais réalisés en doublon sur plusieurs concentrations nous ont permis de vérifier la linéarité et la répétabilité des concentrations obtenues. Il a été choisi de déposer les solutions directement dans le flacon final d'analyse afin de protéger les échantillons de contaminations à cause d'un transfert de contenant. Les résultats obtenus s'appliquent donc à une évaporation de produit déposé sur verre.

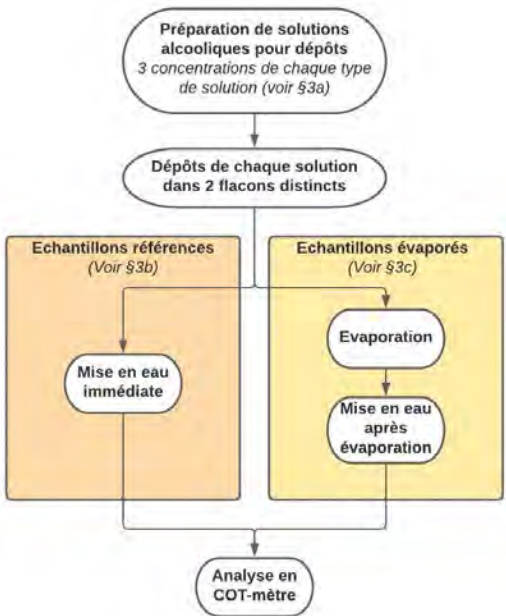


Figure 1 : Schématisation des différentes étapes du mode opératoire

3.1 Préparation des solutions de dépôts

Les concentrations des solutions à préparer pour atteindre les teneurs précédemment citées ont été déterminées grâce au pourcentage carbone calculé théoriquement (à partir des formules brutes des différents composés) pour chacune des solutions :

Isopropanol à 99,6%		
Pourcentage carbone estimé (%)	Concentration de carbone souhaitée (mg/L)	Concentration de produit correspondante (mg/L)
60	10	16,7
	30	50,0
	50	83,3
Isopropanol à 70%		
Pourcentage carbone estimé (%)	Concentration de carbone souhaitée (mg/L)	Concentration de produit correspondante (mg/L)
42	10	23,8
	30	71,4
	50	119
Ethanol à 70%		
Pourcentage carbone estimé (%)	Concentration de carbone souhaitée (mg/L)	Concentration de produit correspondante (mg/L)
37	10	27,0
	30	81,1
	50	135

Afin de s'affranchir d'une possible influence de la taille du dépôt sur la quantité de résidus finale après évaporation, il a été choisi d'uniformiser le volume déposé pour chaque type de solution et pour chaque concentration étudiée. Par conséquent, il a été nécessaire de

préparer 3 solutions de dépôt pour chaque type de solution alcoolique étudié (une solution par niveau de concentration).

Les concentrations théoriques souhaitées pour les solutions de dépôts sont les suivantes :

Isopropanol à 99,6%					
Concentration souhaitée de produit (mg/L)	Volume final de solution (mL)	Volume de solution de dépôt (mL)	Concentration souhaitée de solution de dépôt (mg/L de produit)	Densité de l'isopropanol à 99,6%	Concentration souhaitée de solution de dépôt (mL/L de produit)
16,7	40	0,100	6 680	786 mg/mL	8,50
50,0			20 000		25,4
83,3			33 320		42,4
Isopropanol à 70%					
Concentration souhaitée de produit (mg/L)	Volume final de solution (mL)	Volume de solution de dépôt (mL)	Concentration souhaitée de solution de dépôt (mg/L de produit)	Densité de l'isopropanol à 70%	Concentration souhaitée de solution de dépôt (mL/L de produit)
23,8	40	0,100	9 520	870 mg/mL	10,9
71,4			28 560		32,8
119			47 600		54,7
Ethanol à 70%					
Concentration souhaitée de produit (mg/L)	Volume final de solution (mL)	Volume de solution de dépôt (mL)	Concentration souhaitée de solution de dépôt (mg/L de produit)	Densité de l'éthanol à 70%	Concentration souhaitée de solution de dépôt (mL/L de produit)
27,0	40	0,100	10 800	870 mg/mL	12,4
81,1			32 440		37,3
135			54 000		62,1

Afin d'éviter toute évaporation partielle, il a été choisi de sélectionner un volume de solution alcoolique plutôt que de réaliser une pesée. En effet, le transfert d'un volume permet d'exposer la solution sur un délai beaucoup plus court que lors d'une pesée. Les solutions de dépôts ont ainsi été préparées comme décrit ci-après :

Isopropanol à 99,6%					
Nom préparation	Quantité d'isopropanol 99,6% introduite (mL)	Volume final (mL)	Concentration finale (mL/L)	Densité	Concentration finale (mg/L)
SM ISO 10	1,0	100	10	786 g/L	7 860
SM ISO 30	2,6		26		20 436
SM ISO 50	4,3		43		33 798
Isopropanol à 70%					
Nom préparation	Quantité d'isopropanol à 70% introduite (mL)	Volume final (mL)	Concentration finale (mL/L)	Densité	Concentration finale (mg/L)
SM ISO70 10	1,0	100	10	870 g/L	8 700
SM ISO70 30	3,3		33		28 710
SM ISO70 50	5,5		55		47 850
Ethanol à 70%					
Nom préparation	Quantité d'éthanol à 70% introduite (mL)	Volume final (mL)	Concentration finale (mL/L)	Densité	Concentration finale (mg/L)
SM ETOH 10	1,0	100	10	870 g/L	8 700
SM ETOH 30	3,8		38		33 060
SM ETOH 50	6,4		64		55 680

La préparation des échantillons consistant en un dépôt de 100µL de chaque solution de dépôts préparées précédemment, puis à l'ajout d'eau ultrapure jusqu'à atteindre un volume final de 40mL (immédiatement après le dépôt ou après évaporation du dépôt), les concentrations correspondantes pour les solutions ainsi préparées sont, par conséquent, les suivantes :

Isopropanol à 99,6%					
Nom préparation	Nom de la solution de dépôt	Quantité introduite (mL)	Volume final (mL)	Concentration finale (mg/L de produit)	Concentration finale (mg/L de COT)
SF ISO 10	SM ISO 10	0,100	40	19,7	11,8
SF ISO 30	SM ISO 30			51,1	30,7
SF ISO 50	SM ISO 50			84,5	50,7
Isopropanol à 70%					
Nom préparation	Nom de la solution de dépôt	Quantité introduite (mL)	Volume final (mL)	Concentration finale (mg/L de produit)	Concentration finale (mg/L de COT)
SF ISO70 10	SM ISO70 10	0,100	40	21,8	9,16
SF ISO70 30	SM ISO70 30			71,8	30,2
SF ISO70 50	SM ISO70 50			120	50,4
Ethanol à 70%					
Nom préparation	Nom de la solution de dépôt	Quantité introduite (mL)	Volume final (mL)	Concentration finale (mg/L de produit)	Concentration finale (mg/L de COT)
SF ETOH 10	SM ETOH 10	0,100	40	21,8	8,07
SF ETOH 30	SM ETOH 30			82,7	30,6
SF ETOH 50	SM ETOH 50			139	51,4

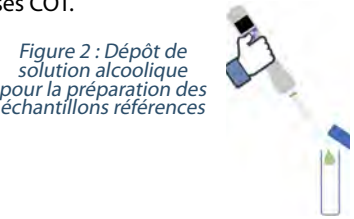
3.2 Préparation des échantillons références

L'objectif de ces préparations est double : il permet de s'assurer, d'une part, que le COT-mètre est capable d'analyser et de fournir les résultats attendus par les calculs théoriques ; et d'autre part, il permet également d'obtenir une valeur de référence pour l'interprétation des échantillons évaporés. La quantité de carbone ainsi déterminée

par le COT-mètre correspond à la quantité de carbone présent avant évaporation. Elle sera utilisée pour calculer l'efficacité d'évaporation des produits carbonés.

La préparation des échantillons références s'est déroulée en plusieurs étapes :

Etape 1 : Dépôt de 100 µL de solution de dépôt à base d'éthanol ou isopropanol précédemment préparée à une concentration permettant d'atteindre les niveaux souhaités, directement dans un flacon pour analyses COT.



Etape 2 : Ajout immédiat de 39,9 mL d'eau ultrapure afin d'atteindre un volume final de 40mL. Les échantillons références permettant la détermination de la quantité de carbone présente dans la quantité déposée de solution alcoolique, l'ajout de l'eau dans les flacons et la fermeture des flacons COT ont été réalisés immédiatement après dépôt du produit afin d'éviter toute évaporation partielle. La fermeture immédiate des flacons a également permis d'éviter toute contamination partielle entre échantillon. Pour cette même raison chaque échantillon de chaque type d'alcool a été préparé et traité de manière indépendante des autres, de façon à ne jamais avoir plusieurs flacons COT ouverts en simultanée.



La technique analytique utilisée pour cette étude est non spécifique (COT-mètre). Ainsi, il a également été nécessaire de préparer des échantillons de blancs afin de connaître la quantité de carbone apportée par le matériel et l'eau ultrapure et pouvoir ainsi déduire cette valeur des différents échantillons.

Etape 3 : Pour la préparation des blancs solvants, 40mL d'eau ultrapure utilisée à l'étape 2 de la préparation des échantillons références ont été directement introduits dans un flacon COT. A chaque série de test, 3 flacons de blancs ont été préparés afin d'obtenir une teneur de COT plus robuste. La moyenne des 3 blancs a été utilisée pour déduction des teneurs en COT des échantillons références.



La nature et quantité de chaque échantillon de référence préparé, par série, sont synthétisées ci-dessous :

Echantillons références à 10ppm, 30ppm et 50ppm de COT dans 40mL			
Isopropanol à 99,6%	Isopropanol à 70%	Ethanol à 70%	Blancs références
1x 10ppm de COT 1x 30ppm de COT 1x 50ppm de COT	1x 10ppm de COT 1x 30ppm de COT 1x 50ppm de COT	1x 10ppm de COT 1x 30ppm de COT 1x 50ppm de COT	3x

3.3 Préparation des échantillons évaporés

Les échantillons évaporés sont le sujet de l'étude. Il s'agit d'échantillons de solutions alcooliques laissés volontairement à évaporer afin d'étudier et de détecter de potentiels résidus carbonés, une fois la surface sèche. Ils ont été préparés de manière strictement identique aux échantillons références et à partir des mêmes solutions de dépôt pour chaque série de test.

Les préparations ont été les suivantes pour chacun des échantillons évaporés :

Etape 1 : Dépôt de 100 µL de solution de dépôt à base d'éthanol ou d'isopropanol précédemment préparée à une concentration permettant d'atteindre les niveaux souhaités, directement dans un flacon pour analyses COT.



L'analyse d'échantillons au COT-mètre est sensible aux contaminations (méthode non spécifique), c'est pourquoi l'évaporation des 100µL a été réalisée naturellement, sans chauffe ou flux d'air. Les flacons COT ont été placés ouverts sous hotte aspirante afin d'aider l'évaporation sans apporter de contaminations extérieures. Malgré toutes ces précautions, et afin de prendre en compte de potentielles contaminations carbonées apparaissant lors de l'évaporation de l'échantillon, des échantillons de blancs ont également été préparés et laissés à évaporer aux côtés des échantillons tests.

Etape 2 : Dépôt de 100 µL d'eau ultrapure ayant servi à préparer les solutions de dépôts à base d'alcools, utilisées pour la préparation des échantillons.



Etape 3 : Abandon des flacons préparés aux étapes 1 et 2 jusqu'à évaporation totale des dépôts

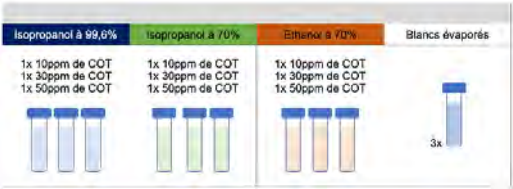


Etape 4 : Après totale évaporation, 40mL d'eau ont été ajoutés dans les flacons secs afin d'obtenir un volume équivalent à celui des échantillons références et ainsi permettre la comparaison des résultats obtenus. La même quantité de la même eau ultrapure a été ajoutée aux blancs évaporés afin de connaître la teneur en COT de l'eau ultrapure ayant permis la mise en eau des échantillons évaporés, ainsi que la potentielle quantité de carbone apportée par l'étape d'évaporation. A chaque série de test, 3 flacons de blancs évaporés ont été préparés afin d'obtenir une teneur de COT plus robuste. La moyenne des 3 résultats a été utilisée pour déduction des teneurs en COT des échantillons évaporés.



Figure 8 : Ajout d'eau après évaporation dans blancs et échantillons évaporés

La nature et quantité de chaque échantillon préparé, par série, sont synthétisées ci-dessous :



4. Résultats

A partir des résultats obtenus pour l'ensemble de ces préparations, un pourcentage d'évaporation a été calculé selon l'équation suivante :

$$100 - \left(\frac{\text{Echantillon évaporé (ppm de COT)} - \text{Moyenne des blancs évaporés (ppm de COT)}}{\text{Solution référence (ppm de COT)} - \text{Moyenne des blancs références (ppm de COT)}} \right)$$

4.1 Résultats obtenus pour l'analyse des blancs

La moyenne des teneurs en carbone des blancs pour chaque type de blancs et pour chaque série est présentée ci-après :

Moyenne des blancs références pour correction des échantillons références (ppm COT)	
Série 1	Série 2
0,0385	0,0643
Moyenne des blancs évaporés pour correction des échantillons évaporés (ppm COT)	
Série 1	Série 2
0,0334	0,0388

Les évaporations n'ayant pas été facilitées par une quelconque intervention, afin d'éviter toute contamination, elles ont par conséquent nécessité un laps de temps important (environ 24h). C'est pourquoi les échantillons et blancs évaporés n'ont pas pu être mis en eau le même jour que les solutions et blancs références. Ainsi, les écarts entre les valeurs de blancs utilisés pour les corrections sont attendus et directement liés à la qualité de l'eau utilisée le jour de la préparation des solutions.

4.2 Résultats obtenus pour l'étude de l'isopropanol à 99,6%

Etude à concentration équivalente à environ 10 ppm de COT en solution		
Identification des séries	Série 1	Série 2
Concentrations corrigées des échantillons références (ppm de COT)	10,8	11,0
Concentrations corrigées des échantillons évaporés (ppm de COT)	0,0246	0,0113
Pourcentage d'évaporation des composés carbonés (%)	99,8	99,9

Etude à concentration équivalente à environ 30 ppm de COT en solution		
Identification des séries	Série 1	Série 2
Concentrations corrigées des échantillons références (ppm de COT)	27,7	27,8
Concentrations corrigées des échantillons évaporés (ppm de COT)	-0,0069	-0,0028
Pourcentage d'évaporation des composés carbonés (%)	100	100

Etude à concentration équivalente à environ 50 ppm de COT en solution		
Identification des séries	Série 1	Série 2
Concentrations corrigées des échantillons références (ppm de COT)	46,0	46,3
Concentrations corrigées des échantillons évaporés (ppm de COT)	-0,0099	-0,0071
Pourcentage d'évaporation des composés carbonés (%)	100	100

4.3 Résultats obtenus pour l'étude de l'isopropanol à 70%

Etude à concentration équivalente à environ 10 ppm de COT en solution		
Identification des séries	Série 1	Série 2
Concentrations corrigées des échantillons références (ppm de COT)	8,41	9,37
Concentrations corrigées des échantillons évaporés (ppm de COT)	0,0090	0,0036
Pourcentage d'évaporation des composés carbonés (%)	99,9	100

Etude à concentration équivalente à environ 30 ppm de COT en solution		
Identification des séries	Série 1	Série 2
Concentrations corrigées des échantillons références (ppm de COT)	28,0	28,7
Concentrations corrigées des échantillons évaporés (ppm de COT)	-0,0080	-0,0028
Pourcentage d'évaporation des composés carbonés (%)	100	100

Etude à concentration équivalente à environ 50 ppm de COT en solution		
Identification des séries	Série 1	Série 2
Concentrations corrigées des échantillons références (ppm de COT)	44,7	48,0
Concentrations corrigées des échantillons évaporés (ppm de COT)	-0,0070	-0,0060
Pourcentage d'évaporation des composés carbonés (%)	100	100

4.4 Résultats obtenus pour l'étude de l'éthanol à 70%

Etude à concentration équivalente à environ 10 ppm de COT en solution		
Identification des séries	Série 1	Série 2
Concentrations corrigées des échantillons références (ppm de COT)	9,37	7,17
Concentrations corrigées des échantillons évaporés (ppm de COT)	-0,0015	0,0047
Pourcentage d'évaporation des composés carbonés (%)	100	99,9

Etude à concentration équivalente à environ 30 ppm de COT en solution		
Identification des séries	Série 1	Série 2
Concentrations corrigées des échantillons références (ppm de COT)	27,0	26,8
Concentrations corrigées des échantillons évaporés (ppm de COT)	-0,0108	-0,0069
Pourcentage d'évaporation des composés carbonés (%)	100	100

Etude à concentration équivalente à environ 50 ppm de COT en solution		
Identification des séries	Série 1	Série 2
Concentrations corrigées des échantillons références (ppm de COT)	45,3	47,7
Concentrations corrigées des échantillons évaporés (ppm de COT)	-0,0112	-0,0079
Pourcentage d'évaporation des composés carbonés (%)	100	100

Conclusion

Les concentrations obtenues pour les solutions références sont proches des concentrations attendues. Ainsi, les solutions références sont représentatives des dépôts et ne présentent pas de biais. Les concentrations des échantillons évaporés corrigées par les concentrations des blancs évaporés fournissent des résultats proches de la valeur nulle. Cela signifie que les flacons COT ayant contenus une quantité connue de solution alcoolique fournissent, une fois évaporée, des teneurs en carbone similaires à celle fournie par les flacons COT témoins. L'efficacité d'évaporation calculée selon la formule présentée en introduction du paragraphe "Résultats" est située entre 99,8% et 100%, soit une évaporation quasi-totale. Ces résultats permettent ainsi de conclure que les solutions alcooliques étudiées dans cette étude ne génèrent pas de résidus carbonés après évaporation sur du verre. Ces conclusions ne sont pas transposables sur un autre matériau sans réalisation d'études complémentaires. Il est prudent également de préciser que les résultats obtenus lors de cette étude ne sont que l'observation issue des produits étudiés et que la formulation des produits peut varier (quantité et nature d'additifs différents). En ce sens, il est important de s'assurer que chaque produit utilisé ne génère pas de résidu après évaporation et que leur formulation est basée sur des produits purs et connus comme étant volatils tels que l'isopropanol ou éthanol.



Acronymes

COT : Carbone Organique Total
EtOH : Ethanol
SM : Solution Mère
SF : Solution Fille



TRÈS PROCHAINEMENT,
POSTES À POURVOIR
EN CONTROLE
QUALITE !

BRING YOUR FUTURE TO LIFE

Dans le cadre d'un projet de croissance et de la création d'un nouveau site de production dans le Puy de Dôme, CARBOGEN AMCIS recrute des collaborateurs en Contrôle Qualité.

Nous recherchons des talents afin de renforcer nos équipes et contribuer à ce projet d'extension qui représente l'un des chantiers industriels pharmaceutiques les plus importants de la région.

Si vous avez des compétences en microbiologie ou en physico-chimie, si vous êtes à la recherche d'une nouvelle opportunité de carrière dans une entreprise en plein essor et motivé(e) à l'idée de prendre part à un projet ambitieux, alors vous êtes celui ou celle qu'il nous faut !

Pour en savoir plus sur les postes à pourvoir, contactez-nous !

HR_Riom@carbogen-amcis.com



TERANGA associe la synergie d'un groupe à la flexibilité d'entreprises à taille humaine

- Développement analytique et validation de méthodes
- Contrôle qualité microbiologique et maîtrise de la contamination
- Monitoring environnemental et identification microbienne
- Contrôle qualité physico-chimique
- Stockage et étude de stabilité
- Validation des procédés de nettoyage
- Contrôle/qualification des locaux et des équipements
- Support technique et réglementaire
- Audit et conseil
- Formation

NOTRE VISION

Être un partenaire fiable au delà d'une simple relation client-fournisseur

NOS VALEURS

Le sens du service, notre proactivité et l'épanouissement de nos équipes sont des éléments clés de la réussite de vos projets

NOS MISSIONS

Apporter des solutions techniques et réglementaires durant les différentes phases de développement et de contrôle de vos produits

