

PLAN D'EXPERIENCES (DOE)

Optimisation Complète d'une Méthode HPLC

Industrie Pharmaceutique — Contrôle Qualité

Produit	Metformine HCl 500 mg
Méthode analytique	HPLC-UV (Phase inverse)
Référence	DOE-HPLC-2025-001
Date	Janvier 2025
Responsable	Dr. N. Bensalem — QC Lab

ÉTAPE 1

Définition du Problème

1.1 Contexte et Objectif

La méthode HPLC actuelle de dosage de la Metformine HCl 500 mg présente des problèmes de résolution insuffisante entre les pics de la substance active et des impuretés spécifiées, avec un temps d'analyse trop long (>25 min) et une variabilité inter-journalière de la réponse (RSD > 2%). L'objectif est d'optimiser les conditions chromatographiques pour satisfaire les exigences ICH Q2(R1) et les spécifications de la Pharmacopée Européenne.

1.2 Réponses à Optimiser (Variables Dépendantes)

Réponse (Y)	Définition	Spécification Cible	Méthode de Mesure
Y1 — Rs (Résolution)	Résolution entre Metformine et Guanidine (imp. A)	$Rs \geq 2.0$	$Rs = 1.18 \times (tR2 - tR1) / (w0.5_1 + w0.5_2)$
Y2 — Tf (Facteur de traînée)	Asymétrie du pic principal	$0.8 \leq Tf \leq 1.5$	$Tf = W0.05 / (2f)$ — USP
Y3 — N (Efficacité)	Nombre de plateaux théoriques	$N \geq 5000$	$N = 5.545 \times (tR/w0.5)^2$
Y4 — tR (Temps de rétention)	Temps d'élution du pic principal	tR entre 8 et 15 min	Lecture directe chromatogramme
Y5 — RSD%	Répétabilité des aires de pic (n=6)	$RSD \leq 1.0 \%$	$RSD = (SD/Moyenne) \times 100$

1.3 Brainstorming — Diagramme d'Ishikawa (Cause-Effet)

Le groupe de réflexion (Analytique, QC, R&D, Production) a identifié les familles de causes susceptibles d'influencer les réponses HPLC selon le diagramme 6M :

Famille 6M	Causes identifiées (facteurs potentiels)	Impact suspecté
Méthode	% solvant organique, pH tampon, débit, gradient vs isocratique	Très élevé — séparation & rétention
Matériau	Type de colonne (C18, C8), longueur, diamètre de particule	Très élevé — rétention & efficacité
Milieu	Température de colonne, humidité ambiante	Élevé — sélectivité
Machine	Marque HPLC, volume d'injection, détecteur UV λ	Moyen — sensibilité
Main-d'œuvre	Opérateur, préparation phase mobile	Moyen — variabilité
Mesure	Intégration des pics, calibration du détecteur	Faible

Protocole de mesure retenu : Injection en triplicat (n=3) pour chaque condition expérimentale. Standards USP de Metformine HCl et d'impureté A (Guanidine) à 0.1% en concentration. Colonne de référence : Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 × 4.6 mm, 5 μ m). Détection UV à 218 nm.

ÉTAPE 2

Sélection des Facteurs

2.1 Liste des Facteurs Potentiels Retenus

Suite au brainstorming, 7 facteurs contrôlables ont été identifiés pour l'étude de criblage initiale :

#	Facteur	Unité / Type	Niveau Bas (-1)	Niveau Moyen (0)	Niveau Haut (+1)
X1	% ACN (Phase mobile B)	% v/v	5 %	12.5 %	20 %
X2	pH du tampon phosphate	pH	2.5	3.5	4.5
X3	Débit de la phase mobile	mL/min	0.8	1.0	1.2
X4	Température de colonne	°C	25	30	35
X5	Volume d'injection	µL	5	10	20
X6	Concentration tampon	mM KH2PO4	10	20	30
X7	Longueur d'onde détection	nm	210	218	230

Note ICH Q2(R1) — Paramètres Critiques de Méthode (CMP)
Les facteurs X1 (% ACN), X2 (pH) et X3 (Débit) sont considérés comme des paramètres critiques de méthode (CMP) selon les guidelines ICH.
Les facteurs X5 (Volume injection) et X7 (λ) sont des paramètres standards — faible impact attendu sur la séparation.
Tous les niveaux sont définis dans les plages opérationnelles validées (équipement qualifié IQ/OQ/PQ).

ÉTAPE
3A

Plan de Criblage — Plackett-Burman (7 Facteurs)

3A.1 Justification du Plan de Criblage

Avec 7 facteurs potentiels, un plan factoriel complet $2^7 = 128$ essais serait prohibitif. Le plan de Plackett-Burman (PB) à 12 essais (résolution III) permet d'estimer les effets principaux de chacun des 7 facteurs avec un minimum d'expériences. Les interactions ne sont pas estimées à ce stade — l'objectif est uniquement d'identifier les facteurs significatifs.

3A.2 Matrice de Plackett-Burman (12 Essais, 7 Facteurs)

Codage : +1 = niveau haut, -1 = niveau bas. Essais randomisés pour éliminer les biais systématiques.

Essai	X1 %ACN	X2 pH	X3 Débit	X4 Temp.	X5 Vol.inj	X6 [Tampon]	X7 λ (nm)	Y1_Rs (Résolution)
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	1.65
2	+1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	2.12
3	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	1.88
4	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	2.45
5	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	1.92
6	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	2.34
7	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	1.78
8	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	1.43
9	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	1.21
10	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	2.08
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	1.55
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.18

3A.3 Analyse des Effets — Diagramme de Pareto

Calcul des effets principaux (différence entre moyennes haut et bas) sur la réponse Y1 (Résolution) :

Facteur	Nom	Effet Estimé	Effet Classé	Significatif ? (p<0.05)
X1	% ACN	+0.68	1er — 0.68	OUI ***
X2	pH tampon	+0.42	2ème — 0.42	OUI **
X3	Débit	+0.31	3ème — 0.31	OUI *
X4	Température	+0.12	4ème — 0.12	Non (p=0.18)
X6	Conc. tampon	+0.09	5ème — 0.09	Non (p=0.34)
X5	Vol. injection	-0.06	6ème — 0.06	Non (p=0.51)
X7	Longueur onde	+0.03	7ème — 0.03	Non (p=0.76)

Conclusion du Criblage — Facteurs Retenus pour la Suite

FACTEURS SIGNIFICATIFS RETENUS (3) : X1 (% ACN), X2 (pH tampon), X3 (Débit de la phase mobile)

FACTEURS ELIMINÉS (4) : X4, X5, X6, X7 — fixés à leurs valeurs nominales pour la suite de l'étude

La réduction de 7 à 3 facteurs permet de passer au plan factoriel complet 2^3 puis au plan de surface de réponse.

ÉTAPE
3B

Plan Factoriel Complet 2³ — Étude des Interactions

3B.1 Justification du Plan Factoriel 2³

Avec 3 facteurs retenus (X1, X2, X3), un plan factoriel complet $2^3 = 8$ essais (+ 3 points centraux = 11 essais au total) permet d'estimer : 3 effets principaux (X1, X2, X3), 3 interactions d'ordre 2 (X1×X2, X1×X3, X2×X3), et 1 interaction d'ordre 3 (X1×X2×X3). Ce plan est à résolution V — aucune confusion entre effets principaux et interactions d'ordre 2.

3B.2 Matrice Expérimentale 2³ + 3 Points Centraux

N°	X1 %ACN	X2 pH	X3 Débit (mL/min)	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	Y1 Rs	Y2 Tf
1	5%	2.5	0.8	-1	+1	-1	+1	1.52	1.08
2	20%	2.5	0.8	-1	-1	+1	+1	2.18	1.21
3	5%	4.5	0.8	+1	-1	+1	-1	1.74	1.12
4	20%	4.5	0.8	+1	+1	-1	-1	2.56	1.18
5	5%	2.5	1.2	-1	+1	-1	+1	1.38	1.34
6	20%	2.5	1.2	-1	-1	+1	-1	2.02	1.28
7	5%	4.5	1.2	+1	+1	+1	+1	1.61	1.22
8	20%	4.5	1.2	+1	+1	+1	-1	2.42	1.19
PC1	12.5%	3.5	1.0	—	—	—	—	2.21	1.14
PC2	12.5%	3.5	1.0	—	—	—	—	2.19	1.16
PC3	12.5%	3.5	1.0	—	—	—	—	2.23	1.13

3B.3 Analyse ANOVA du Plan 2³

Source	Effet (β)	SS	df	MS	F-ratio	p-valeur
X1 (% ACN)	+0.620	0.868	1	0.868	48.2	0.0002 ***
X2 (pH)	+0.325	0.253	1	0.253	14.0	0.0091 **
X3 (Débit)	-0.188	0.085	1	0.085	4.7	0.0714 *
X1×X2	+0.148	0.052	1	0.052	2.9	0.1320 NS
X1×X3	-0.095	0.021	1	0.021	1.2	0.3180 NS
X2×X3	+0.062	0.009	1	0.009	0.5	0.5010 NS
Manque d'ajustement	—	0.010	3	0.003	0.2	0.8940 NS
Erreur pure (PC)	—	0.004	2	0.002	—	—
TOTAL	—	1.302	10	—	—	R² = 0.969

Conclusions du Plan Factoriel 2³ — Décision

EFFETS PRINCIPAUX SIGNIFICATIFS : X1 ($p < 0.001$) et X2 ($p < 0.01$) sont fortement significatifs. X3 est marginalement significatif ($p = 0.07$).

INTERACTIONS : Aucune interaction d'ordre 2 n'est significative (toutes $p > 0.13$) — le modèle est additif.

ABSENCE DE MANQUE D'AJUSTEMENT : $p = 0.89$ confirme la linéarité dans la région explorée... mais le modèle 1er ordre est insuffisant pour localiser l'optimum.

DÉCISION : Les points centraux (R_s moyen = 2.21) > moyenne des angles ($R_s \approx 1.93$) → courbure significative détectée → NÉCESSITÉ D'UN PLAN DE SURFACE DE RÉPONSE (RSM).

ÉTAPE
3C

Plan de Surface de Réponse — Box-Behnken (3 Facteurs)

3C.1 Justification du Choix du Plan Box-Behnken

La courbure détectée dans le plan factoriel 2³ nécessite un modèle du second ordre pour localiser l'optimum. Deux options ont été évaluées :

Critère	Central Composite (CCD)	Box-Behnken (BBD)	Décision
Nbre d'essais (3 facteurs)	20 (+ axial + PC)	15 (12 + 3 PC)	BBD plus économique
Points axiaux	Oui (α = 1.682)	Non	BBD : pas de pts hors domaine
Rotatabilité	Rotatable	Quasi-rotatable	Équivalent pour 3 facteurs
Contraintes opérat.	Points axiaux hors limites	Tous pts dans le domaine	BBD préféré (contraintes pH)
Modèle estimable	$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ij} X_i X_j + \beta_{ii} X_i^2$	$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ij} X_i X_j + \beta_{ii} X_i^2$	Identique — modèle complet 2nd ordre

3C.2 Matrice Box-Behnken (15 Essais = 12 + 3 Points Centraux)

Facteurs : X1 = % ACN (5–20%), X2 = pH (2.5–4.5), X3 = Débit (0.8–1.2 mL/min). Facteurs fixes : Temp.=30°C, Vol.inj.=10µL, [Tampon]=20mM, λ=218nm.

N°	X1 %ACN	X2 pH	X3 Débit (mL/min)	Y1 Rs	Y2 Tf	Y3 N	Y4 tR (min)	Y5 RSD%	Ordre Random
1	5%	2.5	1.0	1.48	1.34	4820	16.2	1.22	7
2	20%	2.5	1.0	2.31	1.18	6240	10.8	0.87	12
3	5%	4.5	1.0	1.72	1.28	5140	14.9	1.08	3
4	20%	4.5	1.0	2.58	1.12	6890	9.4	0.74	9
5	5%	3.5	0.8	1.65	1.22	5620	18.4	0.94	15
6	20%	3.5	0.8	2.48	1.08	7120	11.6	0.68	5
7	5%	3.5	1.2	1.38	1.41	4990	13.8	1.18	1
8	20%	3.5	1.2	2.22	1.24	6580	8.9	0.82	11
9	12.5%	2.5	0.8	1.92	1.15	5980	13.2	0.79	8
10	12.5%	4.5	0.8	2.08	1.09	6340	12.8	0.72	4
11	12.5%	2.5	1.2	1.74	1.28	5760	10.6	0.91	13
12	12.5%	4.5	1.2	1.88	1.18	6120	10.1	0.84	6
PC1	12.5%	3.5	1.0	2.24	1.11	6680	11.4	0.71	2
PC2	12.5%	3.5	1.0	2.19	1.14	6720	11.2	0.68	10
PC3	12.5%	3.5	1.0	2.22	1.12	6700	11.3	0.73	14

ÉTAPE 5

Analyse des Résultats — Modèle RSM & Surface de Réponse

5.1 Équation du Modèle Polynomial du Second Ordre (Y1 — Résolution)

Après régression par MCO sur les 15 essais Box-Behnken :

$$\hat{Y}_1 (Rs) = 2.217 + 0.531 \cdot X1 + 0.188 \cdot X2 - 0.142 \cdot X3 + 0.042 \cdot X1 \cdot X2 - 0.038 \cdot X1 \cdot X3 - 0.012 \cdot X2 \cdot X3 - 0.089 \cdot X1^2 - 0.055 \cdot X2^2 + 0.018 \cdot X3^2$$

5.2 Validation du Modèle — ANOVA RSM

Source	SS	df	MS	F	p-valeur	Signif.
Modèle total	1.842	9	0.205	42.8	<0.0001	***
X1 (linéaire)	1.351	1	1.351	282.6	<0.0001	***
X2 (linéaire)	0.213	1	0.213	44.5	0.0006	***
X3 (linéaire)	0.121	1	0.121	25.3	0.0024	**
X1 ² (quadr.)	0.063	1	0.063	13.2	0.0110	*
X2 ² (quadr.)	0.024	1	0.024	5.0	0.0710	NS
X1·X2	0.018	1	0.018	3.8	0.1090	NS
Manque ajust.	0.008	3	0.003	0.6	0.6420	NS ✓
Erreur pure	0.014	2	0.005	—	—	—
TOTAL	1.864	14	—	—	—	R ² =0.988 R ² adj=0.963 Q ² =0.924

5.3 Vérification des Hypothèses du Modèle

Hypothèse	Test / Critère	Résultat
Normalité des résidus	Test Shapiro-Wilk (W=0.958, p=0.67)	VALIDÉE — résidus normaux
Homoscédasticité	Levene test (F=1.24, p=0.34)	VALIDÉE — variance constante
Absence autocorrél.	Durbin-Watson (DW=2.18)	VALIDÉE — pas d'autocorrélation
Absence outliers	Cook's D < 0.5 pour tous points	VALIDÉE — aucun outlier
Manque ajustement	p=0.642 >> 0.05	VALIDÉE — modèle adéquat

5.4 Optimum Prédit — Fonction de Désirabilité Globale

La fonction de désirabilité (Derringer-Suich) a été appliquée pour optimiser simultanément toutes les réponses avec leurs spécifications :

Réponse	Spécification	Optimum Prédit	IC 95%	Désirabilité (di)	Statut
Y1 — Rs	≥ 2.0	2.74	[2.58 ; 2.90]	d1 = 0.96	CONFORME ✓
Y2 — Tf	0.8 — 1.5	1.09	[1.02 ; 1.16]	d2 = 1.00	CONFORME ✓
Y3 — N	≥ 5000	7240	[6840 ; 7640]	d3 = 1.00	CONFORME ✓
Y4 — tR	8 — 15 min	9.6 min	[9.1 ; 10.1]	d4 = 0.98	CONFORME ✓
Y5 — RSD%	≤ 1.0 %	0.65 %	[0.58 ; 0.72]	d5 = 0.97	CONFORME ✓
DÉSIRABILITÉ GLOBALE D	—	—	—	D = 0.982	OPTIMAL ✓✓✓

CONDITIONS OPTIMALES IDENTIFIÉES PAR RSM
X1 — % ACN (Phase mobile B) : 18.5 % v/v
X2 — pH du tampon phosphate : 4.2
X3 — Débit de la phase mobile : 0.85 mL/min
Paramètres fixes : Température = 30°C Vol. injection = 10 µL [KH2PO4] = 20 mM λ = 218 nm

ÉTAPE 6

Validation & Implémentation

6.1 Essai de Confirmation — Conditions Optimales

Un essai de confirmation en 6 réplicats indépendants (n=6) a été réalisé dans les conditions optimales identifiées par le modèle RSM, sur 3 jours différents par 2 opérateurs distincts.

N°	Rs	Tf	N	tR (min)	RSD%	Opérateur	Jour	Statut
1	2.71	1.08	7180	9.5	0.62	Op.1	J1	✓
2	2.76	1.11	7310	9.7	0.67	Op.1	J1	✓
3	2.69	1.07	7090	9.6	0.71	Op.1	J2	✓
4	2.74	1.10	7240	9.6	0.64	Op.2	J2	✓
5	2.78	1.09	7380	9.8	0.59	Op.2	J3	✓
6	2.72	1.12	7160	9.5	0.69	Op.2	J3	✓
Moyenne	2.733	1.095	7227	9.62	0.653	—	—	—
RSD% inter-jour	—	—	—	—	—	—	0.46%	< 2% ✓
Prédit (modèle)	2.74	1.09	7240	9.6	0.65	—	—	—
Biais (mesur.-prédit)	+0.2%	+0.5%	-0.2%	+0.2%	+0.5%	—	—	EXCELLENT ✓

6.2 Comparaison Avant / Après Optimisation

Paramètre	Méthode Initiale	Méthode Optimisée	Critère ICH	Amélioration
Résolution Rs	1.65 (insuffisant)	2.73 (excellent)	≥ 2.0	+65% ↑
Facteur de traînée Tf	1.48 (limite)	1.10 (excellent)	0.8 – 1.5	Optimisé ✓
Efficacité N	3800 (< limite)	7227 (excellent)	≥ 5000	+90% ↑↑
Temps analyse tR	22.4 min (long)	9.6 min (optimal)	8 – 15 min	-57% ↓↓
Variabilité RSD%	2.1 % (hors spec.)	0.65 % (conforme)	≤ 1.0 %	-69% ↓↓↓

6.3 Plan d'Actions Post-Optimisation

#	Action	Responsable	Délai	Statut
1	Mise à jour de la méthode HPLC (SOP-HPLC-002)	Dr. Bensalem / QC	S1	EN COURS
2	Formation des opérateurs à la nouvelle méthode	Responsable QC	S2	PLANIFIÉ
3	Revalidation complète ICH Q2(R1) — 6 critères	Labo Analytique	S3-S6	PLANIFIÉ

#	Action	Responsable	Délai	Statut
4	Mise en place cartes de contrôle Shewhart (tR, Rs)	Chef de laboratoire	S4	PLANIFIÉ
5	Bilan économique (gain productivité, consommables)	Directeur QC	S6	PLANIFIÉ
6	Rapport final DOE — archivage DMS	Dr. Bensalem	S7	PLANIFIÉ

6.4 Suivi Statistique Post-Implémentation — Cartes de Contrôle

Les paramètres critiques (Rs et tR) seront surveillés en continu par cartes de contrôle Shewhart avec les limites suivantes :

Paramètre	Centre (CL)	LCL (-3σ)	UCL ($+3\sigma$)	Spécif. Critique	Fréquence
Résolution Rs	2.73	2.40	3.06	$Rs \geq 2.0$	Chaque série
Temps de rétention tR	9.62 min	9.20 min	10.04 min	8–15 min	Chaque série
RSD% aire pic	0.65 %	0.40 %	0.90 %	$\leq 1.0 \%$	Chaque serie

SYNTHÈSE

Récapitulatif de la Démarche DOE Complète

Phase DOE	Plan Utilisé	Nb Essais	Facteurs Étudiés	Résultat
Criblage	Plackett-Burman (PB12)	12 essais	7 facteurs → 3 retenus	X4,X5,X6,X7 éliminés
Factorial	2 ³ + 3 PC (11 essais)	11 essais	3 facteurs, 7 effets	Courbure → RSM nécessaire
Optimisation	Box-Behnken (BBD)	15 essais	3 facteurs, 5 réponses	Optimum localisé D=0.982
Validation	Confirmatory runs (n=6)	6 réplicats	Conditions optimales	Biais <1% — Validé ICH
TOTAL ESSAIS	—	44 essais	vs 128 (2 ⁷ complet)	Gain : -66% d'essais

La démarche DOE structurée en 3 phases séquentielles (criblage → factorial → RSM) a permis d'identifier les conditions optimales de la méthode HPLC avec seulement 44 essais au lieu de 128 pour un plan complet. La méthode optimisée présente une résolution $R_s = 2.73$ (vs 1.65 initialement), un temps d'analyse réduit de 57% et une variabilité réduite de 69%. La validation ICH Q2(R1) est planifiée pour confirmer définitivement la méthode avant implémentation en production.