

Application du Quality-by-Design à l'analyse pharmaceutique

Développement d'une méthode UHPLC-
DAD pour l'analyse multi-produits

FEREY L.¹, **RAIMBAULT A.**¹, **RIVALS I.**², **GAUDIN K.**¹

¹Equipe ChemBioPharm – ARNA INSERM U1212 / UMR CNRS 5320

²Equipe de Statistique Appliquée, ESPCI Paris, UMRS 1158, Paris

Quality-By-Design (QbD)



- **Texte réglementaire ICH Q8 (R2)**

- **approche systématique** basée sur les plans d'expériences
- **meilleure compréhension et maîtrise des procédés**

➔ bonne pratique du développement pharmaceutique



Quality-By-Design (QbD)



■ Texte réglementaire ICH Q8 (R2)

- **approche systématique** basée sur les plans d'expériences
- **meilleure compréhension et maîtrise des procédés**

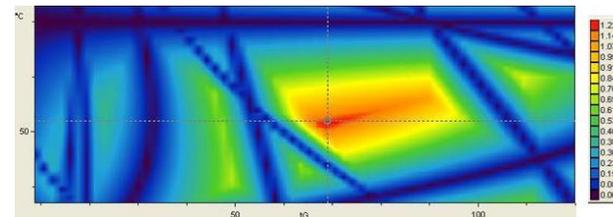
➔ **bonne pratique du développement pharmaceutique**



■ Méthodes analytiques

- doivent fournir des **résultats fiables** tout au long du développement d'un médicament

➔ **objectif du QbD : détermination d'une zone de robustesse = design space (DS)**



Contexte et objectif de l'étude

■ Collaboration industrielle avec ITEC Services

- repositionnement pharmaceutique de substances actives
- mode d'administration par voie gingivo jugale (Buccal Per Mucous, BPM[®]) alternatif à la voie intraveineuse
- études de la solubilité des molécules dans des solutions hydroéthanoliques



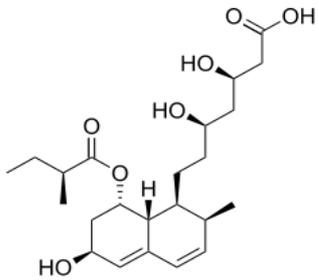
solutions hydroéthanoliques
(35-45% EtOH)

■ Analytical Target Profile (ATP)

- méthode chromatographique rapide, spécifique et robuste pour le criblage (séparation) des différentes substances actives

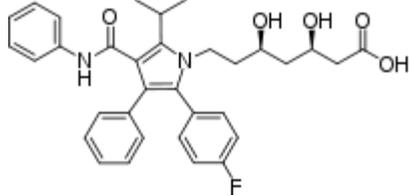
Molécules étudiées

Acides



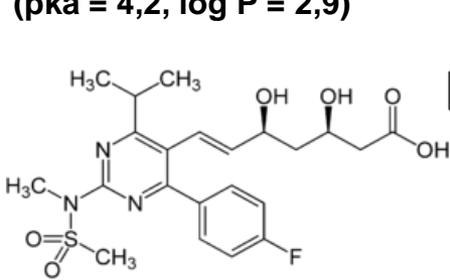
Pravastatine

(pka = 4,2, log P = 2,9)



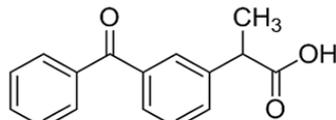
Atorvastatine

(pka = 4,3, log P = 5,4)



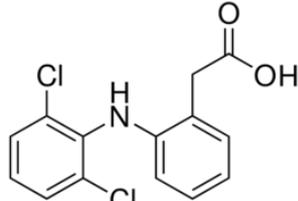
Rosuvastatine

(pka = 4,0, log P = 1,9)



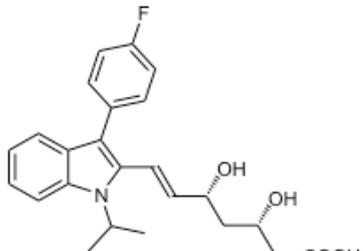
Kétoprofène

(pka = 4,5, log P = 3,1)



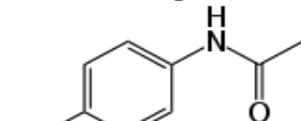
Diclofénac

(pka = 4,2, log P = 4,3)



Fluvastatine

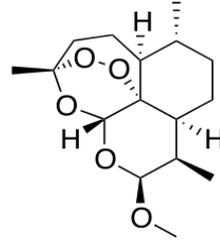
(pka = 4,6, log P = 3,8)



Paracétamol

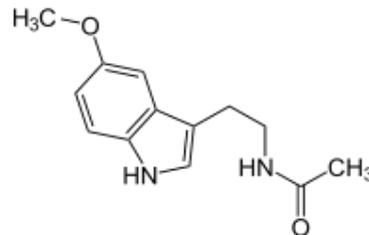
(pka = 9,4, log P = 0,5)

Neutres



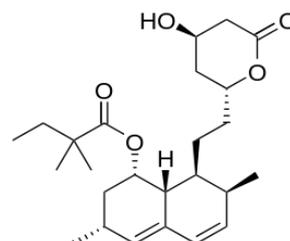
Artéméter

(log P = 3,0)



Mélatonine

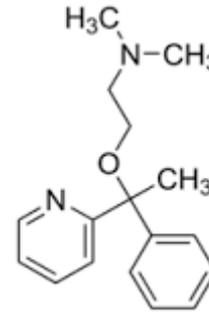
(log P = 1,2)



Simvastatine

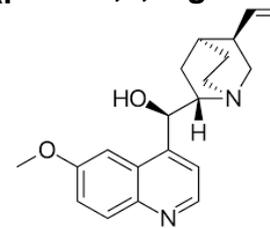
(log P = 4,5)

Bases



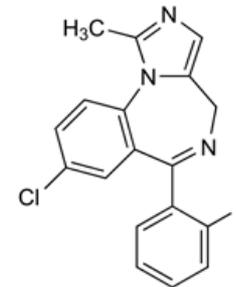
Doxylamine

(pka = 8,9, log P = 3,0)



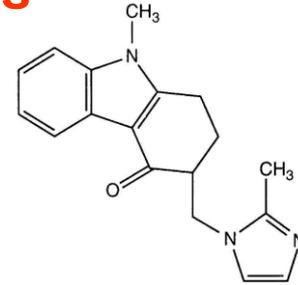
Quinine

(pka = 9,1, log P = 2,5)



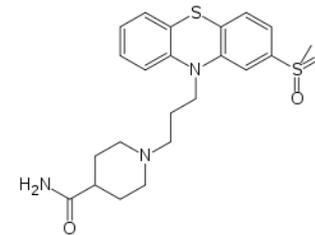
Midazolam

(pka = 6,6, log P = 3,3)



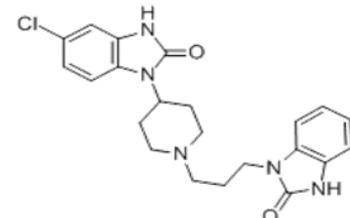
Ondansétron

(pka = 7,3, log P = 2,4)



Métopimazine

(pka = 8,4, log P = 3,3)



Dompéridone

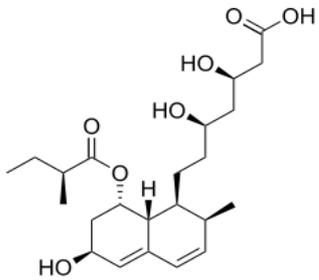
(pka = 7,0, log P = 2,9)

Molécules étudiées

Acides

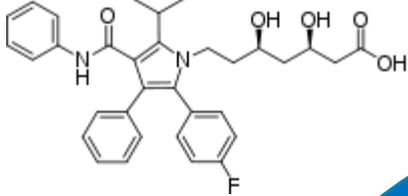
Neutres

Bases



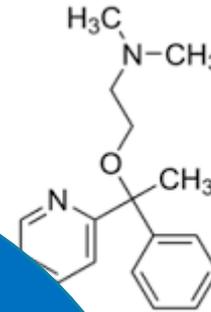
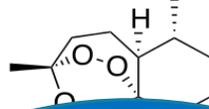
Pravastatine

(pka = 4,2, log P = 2,9)



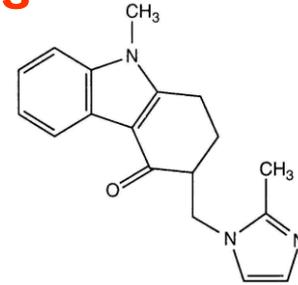
Atorvastatine

(pka = 4,3, log P = 2,9)



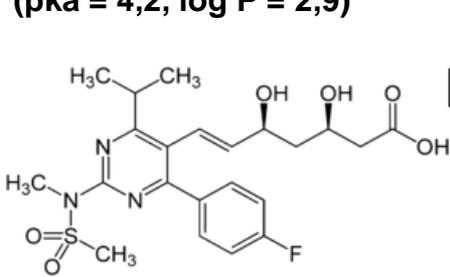
Pyramine

(pka = 7,3, log P = 3,0)



Ondansétron

(pka = 7,3, log P = 2,4)

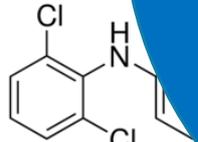


Kétorolac

(pka = 4,0, log P = 1,9)

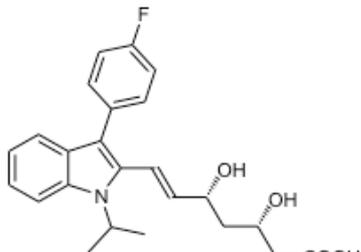
Rosuvastatine

(pka = 4,0, log P = 1,9)



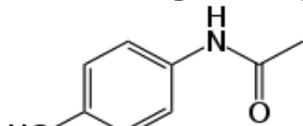
Diclofénac

(pka = 4,2, log P = 4,3)



Fluvastatine

(pka = 4,6, log P = 3,8)



Paracétamol

(pka = 9,4, log P = 0,5)



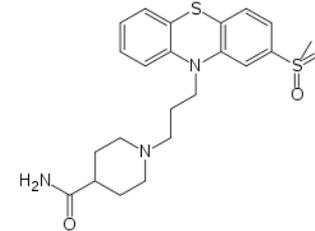
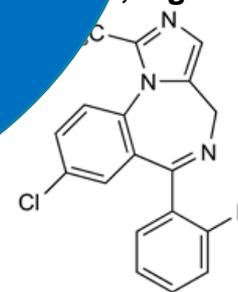
Simvastatine

(log P = 4,5)



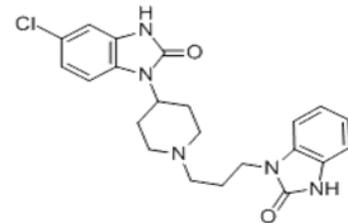
Midazolam

(pka = 6,6, log P = 3,3)



Métopimazine

(pka = 8,4, log P = 3,3)



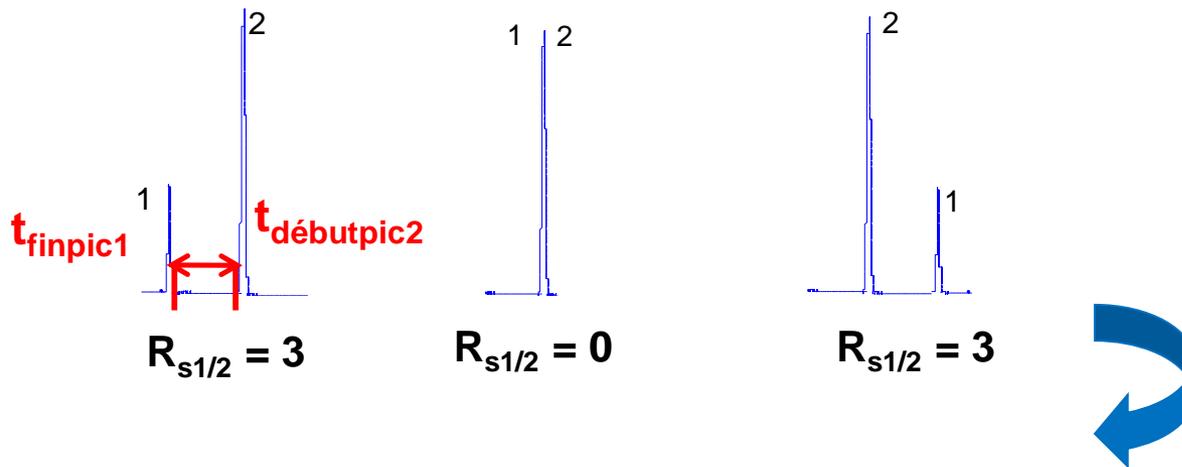
Dompéridone

(pka = 7,0, log P = 2,9)

Utilisation de l'approche QbD

Critical Quality Attributes (CQAs)

- Réponses représentatives de la qualité de la séparation entre les pics
 - différences de temps entre les pics ou résolutions (R_s)
- En cas d'inversion de l'ordre d'éluion des pics



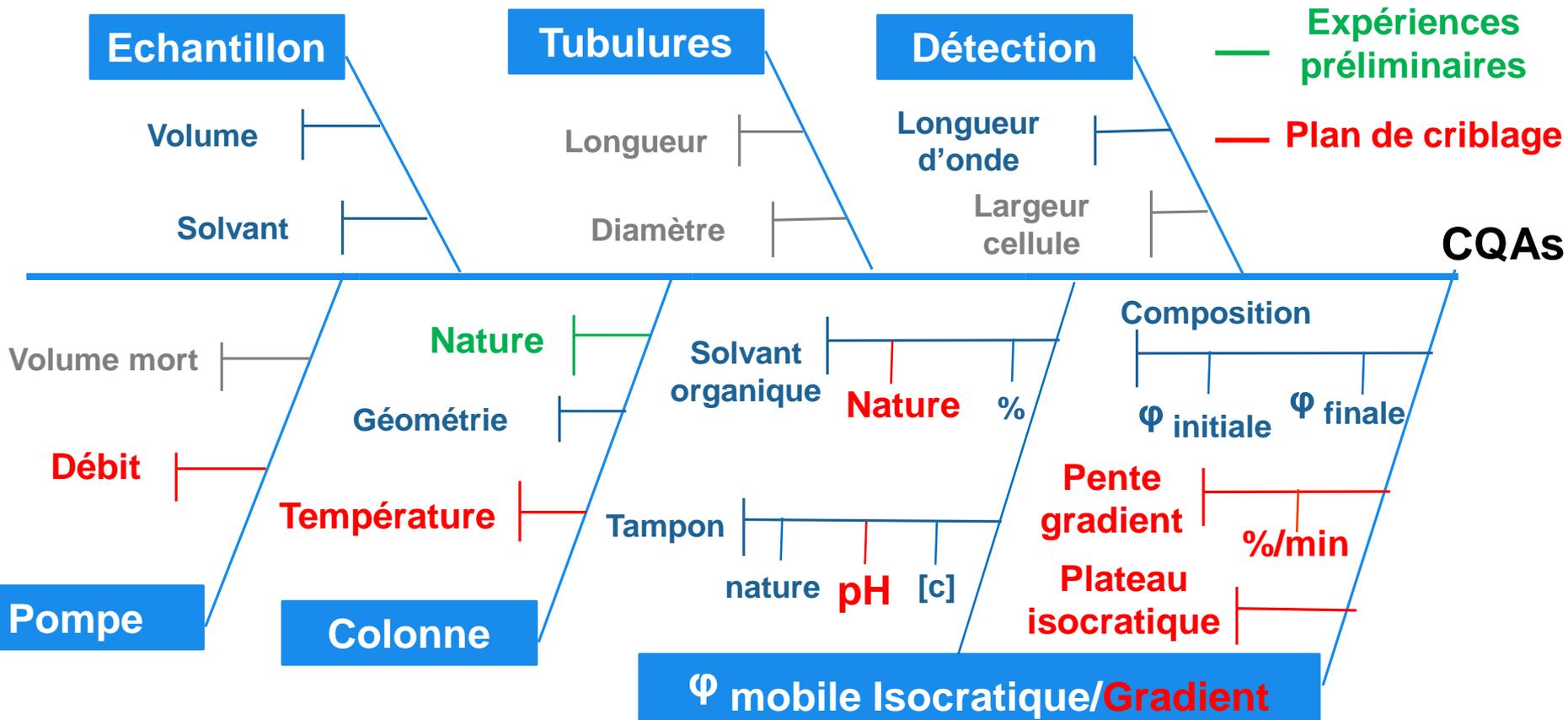
Résolutions (R_s) = fonctions non-monotones

- Critère S = différences de temps entre les pics ($t_{\text{débutpic2}} - t_{\text{finpic1}}$)

Critical Process Parameters (CPPs)

- Paramètres critiques qui impactent les CQAs

- déterminés par analyse de risque et par des plans de criblages



Plan de criblage

■ Plackett-Burman :

- modèle mathématique du 1^{er} degré

$$y = a_0 + \sum a_i x_i$$

- objectif : identifier les facteurs qui ont un impact significatif sur la symétrie, la rétention des pics et le critère S
- solvants organiques : ACN et EtOH

Niveau	pH	Pente gradient (%/min)	Température (°C)	Débit (mL/min)	Plateau isocratique (µL)
-1	2,6	2,0	15,0	0,5	500
+1	6,7	5,0	40,0	0,8 (EtOH) 1,0 (ACN)	1000

- 24 expériences (12 conditions testées par solvant organique)

Diagrammes des effets (Pareto)

ACN

EtOH

➤ t_R ($R^2 : 0,95 - 0,99$)

Terme	Estimation	t ratio	Prob. > t
Pente	-5,033167	-26,92	<,0001*
Débit	-1,348833	-7,21	0,0004*
pH	-1,274333	-6,82	0,0005*
Plateau	0,2981667	1,59	0,1619
Température	-0,219833	-1,18	0,2842

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > débit (-) > pH (-)
Bases : pente gradient (-) > pH (+) > débit (-)
Neutres : pente gradient (-) > débit (-)

Diagrammes des effets (Pareto)

ACN

EtOH

➤ t_R ($R^2 : 0,95 - 0,99$)

Terme	Estimation	t ratio	Prob. > t
Pente	-5,033167	-26,92	<,0001*
Débit	-1,348833	-7,21	0,0004*
pH	-1,274333	-6,82	0,0005*
Plateau	0,2981667	1,59	0,1619
Température	-0,219833	-1,18	0,2842

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > débit (-) > pH (-)
Bases : pente gradient (-) > pH (+) > débit (-)
Neutres : pente gradient (-) > débit (-)

Diagrammes des effets (Pareto)

ACN

EtOH

➤ **t_R** (R² : 0,95 – 0,99)

Terme	Estimation	t ratio	Prob. > t
Pente	-5,033167	-26,92	<,0001*
Débit	-1,348833	-7,21	0,0004*
pH	-1,274333	-6,82	0,0005*
Plateau	0,2981667	1,59	0,1619
Température	-0,219833	-1,18	0,2842

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > débit (-) > pH (-)
Bases : pente gradient (-) > pH (+) > débit (-)
Neutres : pente gradient (-) > débit (-)

➤ **As** (R² : 0,41 – 0,99)

➤ **Critère S** (R² : 0,91 – 0,99)

pH > pente gradient

Diagrammes des effets (Pareto)

ACN

➤ **tr** ($R^2 : 0,95 - 0,99$)

Terme	Estimation	t ratio	Prob. > t
Pente	-5,033167	-26,92	<,0001*
Débit	-1,348833	-7,21	0,0004*
pH	-1,274333	-6,82	0,0005*
Plateau	0,2981667	1,59	0,1619
Température	-0,219833	-1,18	0,2842

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > débit (-) > pH (-)
 Bases : pente gradient (-) > pH (+) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-)

EtOH

➤ **tr** ($R^2 : 0,93 - 0,99$)

Terme	Estimation	Erreur standard	t ratio	Prob. > t
Pente	-6,556167	0,220635	-29,71	<,0001*
Température	-1,191167	0,220635	-5,40	0,0017*
pH	-0,990833	0,220635	-4,49	0,0041*
Débit	-0,905	0,220635	-4,10	0,0063*
Plateau	0,4895	0,220635	2,22	0,0683

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > T°C (-) > pH (-)
 Bases : pH (+) > pente gradient (-) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-) > T°C (-)

➤ **As** ($R^2 : 0,41 - 0,99$)

➤ **Critère S** ($R^2 : 0,91 - 0,99$)

pH > pente gradient

Diagrammes des effets (Pareto)

ACN

➤ **tr** ($R^2 : 0,95 - 0,99$)

Terme	Estimation	t ratio	Prob. > t
Pente	-5,033167	-26,92	<,0001*
Débit	-1,348833	-7,21	0,0004*
pH	-1,274333	-6,82	0,0005*
Plateau	0,2981667	1,59	0,1619
Température	-0,219833	-1,18	0,2842

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > débit (-) > pH (-)
 Bases : pente gradient (-) > pH (+) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-)

EtOH

➤ **tr** ($R^2 : 0,93 - 0,99$)

Terme	Estimation	Erreur standard	t ratio	Prob. > t
Pente	-6,556167	0,220635	-29,71	<,0001*
Température	-1,191167	0,220635	-5,40	0,0017*
pH	-0,990833	0,220635	-4,49	0,0041*
Debit	-0,905	0,220635	-4,10	0,0063*
Plateau	0,4895	0,220635	2,22	0,0683

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > T°C (-) > pH (-)
 Bases : pH (+) > pente gradient (-) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-) > T°C (-)

➤ **As** ($R^2 : 0,41 - 0,99$)

➤ **Critère S** ($R^2 : 0,91 - 0,99$)

pH > pente gradient

Diagrammes des effets (Pareto)

ACN

➤ **tr** ($R^2 : 0,95 - 0,99$)

Terme	Estimation	t ratio	Prob. > t
Pente	-5,033167	-26,92	<,0001*
Débit	-1,348833	-7,21	0,0004*
pH	-1,274333	-6,82	0,0005*
Plateau	0,2981667	1,59	0,1619
Température	-0,219833	-1,18	0,2842

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > débit (-) > pH (-)
 Bases : pente gradient (-) > pH (+) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-)

➤ **As** ($R^2 : 0,41 - 0,99$)

➤ **Critère S** ($R^2 : 0,91 - 0,99$)

pH > pente gradient

EtOH

➤ **tr** ($R^2 : 0,93 - 0,99$)

Terme	Estimation	Erreur standard	t ratio	Prob. > t
Pente	-6,556167	0,220635	-29,71	<,0001*
Température	-1,191167	0,220635	-5,40	0,0017*
pH	-0,990833	0,220635	-4,49	0,0041*
Debit	-0,905	0,220635	-4,10	0,0063*
Plateau	0,4895	0,220635	2,22	0,0683

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > T°C (-) > pH (-)
 Bases : pH (+) > pente gradient (-) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-) > T°C (-)

➤ **As** ($R^2 : 0,10 - 0,98$)

pH > T°C

Diagrammes des effets (Pareto)

ACN

➤ **tr** ($R^2 : 0,95 - 0,99$)

Terme	Estimation	t ratio	Prob. > t
Pente	-5,033167	-26,92	<,0001*
Débit	-1,348833	-7,21	0,0004*
pH	-1,274333	-6,82	0,0005*
Plateau	0,2981667	1,59	0,1619
Température	-0,219833	-1,18	0,2842

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > débit (-) > pH (-)
 Bases : pente gradient (-) > pH (+) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-)

- **As** ($R^2 : 0,41 - 0,99$)
- **Critère S** ($R^2 : 0,91 - 0,99$)

pH > pente gradient

EtOH

➤ **tr** ($R^2 : 0,93 - 0,99$)

Terme	Estimation	Erreur standard	t ratio	Prob. > t
Pente	-6,556167	0,220635	-29,71	<,0001*
Température	-1,191167	0,220635	-5,40	0,0017*
pH	-0,990833	0,220635	-4,49	0,0041*
Debit	-0,905	0,220635	-4,10	0,0063*
Plateau	0,4895	0,220635	2,22	0,0683

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > T°C (-) > pH (-)
 Bases : pH (+) > pente gradient (-) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-) > T°C (-)

- **As** ($R^2 : 0,10 - 0,98$)
- **Critère S** ($R^2 : 0,90 - 0,97$)

pH > T°C

pH > pente gradient > T°C

Diagrammes des effets (Pareto)

ACN

➤ **t_R** (R² : 0,95 – 0,99)

Terme	Estimation	t ratio	Prob. > t
Pente	-5,033167	-26,92	<,0001*
Débit	-1,348833	-7,21	0,0004*
pH	-1,274333	-6,82	0,0005*
Plateau	0,2981667	1,59	0,1619
Température	-0,219833	-1,18	0,2842

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > débit (-) > pH (-)
 Bases : pente gradient (-) > pH (+) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-)

- **As** (R² : 0,41 – 0,99)
- **Critère S** (R² : 0,91 – 0,99)

pH > pente gradient

➔ 3 CPPs

Pente gradient / Débit / pH

EtOH

➤ **t_R** (R² : 0,93 – 0,99)

Terme	Estimation	Erreur standard	t ratio	Prob. > t
Pente	-6,556167	0,220635	-29,71	<,0001*
Température	-1,191167	0,220635	-5,40	0,0017*
pH	-0,990833	0,220635	-4,49	0,0041*
Debit	-0,905	0,220635	-4,10	0,0063*
Plateau	0,4895	0,220635	2,22	0,0683

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > T°C (-) > pH (-)
 Bases : pH (+) > pente gradient (-) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-) > T°C (-)

- **As** (R² : 0,10 – 0,98)

pH > T°C

- **Critère S** (R² : 0,90 – 0,97)

pH > pente gradient > T°C

Diagrammes des effets (Pareto)

ACN

➤ **t_R** (R² : 0,95 – 0,99)

Terme	Estimation	t ratio	Prob. > t
Pente	-5,033167	-26,92	<,0001*
Débit	-1,348833	-7,21	0,0004*
pH	-1,274333	-6,82	0,0005*
Plateau	0,2981667	1,59	0,1619
Température	-0,219833	-1,18	0,2842

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > débit (-) > pH (-)
 Bases : pente gradient (-) > pH (+) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-)

- **As** (R² : 0,41 – 0,99)
- **Critère S** (R² : 0,91 – 0,99)

pH > pente gradient

➔ 3 CPPs

Pente gradient / Débit / pH

EtOH

➤ **t_R** (R² : 0,93 – 0,99)

Terme	Estimation	Erreur standard	t ratio	Prob. > t
Pente	-6,556167	0,2220635	-29,71	<,0001*
Température	-1,191167	0,2220635	-5,40	0,0017*
pH	-0,990833	0,2220635	-4,49	0,0041*
Debit	-0,905	0,2220635	-4,10	0,0063*
Plateau	0,4895	0,2220635	2,22	0,0683

Fluvastatine

Acides : pente gradient (-) > T°C (-) > pH (-)
 Bases : pH (+) > pente gradient (-) > débit (-)
 Neutres : pente gradient (-) > débit (-) > T°C (-)

- **As** (R² : 0,10 – 0,98)

pH > T°C

- **Critère S** (R² : 0,90 – 0,97)

pH > pente gradient > T°C

➔ 3 CPPs

Pente gradient / pH / T°C

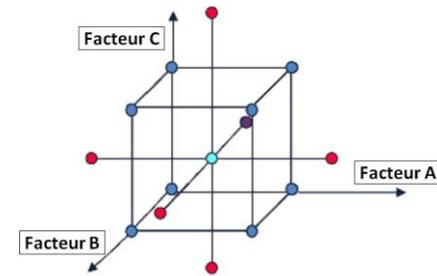
Plan d'optimisation

■ Composite centré :

➤ modèle mathématique du 2nd degré

$$y(X_{1 \leq i \leq 4}) = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=2}^4 \sum_{j=1}^{i-1} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

➤ objectifs : modéliser les courbes pour surface de réponses ; détermination de l'optimum et d'un design space



Niveau	Pente gradient (%/min)	pH	Débit (mL/min) (ACN)	Température (°C) (EtOH)
$-\alpha$	2,0	2,6	0,5	15,0
-1	2,6	3,8	0,7	20,1
0	3,5	5,6	1,0	27,5
+1	4,4	7,4	1,3	34,9
$+\alpha$	5,0	8,6	1,5	40,0

➤ 40 expériences (pour chaque solvant : 14 conditions testées et 6 répétitions au centre du domaine)

Stratégie d'optimisation

- **Ordre d'élution des pics fonction des conditions expérimentales**
 - **modélisation des temps de début et de fin des 16 pics**
 - **évaluation systématique des Δt entre tous les couples de pics possibles dans l'espace expérimental 3D**

Stratégie d'optimisation

- **Ordre d'élu­tion des pics fonction des conditions expérimentales**
 - **modélisation des temps de début et de fin des 16 pics**
 - **évaluation systématique des Δt entre tous les couples de pics possibles dans l'espace expérimental 3D**



**Maillage du domaine
expérimental 3D en
17x17x17 cubes
élémentaires
(4913 conditions)**

Stratégie d'optimisation

- **Ordre d'éluion des pics fonction des conditions expérimentales**
 - **modélisation des temps de début et de fin des 16 pics**
 - **évaluation systématique des Δt entre tous les couples de pics possibles dans l'espace expérimental 3D**

**Maillage du domaine
expérimental 3D en
17x17x17 cubes
élémentaires
(4913 conditions)**

**Estimation des Δt entre
les 120 couples de pics
possibles pour chaque
condition
(589560 valeurs)**

Stratégie d'optimisation

- **Ordre d'éluion des pics fonction des conditions expérimentales**
 - **modélisation des temps de début et de fin des 16 pics**
 - **évaluation systématique des Δt entre tous les couples de pics possibles dans l'espace expérimental 3D**

Maillage du domaine expérimental 3D en 17x17x17 cubes élémentaires (4913 conditions)

Estimation des Δt entre les 120 couples de pics possibles pour chaque condition (589560 valeurs)

Conditions où la séparation est prédite => analyse de la désirabilité sur l'intervalle de temps minimum

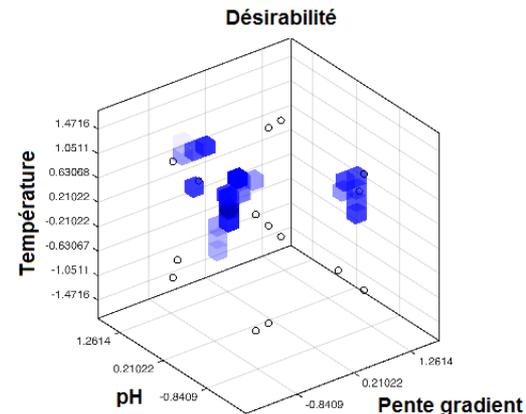
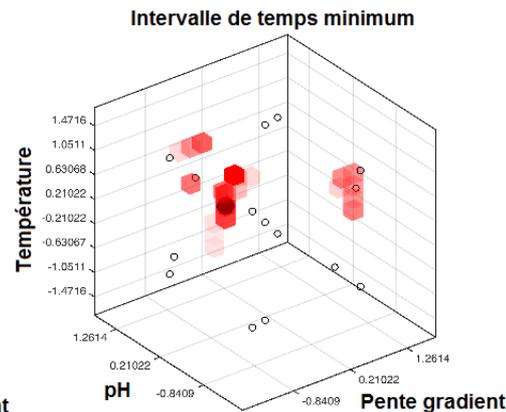
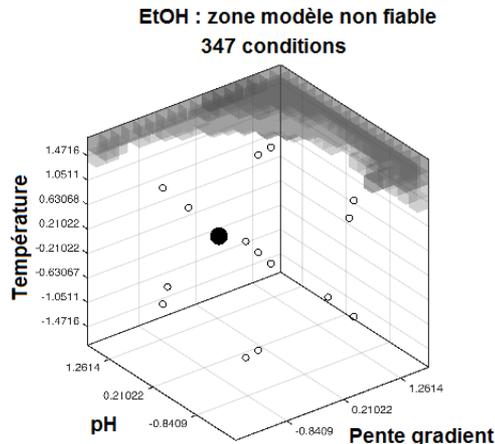
Prédiction

- ACN**
- pas de zone de non-chevauchement des pics
 - pas de conditions optimales prédites

Prédiction

- ACN**
- pas de zone de non-chevauchement des pics
 - pas de conditions optimales prédites

- EtOH**
- zones de non-chevauchement des pics existent en dehors des points de calibration
 - conditions optimales prédites (-1,05 ; -0,42 ; 0,84)
=> 2,57 %/min ; pH 4,84 ; 33,7 °C



- optimum
- points de calibration (DOE)

Validation expérimentale

Xbridge BEH Shield RP
18 (50*4,6 mm; 2,5 µm)

T = 33,7°C

Phases mobiles :

(A) Tampon AF/AFNH4

20 mM, pH = 4,84

(B) 100% EtOH +
AF/AFNH4 20 mM

Gradient :

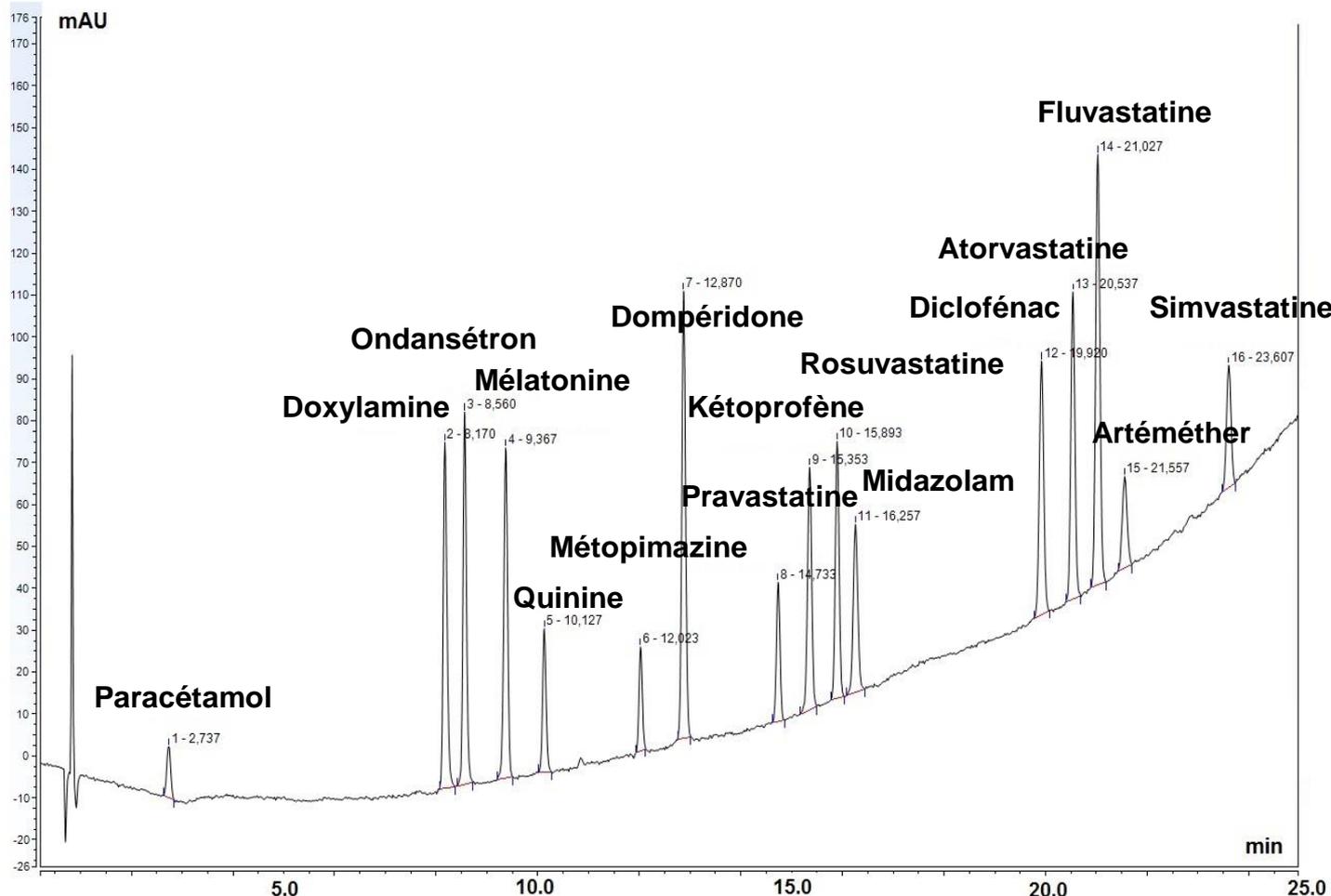
0-0,6 min : 95/5 A/B

0,6-29,8 min : de 5 à
80% de B

Pente = 2,57 %/min

Débit = 0,8 mL/min

Détection : 210 nm



Validation expérimentale

Xbridge BEH Shield RP
18 (50*4,6 mm; 2,5 µm)

T = 33,7°C

Phases mobiles :

(A) Tampon AF/AFNH4

20 mM, **pH = 4,84**

(B) 100% EtOH +
AF/AFNH4 20 mM

Gradient :

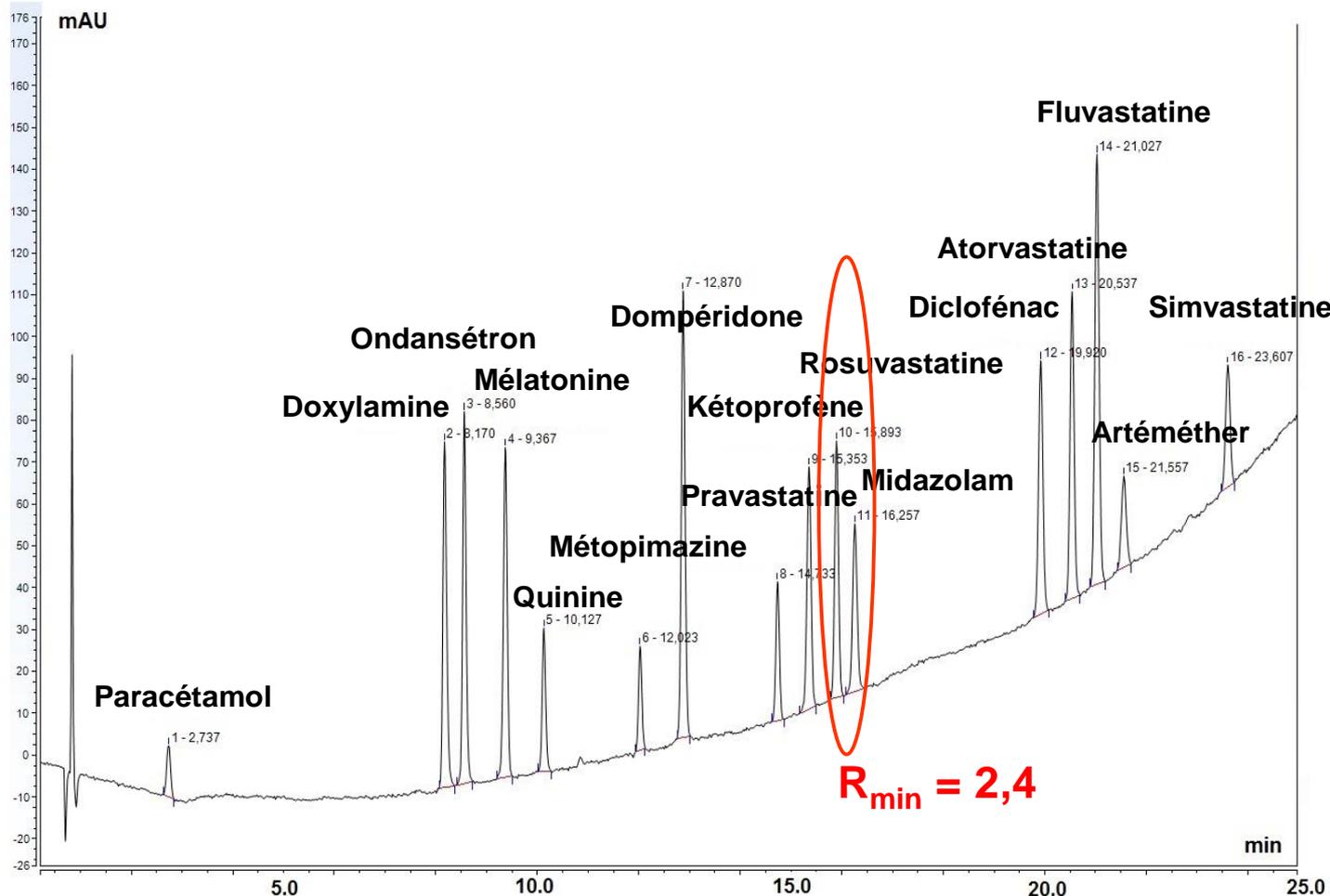
0-0,6 min : 95/5 A/B

0,6-29,8 min : de 5 à
80% de B

Pente = 2,57 %/min

Débit = 0,8 mL/min

Détection : 210 nm



Design space

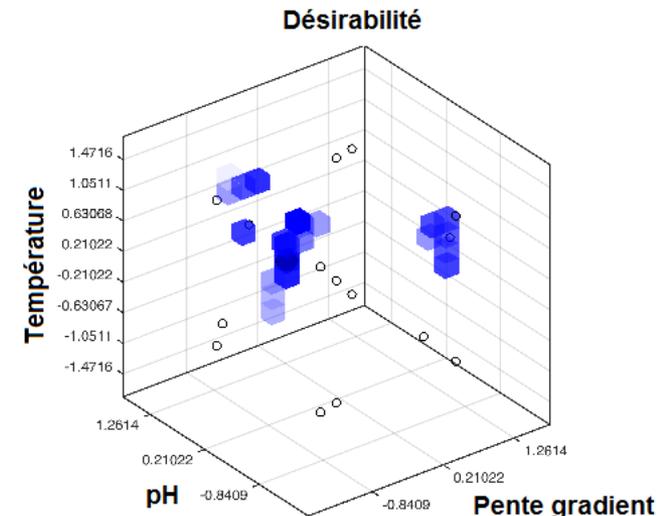
- Validation expérimentale de la robustesse

- plan de Plackett-Burman autour de l'optimum (2^{3-1})
- $\pm 0,2$ unité codé autour de l'optimum pour les 3 facteurs

Niveau	pH	Pente gradient (%/min)	Température (°C)
-1	4,82	2,47	32,9
+1	5,02	2,66	34,5



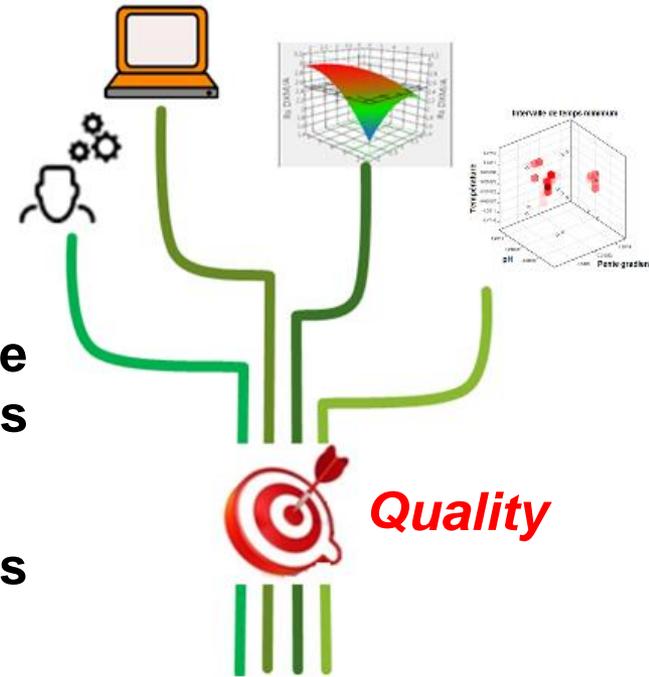
Zone de robustesse = pas d'inversion de l'ordre d'élution et $R_s \geq 2,2$



Conclusion

■ Approche QbD

- aide au développement et à l'optimisation de méthodes analytiques robustes¹
- recommandée par la réglementation ICH
- meilleure connaissance de la méthode => introduction de nouveaux concepts (ex : chimie verte²)
- Design Space = zone de robustesse mais validation de la méthode nécessaire



¹L. Ferey, K. Gaudin, *Quality by Design: A Tool for Separation Method Development in Pharmaceutical Laboratories. LCGC Europe 29 (10) (2016) 16-25*

²C. Boussès, L. Ferey, E. Vedrines, K. Gaudin, *Using an innovative of QbD and Green analytical chemistry approaches for the development of a stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products J. Pharm. Biomed. Anal. 115 (2015) 114-122*



Adrien Raimbault



Pr. Karen Gaudin

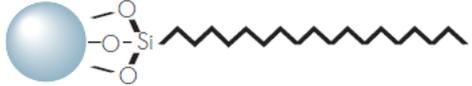
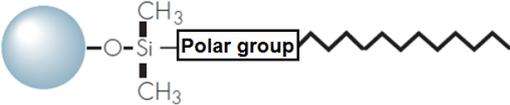


Dr. Isabelle Rivals

MERCI



Choix de la colonne

Colonnes	Dimensions	Chimie
Acquity BEH UPLC C18	100 x 3,0 mm; d.i. 1,7 μm	
Cortecs C18+	100 x 3,0 mm; d.i. 2,7 μm	
Xbridge BEH Shield RP18	50 x 4,6 mm; d.i. 2,5 μm	

- Gradient générique : 5 à 100% ACN, 3 %/min, 20 mM acide formique (pH = 2,6) ou acétate d'ammonium (pH = 6,7), D = 0,5 mL/min, T = 30°C
 - meilleure symétrie des pics pour les composés basiques sur la colonne BEH Shield RP18