



# DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION DES MÉTHODES ANALYTIQUES

Université Abou Bekr Blekaïd - Tlemcen  
Département de Pharmacie



**Module de Pharmacie Industrielle**  
**5<sup>ème</sup> année pharmacie**

**Présenté par :**

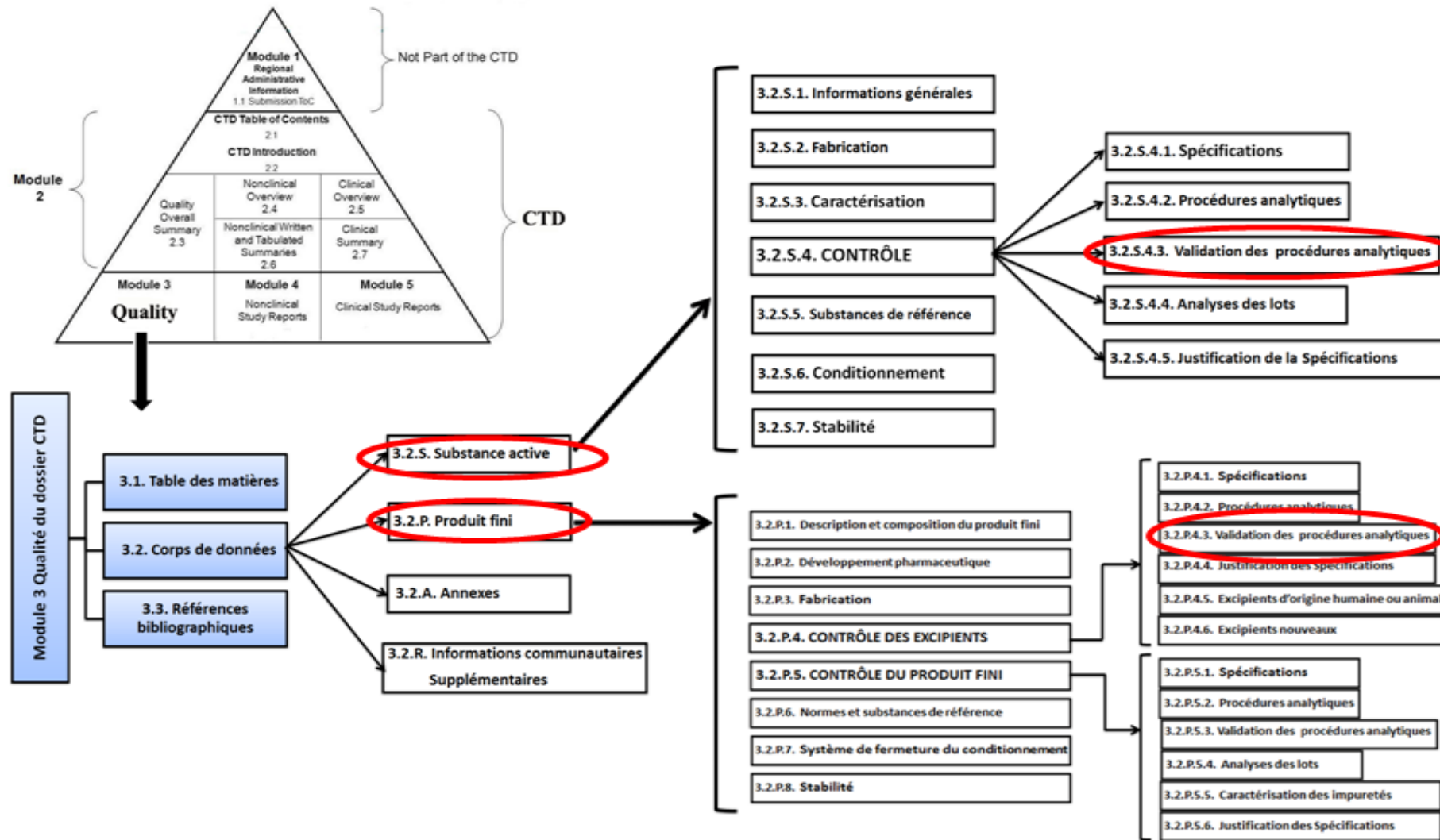
**Dr Sarra ABBAD**  
**MC en Génie Pharmaceutique**



## ■ Introduction:

La validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et les essais de stabilité de tous les produits pharmaceutiques. Dans le domaine pharmaceutique, son exigence est avant tout une **pratique réglementaire**.

Les méthodes d'analyse devront suivre une **procédure écrite**, décrivant en détail chacune des étapes à réaliser. Par exemple, **la description de l'échantillon, le standard de référence (étalon), les réactifs à utiliser, la méthode d'obtention de la courbe d'étalonnage, l'utilisation d'une formule de calcul**, etc.



## Common Technical Document (CTD)

## Cycle de vie d'une méthode d'analyse:

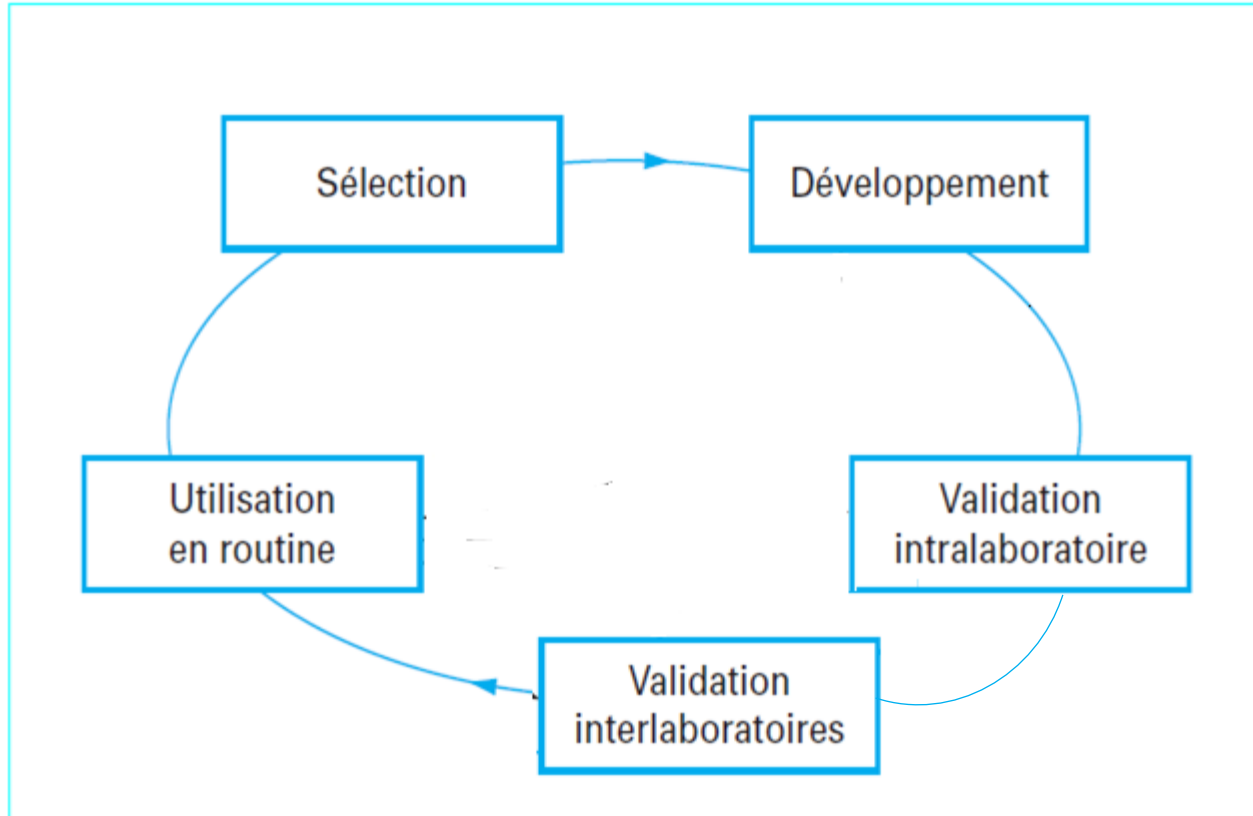
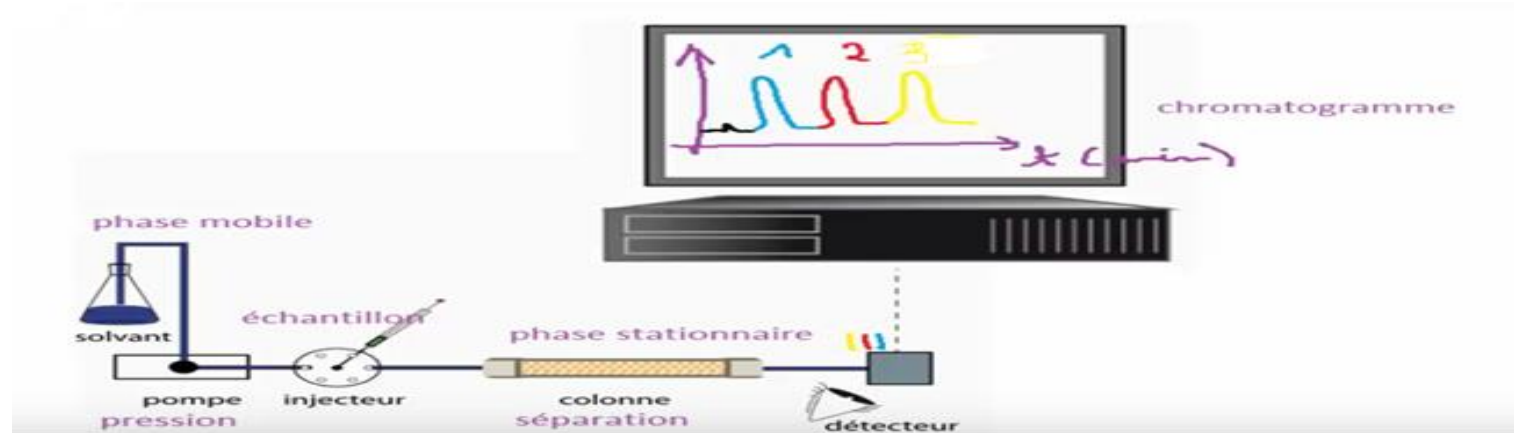


Figure : Cycle de vie d'une méthode d'analyse

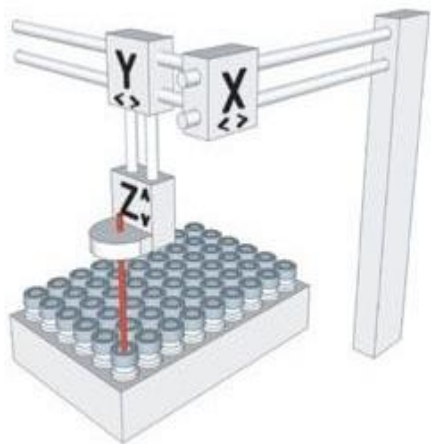
- D'abord on va **sélectionner la méthode, c'est-à-dire de choisir** parmi toutes les méthodes physico-chimiques connues ou maîtrisées par le laboratoire celle qui doit permettre de déterminer un ou plusieurs analytes représentatifs du problème analytique à traiter.
- Ensuite, il convient de **développer la méthode, c'est-à-dire mettre** au point le mode opératoire et adapter la méthode aux conditions pratiques où elle va être utilisée.
- **Validation** (spécificité, linéarité, précision...)
- Si la validation se révèle conforme, le cycle de vie va se poursuivre par une **utilisation de la méthode en routine**.

- Exemple: Développement de la méthode de dosage d'un PA par HPLC (High performance liquid chromatography)

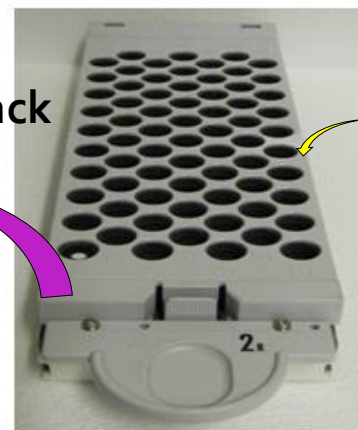




Autosampler



Rack



HPLC vials

## Exemple :

The critical components for HPLC method are:

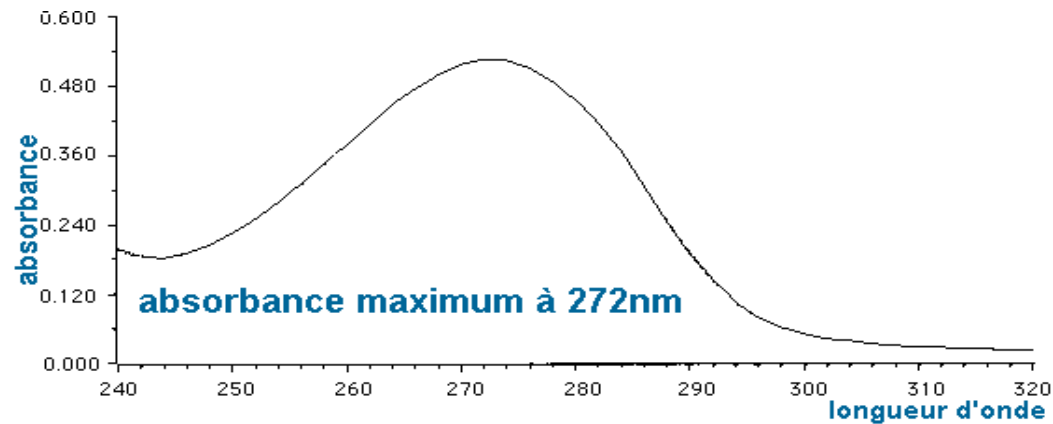
- **Sample preparation:**

% organic, pH, shaking/sonication, sample size, sample age...

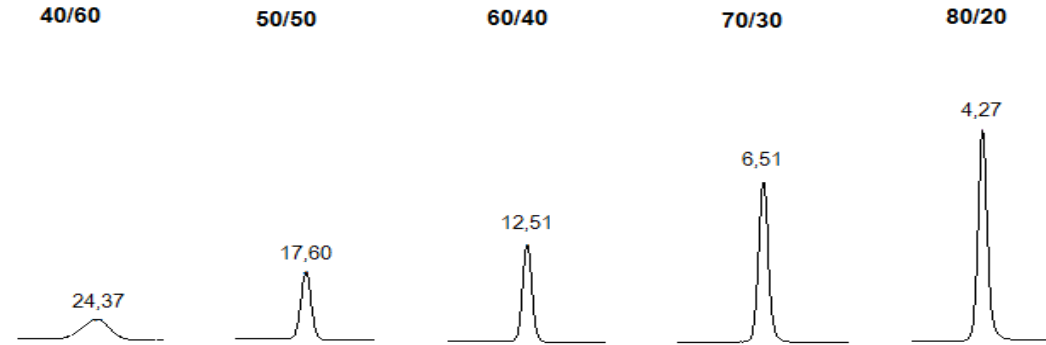
- **Analysis conditions:**

%organic, pH, flow rate (débit), temperature, wavelength, and column age

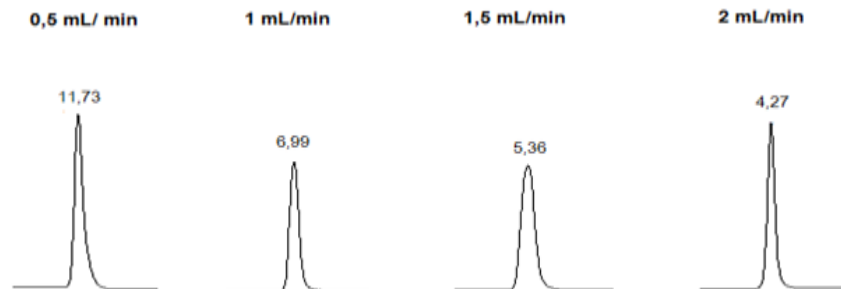
### 1. Choix de la longueur d'onde de détection :



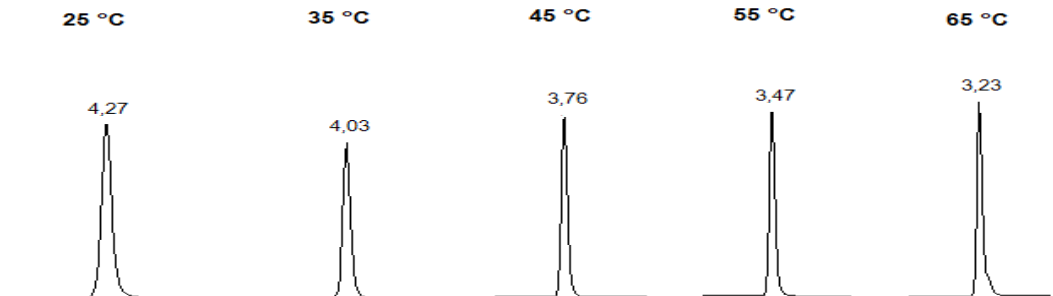
## 2. Choix de la composition de la phase mobile (acétonitrile-tampon phosphate):



## 3. Effet du débit de la phase mobile :

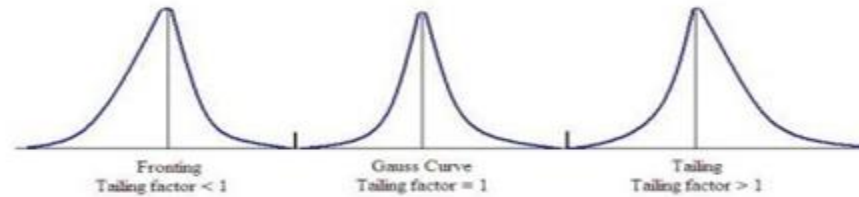
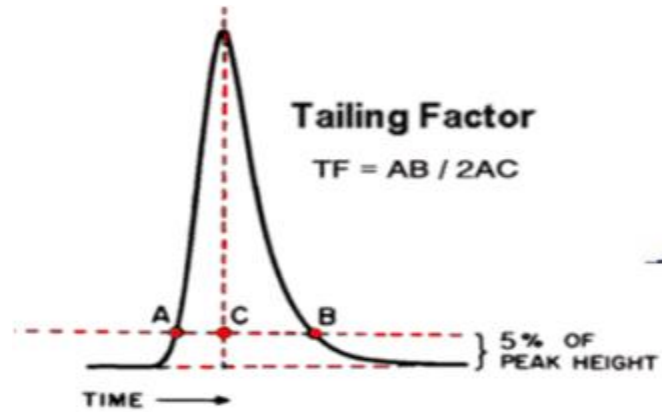


## 4. Effet de la température de la colonne sur la rétention du principe actif :

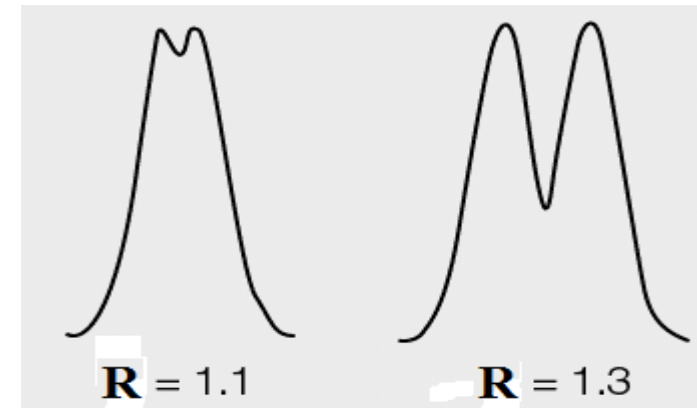
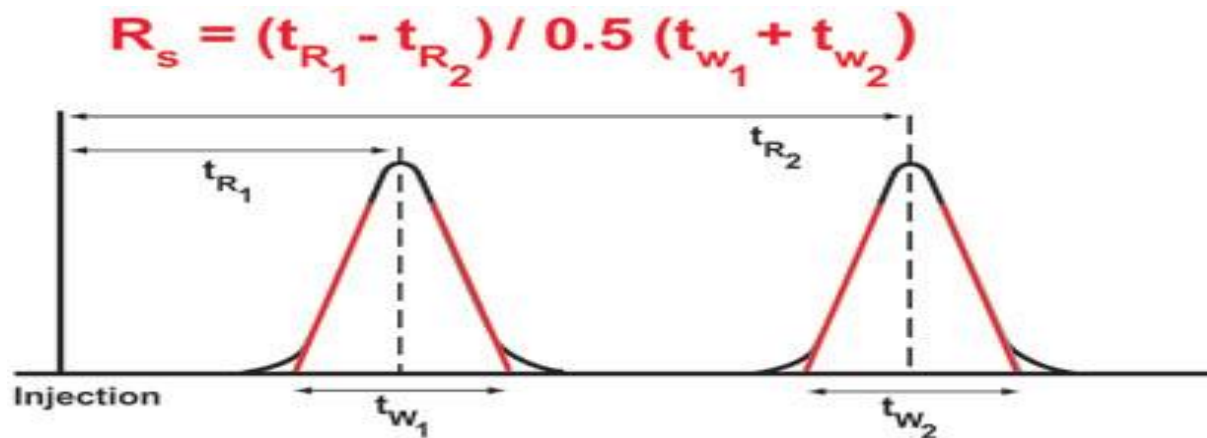




T (facteur de trainée  $\leq 2$ ):



Resolution:  $R > 2$



# ICH Q2(R1) Validation des méthodes d'analyse: Texte et méthodologie

The screenshot shows the ICH website interface. At the top left is the ICH logo with the tagline "harmonisation for better health". To the right is a "CONTACT" link and the letters "Q S E M". Below this is a blue navigation bar with menu items: HOME, ABOUT ICH, WORK PRODUCTS (highlighted in purple), MEETINGS, TRAINING, and NEWSROOM. A search bar and social media icons are also present. The breadcrumb trail reads "Home \ ICH Guidelines \ Quality Guidelines". The main heading is "Quality Guidelines", followed by a paragraph about harmonisation achievements. A list of guidelines is shown, with "Q2 Analytical Validation" expanded. A pink arrow points to the "Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology" entry. The text below describes the guideline's history and purpose. A "Guideline" box contains a PDF icon and the text "Q2(R1) Guideline".

Home \ ICH Guidelines \ Quality Guidelines

## Quality Guidelines

Harmonisation achievements in the Quality area include pivotal milestones such as the conduct of stability studies, defining relevant thresholds for impurities testing and a more flexible approach to pharmaceutical quality based on Good Manufacturing Practice (GMP) risk management.

- Q1A - Q1F Stability
- Q2 Analytical Validation**
  - Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**

The ICH Harmonised Guideline on Text (previously coded Q2A) was finalised under *Step 4* in October 1994. This identifies the validation parameters needed for a variety of analytical methods. It also discusses the characteristics that must be considered

**Guideline**  
Q2(R1) Guideline



- **Selon ICH Q2(R1) :**

"L'objectif de la validation des méthodes d'analyse est de démontrer qu'elles conviennent aux usages auxquels on les destine".

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables.

- **Types de méthodes d'analyse à valider:**

- ❖ Epreuves d'identification
- ❖ Dosage de la partie active ou d'une ou de plusieurs autres composantes de la substance médicamenteuse ou du produit fini.
- ❖ Dosage quantitatif des impuretés;
- ❖ Vérification des teneurs limites des impuretés;



- **Organisation pratique de la validation d'une méthode analytique:**

- Définir les objectifs à atteindre ;
- Prévoir les plans d'expérience à réaliser ;
- Prévoir les quantités et la qualité des matériaux qui seront utilisés ;
- Organiser le calendrier des études et celui du personnel qui en sera chargé.
- Nommer un responsable qui coordonnera l'étude de validation ;
- Rédiger la version préliminaire du mode opératoire de la méthode.
- Ouvrir une fiche de validation;
- Réunir un groupe de travail qui définira le domaine d'application et l'objectif attendu de la méthode ;
- Prévoir la logistique, en termes de volumes d'échantillon de validation, de réactifs et de disponibilité du personnel.



- **Critères de validation des méthodes analytiques:**

- ✓ **Spécificité**

- ✓ **Linéarité**

- ✓ **Ecart d'utilisation**

- ✓ **Exactitude (Répétabilité, précision intermédiaire, reproductibilité)**

- ✓ **Limite de détection**

- ✓ **Limite de dosage**

- ✓ **Robustesse**


## Les caractéristiques les plus importantes à considérer selon le type de méthode à valider selon ICH Q2(R1) :

**TABLEAU**

Type d'analyse	Identification	Analyse des impuretés		Dosage - dissolution (mesure seulement) - teneur/activité
		Teneur	limite	
Caractéristiques				
Exactitude	-	+	-	+
Précision				
Répétabilité	-	+	-	+
Précision interméd.	-	+	-	+
Spécificité	+	+	+	+
Limite de détection	-	-	+	-
Limite de dosage	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Écart d'utilisation	-	+	-	+

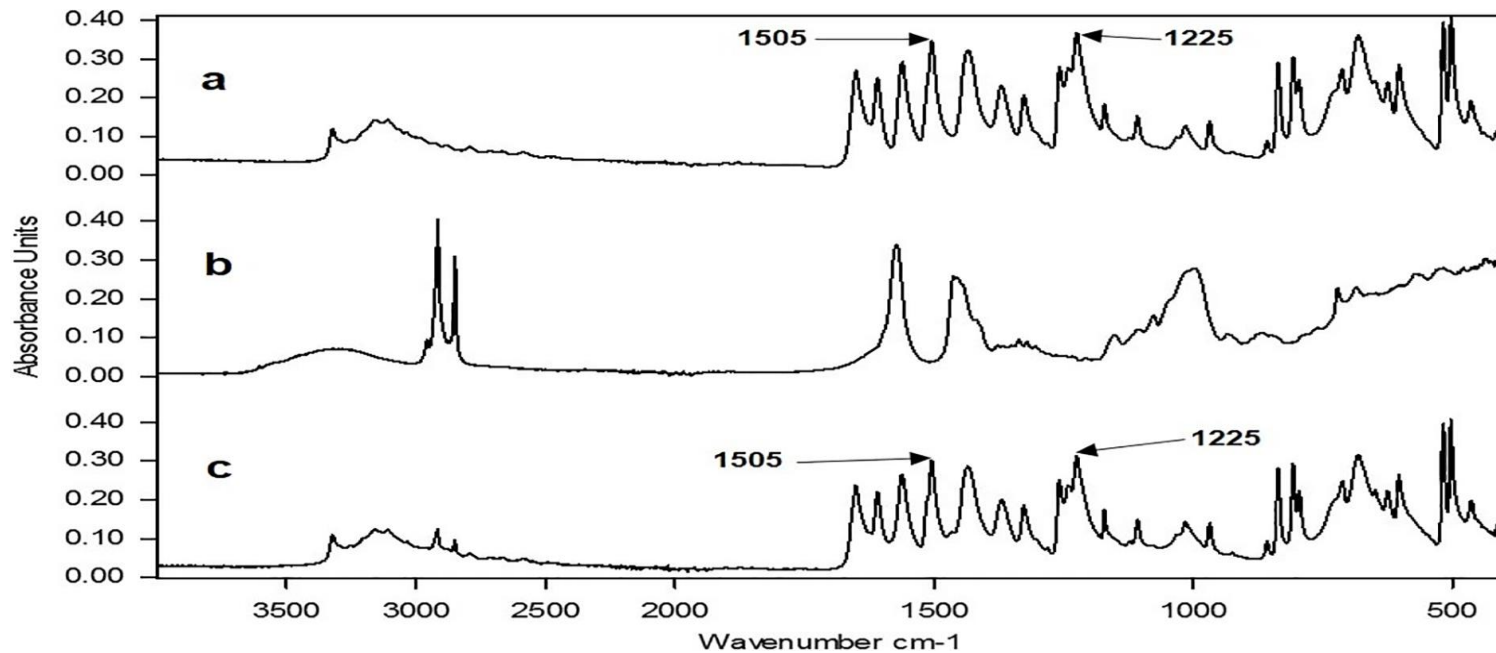
- caractéristique qui n'est normalement pas évaluée

+ caractéristique normalement évaluée

- 
- **Moyenne** : Mean or Average.
  - **Surface sous la courbe** : Area under the curve (AUC)
  - **Pente de la courbe de régression (P)**: Slope
  - **Ecart type** : Standard Deviation (**SD**)
  - **Coefficient de variation (CV)**: Relative Standard Deviation (**RSD**)/écart type relatif
  - **Taux de recouvrement** : Recovery %
  - **Intercept** : Point d'interception sur l'axe des Y

## 1. Spécificité (specificity):

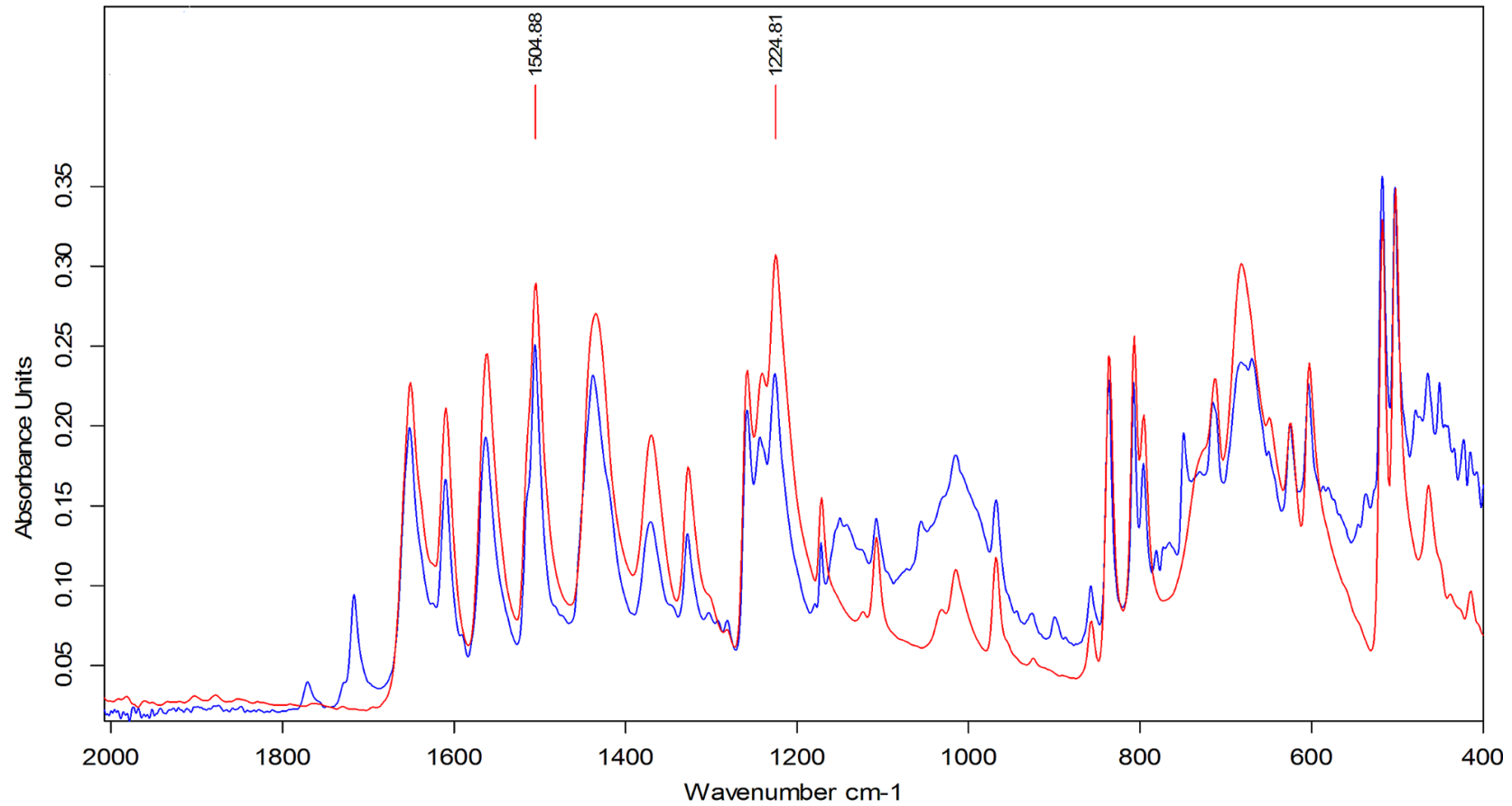
- La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse **rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composants normalement présentes**. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc.



**Fig . Comparison of three spectra by FTIR:**

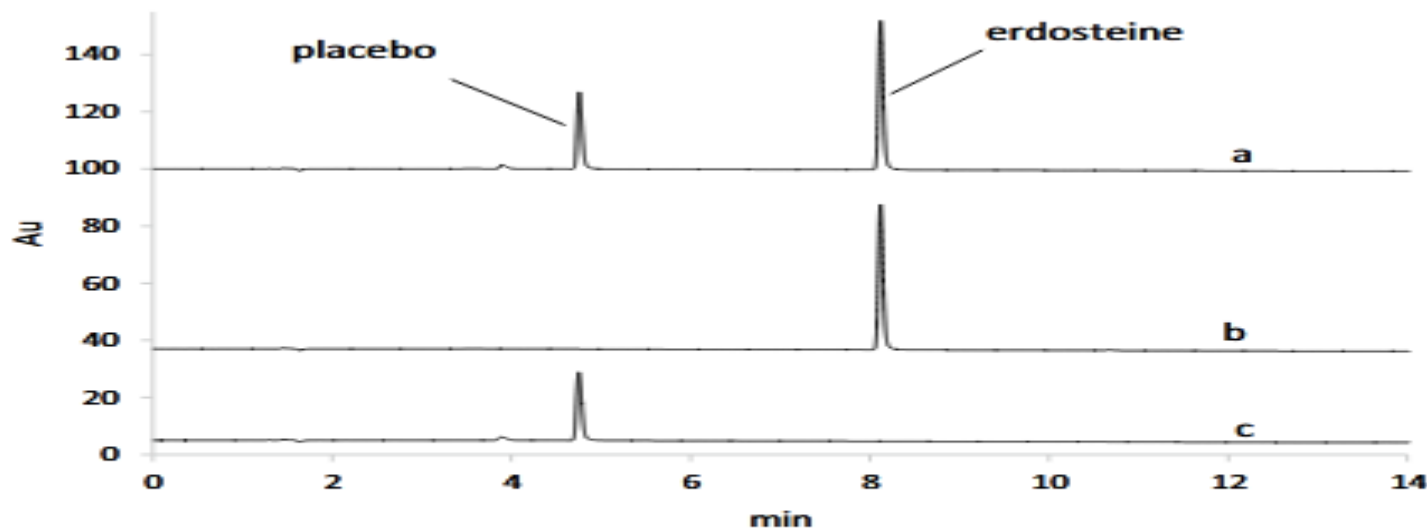
- (a)** pure paracetamol,
- (b)** a mixture of three excipients (maize starch, magnesium and microcrystalline cellulose),
- (c)** a simulated paracetamol tablet mixture (80:20 paracetamol:excipients).



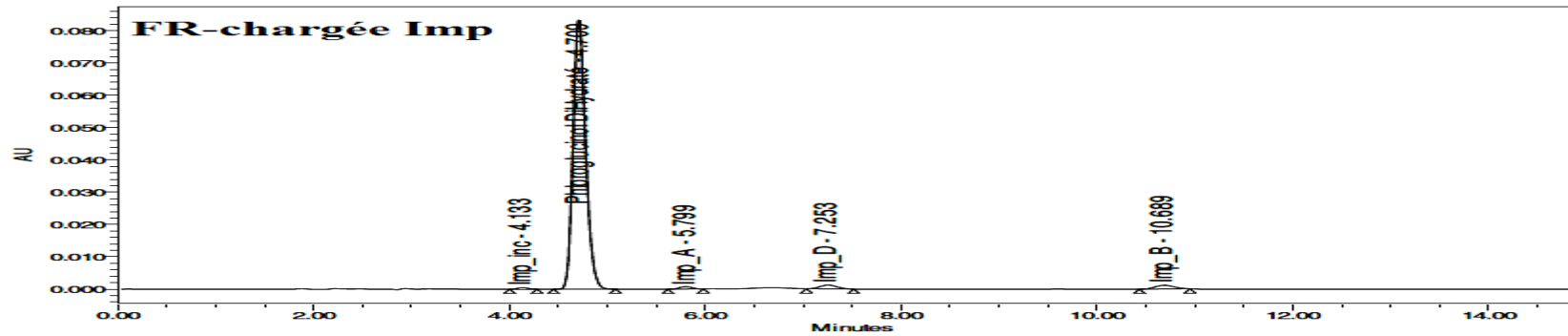
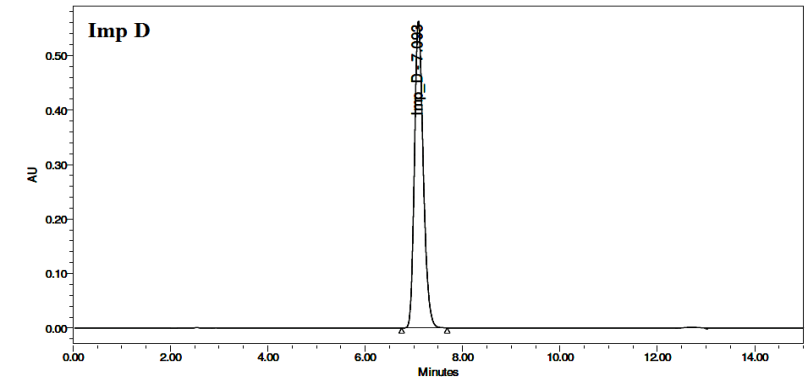
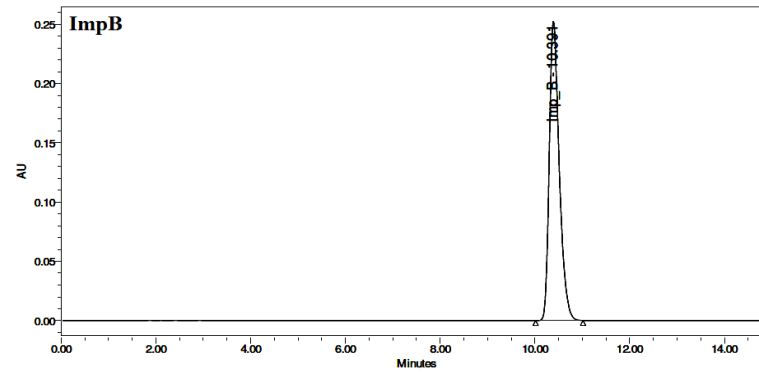
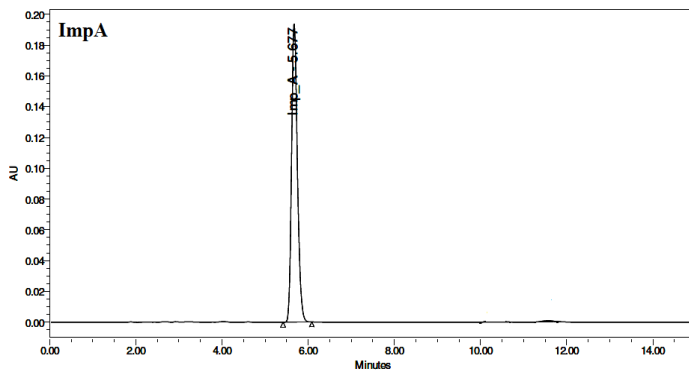
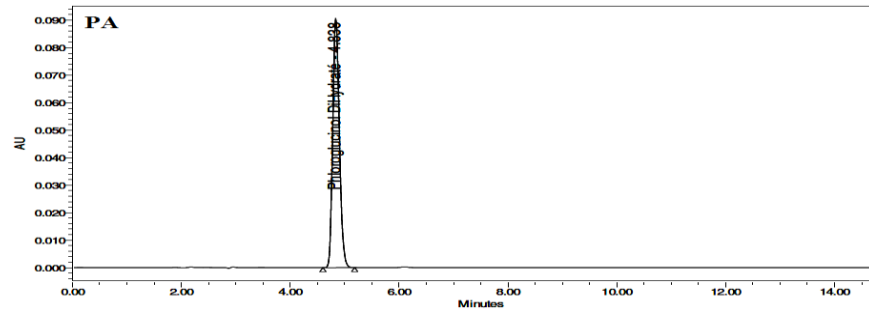
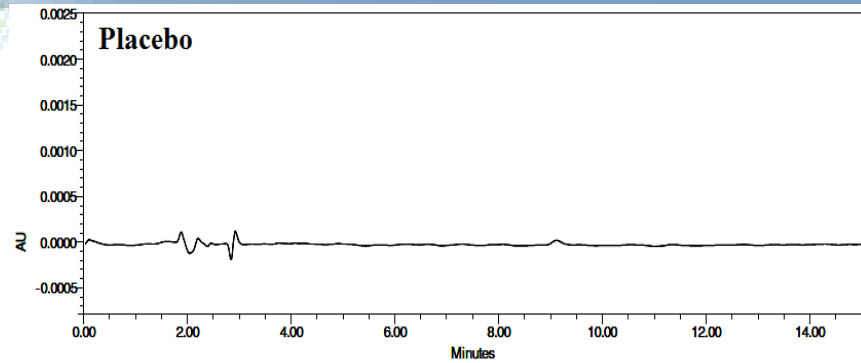


**Fig . Overlay of ATR-FTIR spectra for identification: Pure paracetamol (red) and paracetamol tablet (blue).**

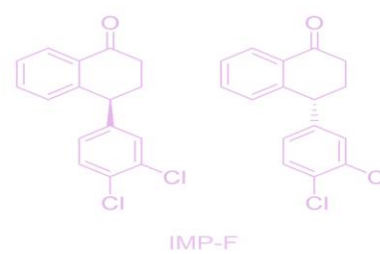
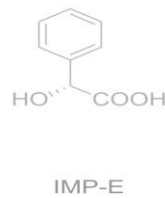
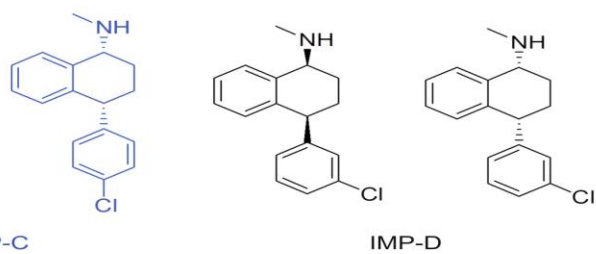
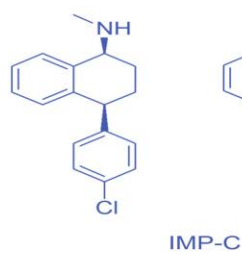
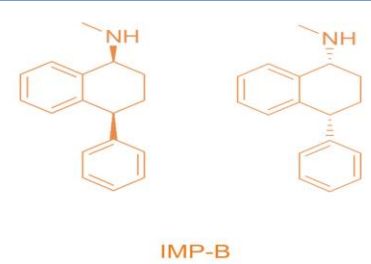
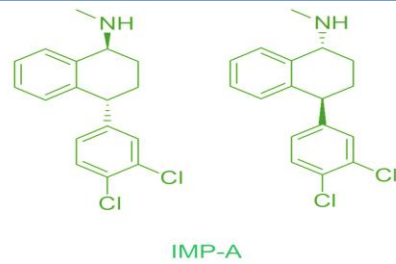
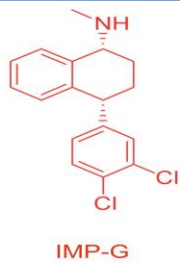
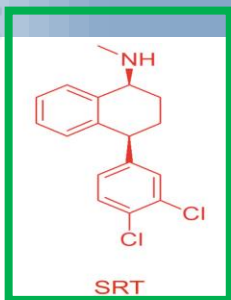
- **Teneur:** On doit démontrer que la méthode de détermination de la teneur permet de faire la distinction entre la substance à analyser, les impuretés et (ou) les excipients. Pour se faire, on enrichit la substance pure (substance médicamenteuse ou produit fini) en y ajoutant une quantité suffisante d'impuretés et (ou) d'excipients, puis on démontre que ces composantes additionnelles n'influencent pas les résultats obtenus pour la teneur (par comparaison aux résultats obtenus avec des échantillons non enrichis).



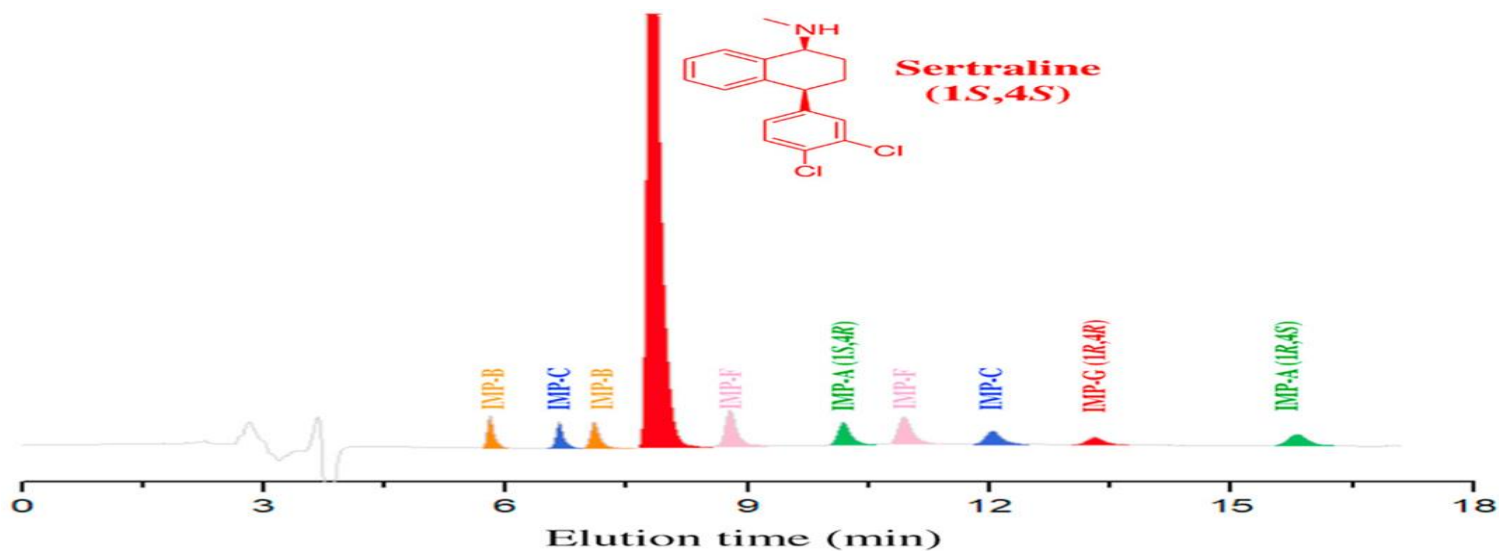
**Fig.** UPLC chromatograms of erdosteine finished product (effervescent tablets) (a), erdosteine standard (b) and placebo (c) -



**Fig: Spécificité de la méthode de dosage par HPLC.**



Chemical structures and abbreviations of sertraline and its potential organic impurities.



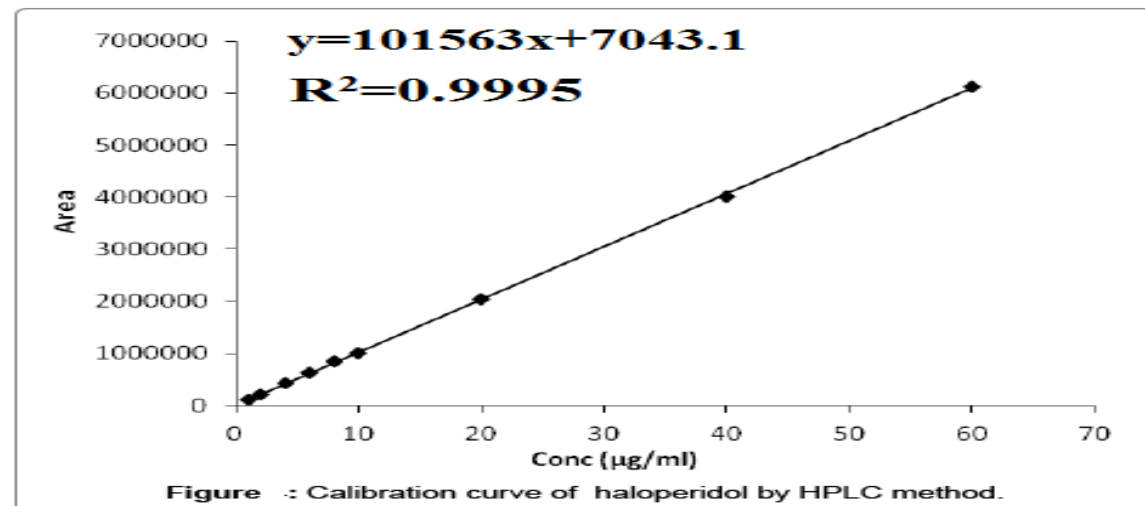
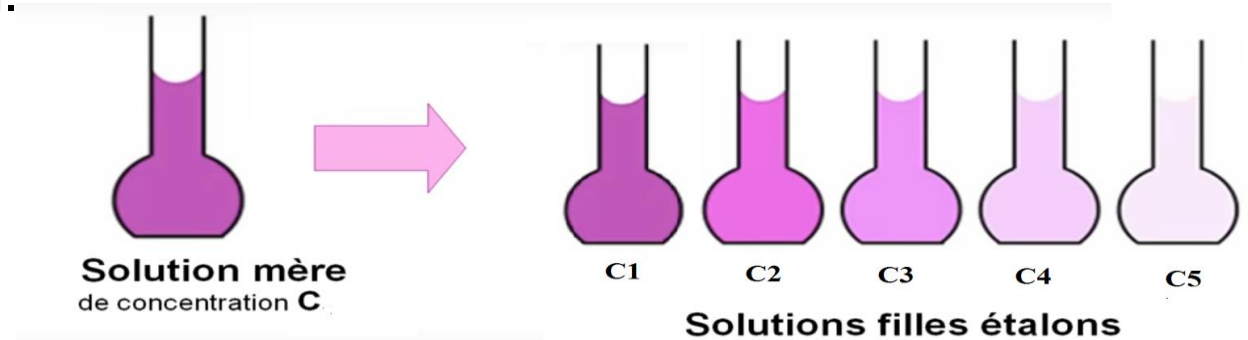
HPLC chromatograms of SRT and impurities

## 2. Linéarité (linearity):

La linéarité d'une procédure analytique donnée est sa capacité, à l'intérieur d'un intervalle donné, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration de la substance analysée dans l'échantillon.

•On peut démontrer l'existence d'une relation linéaire en appliquant la méthode proposée directement à la substance médicamenteuse (en diluant une solution-mère étalon) ou en utilisant des portions pesées individuellement de mélanges synthétiques réunissant les composantes du produit fini.

•Il est recommandé d'utiliser au **moins cinq concentrations répétées trois fois pour chaque niveau** pour la démonstration de la linéarité.

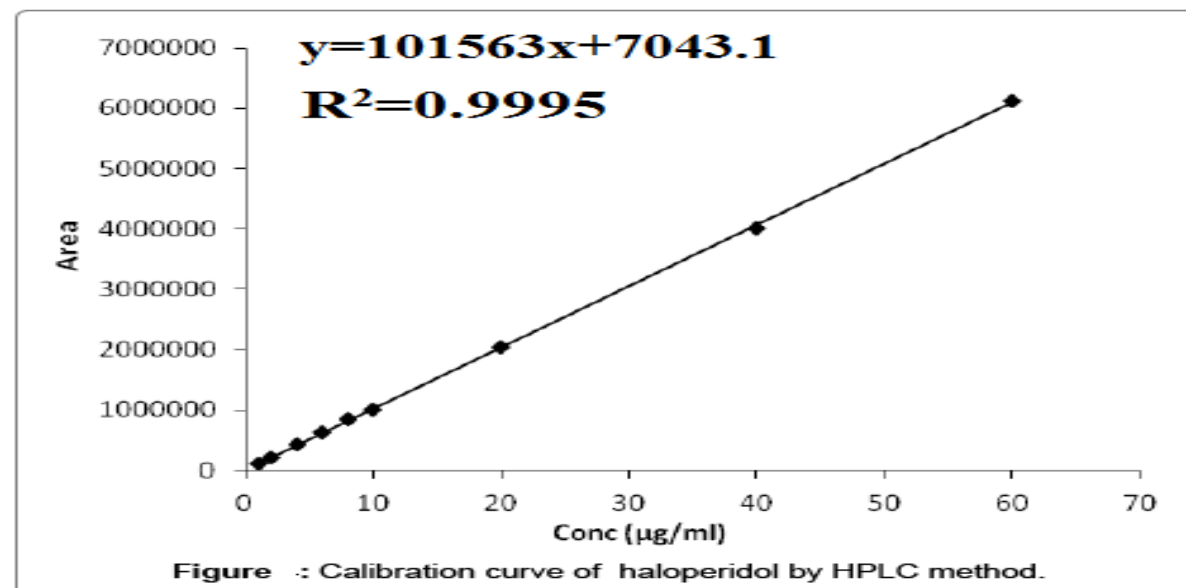
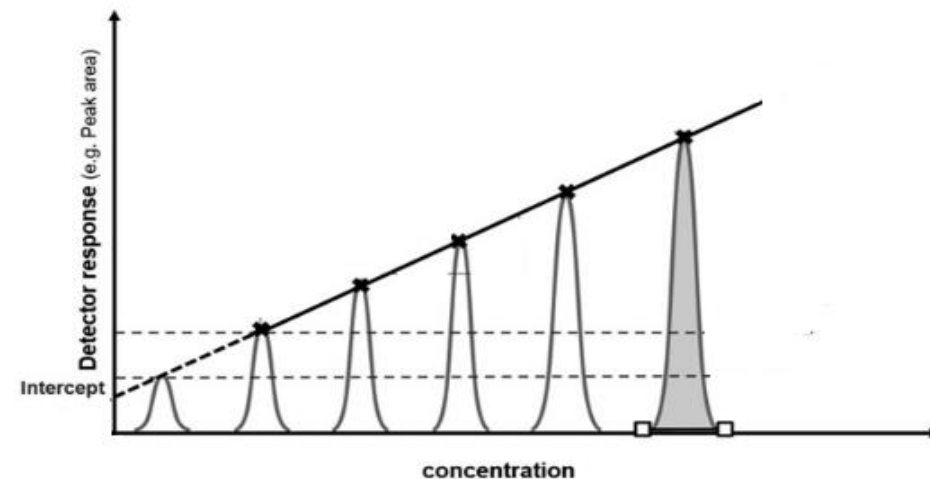


Il faut déterminer :

- le coefficient de détermination ( $R^2$ ),
- le point d'interception sur l'axe des ordonnées (y),
- la pente de la courbe de régression (P),
- Un graphique représentant les données doit être inclus.

Exemple:

- le coefficient de détermination  $R^2 = 0.9995$
- le point d'interception sur l'axe des ordonnées (y) = 7043.1
- La pente de la courbe de régression = 101563



### 3. Ecart d'utilisation (range):

Les valeurs minimum suivantes doivent être évaluées comme valeurs limites de l'écart d'utilisation :

- Pour la **teneur** d'une substance médicamenteuse : normalement de **80 à 120 %** de la concentration analysée;
- Pour l'évaluation de **l'uniformité de teneur** au moins de **70 à 130 %** de la concentration analysée, à moins qu'un écart plus étendu convienne mieux à la forme posologique considérée (p. ex., s'il s'agit d'un aérosol-doseur);
- Pour le test de **dissolution** : valeurs limites spécifiées  **$\pm 20 %$** ;

p. ex., si, pour un produit à libération contrôlée, les normes indiquent des valeurs de 20 % après une heure et de 90 % après 24 heures, l'écart d'application à valider doit être de 0 à 110 % de la valeur alléguée sur l'étiquette.

- Pour le dosage d'une impureté : l'écart du niveau de sa teneur à 120 % de la limite établie

## 4. Exactitude (Accuracy):

- L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention.
- L'étude statistique des résultats va permettre de vérifier l'exactitude de la méthode. Pour cela, on calcule :
- **le taux de recouvrement (% Recovery)** qui représente **le rapport entre la concentration estimée** par le modèle mathématique et **la teneur théorique réelle**.

$$R (\%) = \frac{C_e}{C_i} \times 100$$

- $C_e$  : Concentration du principe actif estimée par l'appareil
- $C_i$  : Concentration du principe actif introduite



Pour évaluer l'exactitude de la méthode à valider, il est recommandé d'utiliser au moins **9 résultats obtenus par l'analyse d'au moins 3 concentrations englobant l'écart d'utilisation (c.-à-d. 3 concentrations avec 3 échantillons chacune).**

Concentration introduite (µg/mL)	AUC	Concentration calculée (µg/mL)	Recovery (%)
<b>80</b>	103364	80,06	100,07
	102947	79,74	99,68
	103414	80,10	100,12
<b>100</b>	129802	100,22	100,25
	127218	98,25	98,25
	129013	99,62	99,62
<b>120</b>	155837	120,08	100,06
	158754	122,30	101,92
	154932	119,39	99,49

$$y=1311,15x-1608,60$$

## 5. Précision:

La précision d'une méthode correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites. La précision peut s'évaluer à trois niveaux :

- ✓ 5.1. Répétabilité,
- ✓ 5.2. Précision intermédiaire,
- ✓ 5.3. Reproductibilité.

## 5.1. La répétabilité:

- **La répétabilité** qui va démontrer la précision des mesures dans des conditions opératoires identiques (même analyste, même équipement, mêmes réactifs) et à des intervalles de temps très rapprochés.
- La répétabilité est une expression de la précision de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps.
- La répétabilité est aussi désignée « *précision intra-analyse/intra-day* ».

Pour évaluer la répétabilité il faut :

- Au moins **9 mesures englobant l'écart d'utilisation** de la méthode (c.-à-d. 3 concentrations avec 3 échantillons chacune);
- Au moins **6 mesures d'une concentration à 100 % de la teneur** escomptée.

Concentration	80 µg/ml	Recovery %	100 µg/ml	Recovery %	120 µg/ml	Recovery %
<b>Day 1</b>	80,06	100,07	100,25	100,25	120,08	100,06
	79,74	99,68	98,25	98,25	122,30	101,92
	80,10	100,12	99,62	99,62	119,39	99,49
Average	79,96	99,95	99,37	99,37	120,59	100,70
SD	0,19	0,24	1,02	1,02	1,52	1,72
<b>CV (%)</b>	<b>0.25</b>	<b>0.24</b>	<b>1.03</b>	<b>1.03</b>	<b>1.26</b>	<b>1.70</b>

## 5.2. La précision intermédiaire:

- La **précision intermédiaire** est l'expression de la variabilité **intra-laboratoire** (mesures effectuées à des jours différents, par des analystes différents, avec des équipements différents, ...).

Concentration	80 µg/ml	Recovery %	100 µg/ml	Recovery %	120 µg/ml	Recovery %
<b>Day 2</b>	80,69	100,86	100,85	100,85	119,09	99,24
	81,53	101,91	98,74	98,74	120,02	100,01
	79,15	98,93	100,69	100,69	118,02	98,35
Average	80,45	100,56	100,09	100,09	119,04	99,2
SD	1,20	1,51	1,17	1,17	1,00	0,83
<b>CV (%)</b>	1,49	1,50	1,17	1,17	0,84	0,83

Concentration	80 µg/ml	Recovery %	100 µg/ml	Recovery %	120 µg/ml	Recovery %
<b>Day 3</b>	80,59	100,73	99,58	99,58	120,12	100,10
	80,47	100,58	100,75	100,75	121,95	101,62
	80,31	100,38	100,49	100,49	118,97	99,14
Average	80,45	100,56	100,27	100,27	120,34	100,28
SD	0,14	0,17	0,61	0,61	1,50	1,25
<b>CV (%)</b>	0,17	0,17	0,61	0,60	1,24	1,24

Concentration	80 µg/ml	Recovery %	100 µg/ml	Recovery %	120 µg/ml	Recovery %
<b>Day 1</b>	79,96	99,95	99,37	99,37	120,59	100,70
<b>Day 2</b>	80,45	100,56	100,09	100,09	119,04	99,20
<b>Day 3</b>	80,45	100,56	100,27	100,27	120,34	100,28
Average	80,2866667	100,356667	99,91	99,91	119,99	100,06
SD	0,28290163	0,35218366	0,47623524	0,47623524	0,83216585	0,77382168
<b>CV (%)</b>	0,3523644	0,35093201	0,47666423	0,47666423	0,69352933	0,77335767



### 5.3. La reproductibilité:

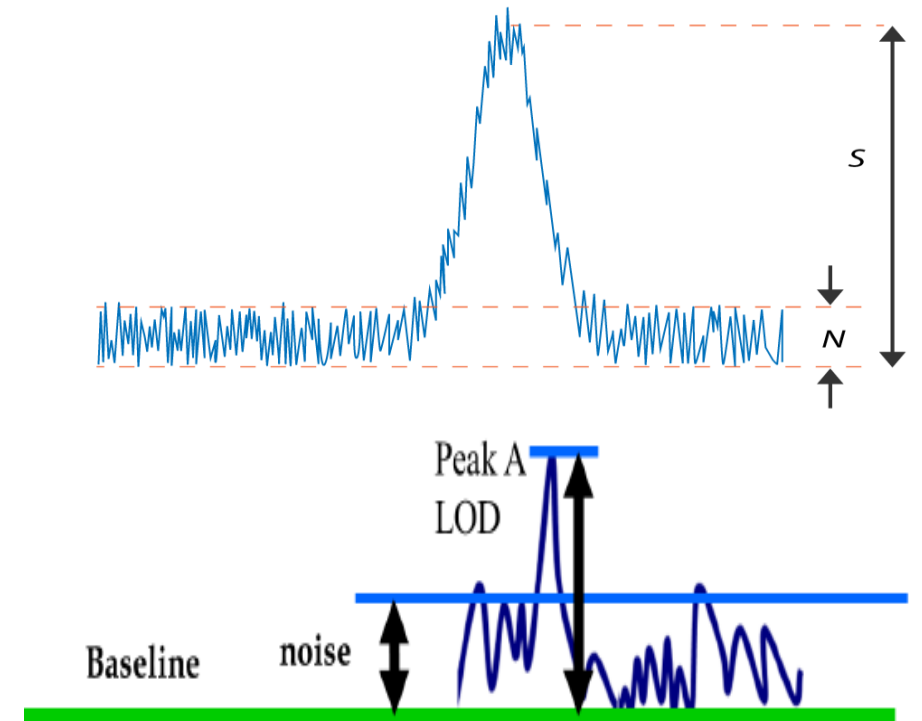
- La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement l'uniformisation de la méthodologie). Elle exprime les variations **inter-laboratoire**.
- Il faut évaluer ce facteur lorsque la méthode à valider doit être normalisée, par exemple, pour figurer sur la liste des méthodes recommandées dans les pharmacopées.
- Les données de reproductibilité ne font pas partie de la demande d'approbation.

## 6. Limite de détection (LOD, limit of detection):

- La limite de détection d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte.
- La détermination de la LOD peut se faire:

### a. Approche du rapport signal/bruit:

Pour déterminer le rapport signal/bruit, on compare le signal obtenu avec des échantillons contenant de faibles concentrations connues de la substance à analyser au signal obtenu avec des blancs, et on détermine la concentration la plus faible à laquelle la substance peut être détectée de façon fiable. En général, un rapport signal/bruit de 3 ou 2 pour 1 est considéré comme acceptable pour l'estimation de la limite de détection.



**b. Approche de l'écart-type de la réponse et de la pente de la courbe d'étalonnage :**

La limite de détection (LOD) peut être représentée par la formule suivante :

$$\mathbf{LOD} = \frac{\mathbf{3,3 \sigma}}{\mathbf{P}}$$

où  $\sigma$  = écart-type de la réponse

P = pente de la courbe d'étalonnage

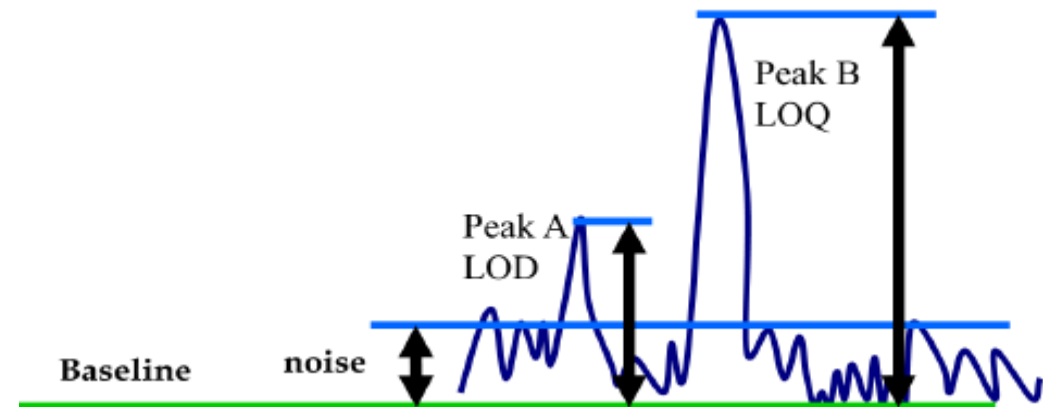
- La valeur de l'écart-type  $\sigma$  peut être estimée de diverses manières; on peut utiliser l'écart-type de l'ordonnée à l'origine de courbes de régression.

## 7. Limit de dosage (LOQ, Limit of quantification) :

La Limite de quantification (LOQ) est la plus petite quantité ou concentration d'une substance à analyser qui puisse être dosée avec une certitude suffisante.

La limite de dosage (LOQ) peut être représentée par la formule suivante :

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{P}$$



## 8. Robustesse (Robustness):

- La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquence de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation.
- En ce qui concerne les chromatographies en phase liquide :
  - ❖ Variations du pH de la phase mobile;
  - ❖ Variations de la composition de la phase mobile;
  - ❖ Colonnes différentes (provenant de lots ou de fournisseurs différents);
  - ❖ Température;
  - ❖ Débit.

**Table : Robustesse de la méthode d'analyse**

<b>Paramètres</b>		<b>Amount added <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Amount measured <math>\pm\text{SD}</math></b>	<b>RSD (%)</b>
Changement dans la composition de la phase mobile	ACN : Buffer 70:30	10	9.9549 $\pm$ 0.1226	1.23
	ACN : Buffer 72:28	10	9.6701 $\pm$ 0.0543	0.56
	ACN : Buffer 74:26	10	10.0294 $\pm$ 0.0942	0.94
Changement de la Température de la colonne	25°C	10	10.1743 $\pm$ 0.1658	1.63
	30°C	10	10.0594 $\pm$ 0.0382	0.38
	35°C	10	9.9632 $\pm$ 0.1066	1.07



- **Revalidation:**

Il peut également être nécessaire de revalider dans les circonstances suivantes :

- ✓ changements du procédé de synthèse de la substance médicamenteuse;
- ✓ changements dans la composition du produit fini;
- ✓ changements dans la méthode d'analyse.

La revalidation sera plus ou moins poussée selon la nature des changements.



- **Références bibliographiques:**

- ✓ Guideline, I. H. T. "Validation of analytical procedures Q2 (R1)." *ICH: Geneva, Switzerland* (2022).
- ✓ Guideline, ICH Harmonised Tripartite. "Validation of analytical procedures: text and methodology." Q2 (R1) 1.20 (2005): 05.
- ✓ Borman, Phillip, and David Elder. "Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology." *ICH quality guidelines: an implementation guide* (2017): 127-166.
- ✓ Swartz, Michael E., and Ira S. Krull. *Handbook of analytical validation*. CRC Press, 2012.
- ✓ Feinberg, Max, and Michel Laurentie. "Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude." *Numero special du cahier des techniques de l'Inra* (2010).