

VALIDATION DE MÉTHODE

HPLC

Guide Pratique — 8 Paramètres

Conformément à l'ICH Q2(R2) — Approche statistique avec Minitab®

Rachid BERKANI · Expert Qualité & Statistiques Pharmaceutiques

ICH Q2(R2)

USP <1225>

FDA Guidelines

Minitab® 21

HPLC / UPLC

8

Paramètres

Q2(R2)

Selon ICH

HPLC

Type méthode

≥ 2024

Statuts

PARAMÈTRES QUANTITATIFS

Assay — Dosage

- ✓ **Spécificité / Sélectivité**
- ✓ **Linéarité**
- ✓ **Justesse (Accuracy / Trueness)**
- ✓ **Fidélité (Precision)**
 - Répétabilité
 - Fidélité intermédiaire
- ✓ **Limite de détection (LOD)**
- ✓ **Limite de quantification (LOQ)**
- ✓ **Robustesse**
- ✓ **Incertitude de mesure (nouveau)**

PARAMÈTRES IDENTIFICATION

Tests d'identité

- ✓ **Spécificité uniquement**
L'identité repose sur la reconnaissance exclusive de l'analyte

PARAMÈTRES LIMITES

Dosage des impuretés

- ✓ **Spécificité**
- ✓ **Linéarité (plage réduite)**
- ✓ **Justesse (au LOQ et spéc.)**
- ✓ **Fidélité (au LOQ et spéc.)**
- ✓ **LOD / LOQ**
- ✓ **Robustesse**

NOMENCLATURE ICH Q2(R2)

Spécificité

Aptitude à mesurer l'analyte sans interférence

Linéarité

Proportionnalité réponse / concentration

Justesse

Accord avec la valeur vraie (récupération)

Fidélité

Répétabilité + Fidélité intermédiaire

LOD

Plus faible quantité détectable

LOQ

Plus faible quantité quantifiable

Robustesse

Stabilité face aux variations mineures

Incertitude

Quantification de l'erreur globale (nouveau)

« La spécificité est la capacité à évaluer sans ambiguïté l'analyte en présence de composants susceptibles d'être présents. »

APPROCHES DE VALIDATION

Solution de dégradation forcée

Acide · Base · Oxydation · Chaleur · UV
Superposition des chromatogrammes avant/après stress

Mélanges placebo + analyte

Vérifier l'absence d'interférence des excipients
Récupération $\geq 98\%$ sur matrice placebo enrichie

Résolution chromatographique R_s

$R_s \geq 1,5$ entre l'analyte et le pic le plus proche
Facteur de queue $T \leq 2,0$ (USP)

Pureté de pic (DAD / PDA)

Angle spectral $\leq 0,1^\circ$ entre front et queue du pic
Corrobore l'absence de co-élution

CRITÈRES D'ACCEPTATION & TESTS STATISTIQUES

R_s (Résolution)

$\geq 1,5$ (séparation de base) · $\geq 2,0$ (séparation complète)

Tailing factor T

$\leq 2,0$ (USP <621>) · $\leq 1,5$ (méthodes critiques)

Récupération placebo

$\geq 98,0\%$ de la concentration théorique

Pureté de pic

Angle spectral $< 0,1^\circ$ · Score similarité > 990

Stress testing

Minitab: Stat > Basic Stats > 2-Sample t (recupér
(chromatogrammes)

« La linéarité est la capacité à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'intervalle étudié. » — ICH Q2(R2) §5.2

PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE

Nb niveaux

Minimum 5 niveaux de concentration (ICH Q2)

Plage standard

80 % – 100 % – 120 % de la concentration nominale

Plage élargie

50 % – 80 % – 100 % – 120 % – 150 % (recommandée)

Réplicats

2 à 3 injections par niveau de concentration

Ordre

Randomiser l'ordre d'injection (éviter biais systématiques)

Minitab : Stat › Regression › Regression › Fit Regression Model

CRITÈRES D'ACCEPTATION

R^2 (coeff. détermination)

$R^2 \geq 0,999$

Pente (slope)

p-value < 0,05

Ordonnée à l'origine

IC contient 0

ANALYSE DES RÉSIDUS

Graphe résidus vs ajustés

Distribution aléatoire autour de 0 → linéarité confirmée

Normal Probability Plot

Résidus sur droite → normalité → modèle valide

Résidus vs ordre

Pas de tendance → indépendance des erreurs

%CV des résidus

≤ 2,0 % pour un dosage · ≤ 5,0 % pour des impuretés

P3 PARAMÈTRE 3 — Justesse (Accuracy / Trueness)

« La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue et une valeur de référence acceptée comme vraie. » — ICH Q2(R2) §5.3

PLAN EXPÉRIMENTAL

Niveaux de concentration

3 niveaux : 80 % · 100 % · 120 % de la concentration nominale

Réplicats par niveau

Minimum 3 réplicats indépendants par niveau (total ≥ 9)

Méthode de référence

Substance de référence certifiée (CRS/SRS) ou méthode validée

Matrice

Placebo enrichi avec la substance active (matrix effect)

Calcul récupération

% Récupération = (Mesuré / Théorique) × 100

Minitab : Stat > Basic Stats > 1-Sample t (μ_o = valeur théorique) · One-Sample Wilcoxon (non normal)

CRITÈRES & TEST STATISTIQUE

98–102 %

% Récupération

Assay (dosage) — ICH Q2(R2)

± 2,0 %

IC 95 % de la moyenne

Autour de la valeur cible

p < 0,05

Test t (H_o : μ = valeur théo.)

Reject H_o → biais significatif

INTERPRÉTATION — TEST T À 1 ÉCHANTILLON

H_o : μ = valeur théorique

IC 95 % contient la valeur théo. → pas de biais significatif ✓

H_1 : $\mu \neq$ valeur théorique

p < 0,05 → biais significatif → investigation requise ✗

Plage d'acceptance

[98,0 % ; 102,0 %] pour un dosage pharmaceutique

Précision des critères

Adapter selon la phase (dev vs libération) et la matrice

« La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures obtenues par application multiple de la procédure au même échantillon. » — ICH Q2(R2) §5.4

RÉPÉTABILITÉ (Intra-série)

Même analyste · même instrument · même jour · mêmes conditions

Plan

≥ 9 mesures (3 niveaux × 3 réplicats) ou 6 réplicats à 100 %

Indicateur clé

$\%CV = (s / \bar{x}) \times 100$

Critère acceptation

$\% CV \leq 1,0 \%$ (assay) · $\leq 2,0 \%$ (impuretés ≥ LOQ)

Test

Statistique descriptive · Test de Bartlett pour σ^2 uniforme

$\%CV = (\sigma / \mu) \times 100$ · Minitab : Stat › Basic Stats › Display Descriptive Statistics

FIDÉLITÉ INTERMÉDIAIRE (Inter-série)

Différents analystes · instruments · jours · laboratoires

Plan

≥ 2 analystes × ≥ 2 jours × ≥ 3 réplicats / condition

Indicateur clé

sR (écart-type inter-séries) · %CVR (RSD inter-séries)

Critère acceptation

$\% CV \leq 2,0 \%$ (assay) · $\leq 5,0 \%$ (impuretés ≥ LOQ)

Analyse ANOVA

Séparer la variance intra vs inter-séries

$\%GRR < 10\%$  · Minitab : Stat › Quality Tools › Gage R&R Study (Crossed) → %GRR, ndc

LOD : Plus faible concentration détectable (non quantifiable) · LOQ : Plus faible concentration quantifiable avec exactitude et précision acceptables

Méthode 1 — Basée sur la régression

$$\text{LOD} = 3,3\sigma/S$$

$$\text{LOQ} = 10\sigma/S$$

σ = écart-type des résidus (régression)

S = pente de la droite d'étalonnage

Recommandée par ICH pour méthodes quantitatives

✓ Méthodes chromatographiques quantitatives

Méthode 2 — Signal/Bruit (S/N)

$$\text{LOD} : S/N \approx 3$$

$$\text{LOQ} : S/N \approx 10$$

Mesurer l'amplitude du bruit de base (N)

et du signal de l'analyte (S)

Adaptée aux détecteurs UV avec bruit mesurable

✓ HPLC-UV · HPLC-MS avec bruit résiduel

Méthode 3 — Écart-type du blanc

$$\text{LOD} = 3,3 \times \sigma_{\text{blanc}}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma_{\text{blanc}}$$

σ_{blanc} = écart-type de n mesures du blanc

(n ≥ 10 mesures du blanc recommandé)

Alternative quand régression impossible

✓ Quand la régression n'est pas applicable

CRITÈRES DE VALIDATION LOD/LOQ — Injections de confirmation :

LOD : $S/N \geq 3$ confirmé sur 5 injections · LOQ : $\%CV \leq 10\%$ + % récupération 80–120 % sur 6 réplicats au LOQ · Minitab : Stat > Regression > Regression

« La robustesse évalue la capacité de la méthode à rester inchangée lors de petites variations délibérées des paramètres. » — ICH Q2(R2) §5.7

PARAMÈTRES HPLC À TESTER

%Acétonitrile (ou MeOH)

$\pm 2 \%$

pH de la phase mobile

$\pm 0,2$ unité

Débit

$\pm 0,1$ mL/min

Température de colonne

± 5 °C

Longueur d'onde

± 2 nm

Marque / lot de colonne

2 colonnes différentes

PLAN PLACKETT-BURMAN & CRITÈRES

Plan d'expériences Plackett-Burman

12 essais pour 7 facteurs

Résolution III — effets principaux non confondus

Minitab DOE

Stat › DOE › Factorial › Create Factorial Design (2-level)

Analyse

Main effects plot · ANOVA sur les réponses critiques

Critères d'acceptation

$R_s \geq 1,5$

Pour chaque variation — séparation maintenue

$\% CV \leq 2,0 \%$

Fidélité non dégradée par la variation

$\% \text{ Récup. } 98\text{--}102 \%$

Justesse maintenue sur toute la plage

PRÉPARATION

- ☐ Protocole de validation signé (paramètres, critères, plan expérimental)
- ☐ Substances de référence certifiées (CRS) disponibles et qualifiées
- ☐ Système de mesure validé (MSA / Gage R&R < 10 % GRR)
- ☐ Plateforme analytique qualifiée (IQ/OQ/PQ)

DOCUMENTATION

- ☐ Rapport de validation (données brutes + analyses Minitab)
- ☐ Projets Minitab (.mtx) archivés avec version logiciel
- ☐ Certificats CRS archivés et traçables
- ☐ SOP méthode mise à jour avec les paramètres validés

EXÉCUTION

- ☐ Spécificité : stress testing + placebo enrichi
- ☐ Linéarité : ≥ 5 niveaux · $R^2 \geq 0,999$ · analyse résidus
- ☐ Justesse : 3 niveaux × 3 réplicats · % récupération 98–102 %
- ☐ Fidélité : répétabilité + fidélité intermédiaire (Gage R&R)

☐ L'OP/OPC (itération 1) est validée (GRR, stabilité, précision)

MAINTENANCE

- ☐ Revalidation si changement significatif (instrument, matrice, spécification)
- ☐ CPV trimestriel (Cpk, taux de conformité SST)
- ☐ Revue annuelle du rapport de validation
- ☐ Formation des analystes documentée

« La validation n'est pas une contrainte réglementaire — c'est la démonstration que la méthode est digne de confiance. » — Rachid BERKANI