

VALIDATION DES MÉTHODES ANALYTIQUES EN INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE



Dr D.BENATTA Maître de conférences en pharmacie galénique

INTRODUCTION

La validation analytique est un pilier fondamental dans l'industrie pharmaceutique pour garantir la fiabilité des résultats obtenus par les méthodes d'analyse. Elle s'inscrit dans le cadre du système d'assurance de la qualité (AQ), qui vise à assurer que les produits pharmaceutiques sont sûrs, efficaces et conformes aux normes réglementaires.

Ce cours expliquera :

- ☐ Ce qu'est la validation analytique.
- ☐ Ses paramètres et ses étapes.
- ☐ Son rôle dans le système d'assurance de la qualité.
- ☐ Les exigences réglementaires (ICH, USP, Pharmacopée Européenne, etc.).
- ☐ Des exemples pratiques appliqués au domaine pharmaceutique.

DÉFINITION DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

- La validation analytique est le processus documenté qui démontre qu'une méthode analytique est adaptée à l'usage prévu.
- Elle garantit que la méthode produit des résultats fiables, reproductibles et précis pour des analyses spécifiques (par exemple, dosage d'un principe actif, identification d'impuretés, contrôle de qualité).
- Selon l'ICH Q2(R1) (International Conference on Harmonisation), la validation analytique consiste à fournir une preuve objective que les performances d'une méthode répondent aux exigences de son application.

OBJECTIFS DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

L'objectif de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est adaptée à l'usage auquel elle a été destinée. C'est l'ensemble des opérations permettant de répondre à des critères de :

- Spécificité
- Linéarité
- Exactitude
- Fidélité
- Intervalle de travail
- Limite de détection
- Limite de quantification
- Robustesse

OBJECTIFS DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

Objectifs

- Fiabilité : Assurer que la méthode donne des résultats cohérents et reproductibles.
- Conformité : Répondre aux exigences réglementaires des autorités (ANSM, EMA, FDA, etc.).
- Qualité : Contribuer à la garantie de la qualité des produits pharmaceutiques.
- Robustesse : Vérifier que la méthode reste performante dans des conditions variables.

TYPES DE MÉTHODES ANALYTIQUES À VALIDER

- Méthodes d'identification (ex. : spectroscopie IR pour confirmer l'identité d'une substance).
- Méthodes de dosage quantitatif (ex. : HPLC pour quantifier un principe actif).
- Méthodes de contrôle des impuretés (ex. : chromatographie pour détecter des impuretés).
- Méthodes de contrôle de pureté (ex. : tests microbiologiques ou physico-chimiques).

TYPES DE MÉTHODES ANALYTIQUES À VALIDER

- Méthodes d'identification (ex. : spectroscopie IR pour confirmer l'identité d'une substance).
- Méthodes de dosage quantitatif (ex. : HPLC pour quantifier un principe actif).
- Méthodes de contrôle des impuretés (ex. : chromatographie pour détecter des impuretés).
- Méthodes de contrôle de pureté (ex. : tests microbiologiques ou physico-chimiques).

MÉTHODE D'ANALYSE

Définition :

- La méthode d'analyse est la manière dont une analyse est réalisée.
- Chaque étape doit être décrite en détail. Il faut décrire notamment, la préparation de l'échantillon, de l'étalon de référence et des réactifs, l'utilisation des appareils, la production de la courbe d'étalonnage, l'application des formules de calcul, etc.

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

1. Spécificité

Définition:

- Capacité de la méthode à mesurer uniquement une substance cible en présence d'autres composants (impuretés, excipients, produits de dégradation).
- 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.
- La spécificité est vérifiée par la confirmation de l'absence d'interférence des composants du produit analysé.
- Comment tester ?
 - Analyse de mélanges contenant la substance cible et des interférents (ex. : chromatographie, spectroscopie).
 - Vérification de l'absence de pics interférents dans les chromatogrammes.

Exemple : En HPLC, on vérifie que les pics des impuretés ne se superposent pas avec celui du principe actif.

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

2. Linéarité

- La linéarité d'une procédure analytique est définie à partir de sa capacité à obtenir des résultats d'essai, directement proportionnels à la concentration de la substance analysée dans les échantillons dans une plage donnée.
- On évalue la linéarité par l'examen d'une courbe des valeurs du signal analytique tracé en fonction de la concentration de la substance à analyser.
- Les paramètres de la courbe de régression peuvent donner une estimation mathématique du degré de linéarité. Il faut déterminer le coefficient de corrélation, le point d'interception sur l'axe des ordonnées, la pente de la courbe de régression

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

2. Linéarité

Définition : Capacité de la méthode à fournir des résultats proportionnels à la concentration de la substance cible dans une plage donnée.

Comment tester ?

- Analyse d'au moins 5 concentrations différentes.
- Traçage de la courbe de calibration (signal vs concentration).
- Calcul du coefficient de corrélation ($R^2 \geq 0,99$).

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

3. 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 : répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité.
- La précision est généralement exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation d'un ensemble de mesures .

$$\text{Ecart type} = \frac{\sqrt{\sum (X_i - \text{moy})^2}}{N_i}$$

Xi: nombre de valeur de résultat
Ni nombre d'échantillon

$$\text{CV \%} = \text{écart-type/moyenne} \times 100).$$

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

3. Précision (répétabilité et reproductibilité)

Définition : Mesure de la variabilité des résultats obtenus dans des conditions identiques (répétabilité) ou dans des conditions différentes (reproductibilité, ex. : différents opérateurs, jours ou laboratoires).

Comment tester ?

- Répétition de l'analyse sur plusieurs échantillons ($n \geq 6$).
- Calcul du coefficient de variation ($CV \% = \text{écart-type} / \text{moyenne} \times 100$).

Critères : CV généralement $< 2\%$ pour les méthodes de dosage.

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

3. Précision

- Répétabilité
- 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 »
- Pour évaluer la répétabilité, il faut au moins neuf mesures englobant l'écart d'utilisation de la méthode (c-à-d trois concentrations avec trois échantillons chacune); ou au moins six mesures d'une concentration à 100 % de la teneur escomptée.
- Le coefficient de variation (RSD) est calculé en utilisant la formule suivante :
- $RSD = \text{Écart type des mesures} \times 100 / \text{Valeur moyenne des mesures}$
- Normes : Le RSD ne doit pas dépasser 2%

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

3. Précision:

- précision intermédiaire

Elle correspond aux variations survenant dans un même laboratoire : analyses effectuées à des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents, etc.

- Reproductibilité

La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement l'uniformisation de la méthodologie).

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

4.Exactitude

- L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'écart entre la valeur acceptée soit comme valeur conventionnelle vraie, soit comme valeur de référence acceptée et la valeur trouvée. Ceci est parfois appelé justesse
- L'exactitude peut être déduite après avoir établi la précision, la linéarité et la spécificité de la méthode en question.
- Pour évaluer l'exactitude de la méthode à valider, il est recommandé d'utiliser au moins neuf résultats obtenus par l'analyse d'au moins trois concentrations avec trois échantillons chacune.

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

4.Exactitude

- Après avoir démontré la spécificité, la linéarité et la précision de la méthode, l'exactitude à trois niveaux peut être étudiée 50%, 100%, 150%, permettant de couvrir l'écart d'utilisation compris entre 80 à 120 % de la concentration analysée .
- Le coefficient de variation (RSD) est déterminé et le recouvrement qui est calculé en utilisant la formule suivante:
- $$\text{Recouvrement} = \frac{\text{Concentration mesurée}}{\text{concentration calculée des standards}} \times 100$$

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

4.Exactitude

Définition : Concordance entre la valeur mesurée et la valeur réelle (ou une valeur de référence).

Comment tester ?

- Analyse d'échantillons dopés avec une quantité connue de la substance à analyser .
- Comparaison des résultats avec une méthode de référence.

Normes :

Le recouvrement doit être entre 95 et 105% .

Le coefficient de variation (RSD) ne doit pas dépasser 2%

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

5.Limite de détection (LOD)

- Définition :

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.

- Comment tester ?

La détermination de la limite de détection est effectuée en utilisant la formule suivante :

- $LOD = 3.3 \times \sigma / S$
- σ : l'écart type qui est calculé en dosant cinq fois le blanc.
- S : la pente de la courbe de linéarité.

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

6.Limite de quantification (LOQ)

- Définition : La limite de quantification d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de précision et d'exactitude.

- Comment tester ?

La détermination de la limite de détection est effectuée en utilisant la formule suivante :

- $LOQ = 10 \times \sigma / S$
- σ : l'écart type qui est calculé en dosant cinq fois le blanc.
- S : la pente de la courbe de linéarité.

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

7.Plage de travail ou l'écart d'utilisation:

- Définition : Intervalle de concentrations pour lequel la méthode est validée (précision, exactitude, linéarité).
- Comment tester ?
 - Vérification que la plage couvre les concentrations attendues (ex. : 80-120 % de la concentration nominale pour les dosages).

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

8. Robustesse

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.

L'évaluation de la robustesse se fait durant la phase de mise au point, elle dépend du type de méthode considérée. Cette évaluation doit démontrer que la méthode demeure fiable lorsqu'on introduit des variations planifiées de paramètres.

Des exemples de variations caractéristiques :

- Stabilité des solutions d'analyse;
- Temps d'extraction.

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

8. Robustesse

- Définition : Capacité de la méthode à rester performante face à de petites variations (ex. : pH, température, débit en HPLC).
- Comment tester ?
 - Étude des variations intentionnelles des paramètres critiques.
 - Analyse de l'impact sur les résultats.

PARAMÈTRES DE VALIDATION ANALYTIQUE

Gestion des Risques



Évaluer les risques potentiels avec soin. Développer des stratégies pour les atténuer. Analyser les modes de défaillance. Gérer les écarts.

EXIGENCES RÉGLEMENTAIRES

Référentiels internationaux

ICH Q2(R1) : Ligne directrice sur la validation des méthodes analytiques.

Pharmacopées : USP <1225>, Ph. Eur. 2.2.46 (validation des méthodes).

Bonnes pratiques de fabrication (BPF/GMP) : Exigent des méthodes validées pour le contrôle qualité.

ISO 17025 : Norme pour l'accréditation des laboratoires d'analyse.

EXIGENCES RÉGLEMENTAIRES

Protocole de validation :

- Plan détaillant les paramètres à tester, les critères d'acceptation et la méthodologie.
- Rapport de validation : Résultats obtenus, comparaison aux critères, conclusions.
- Traçabilité : Toutes les données brutes doivent être archivées.

EXIGENCES RÉGLEMENTAIRES

Rôles des autorités

Les agences (ANSM, EMA, FDA) vérifient la conformité des méthodes validées lors des inspections.

Soumission des données de validation dans les dossiers d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché).

LA VALIDATION ANALYTIQUE DANS LE SYSTÈME D'ASSURANCE QUALITÉ

Rôle de la validation analytique dans l'AQ

- Garantie de fiabilité : Les méthodes validées assurent des résultats fiables pour le contrôle des matières premières, produits intermédiaires et finis.
- Conformité réglementaire : La validation répond aux exigences des BPF et des autorités.
- Prévention des risques : Une méthode non validée peut entraîner des erreurs (ex. : sous-dosage ou contamination non détectée).
- Amélioration continue : Les données de validation alimentent les analyses de tendances et les investigations en cas de déviations.

ÉTAPES PRATIQUES DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

Planification

- Identifier le type de méthode et les paramètres à valider (selon ICH Q2).
- Définir les critères d'acceptation (ex. : précision $\leq 2\%$, récupération 98-102 %).
- Rédiger un protocole de validation.

ÉTAPES PRATIQUES DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

Réalisation des tests

- Préparer des échantillons (placebo, échantillons dopés, standards).
- Effectuer les analyses selon le protocole (ex. : 6 répétitions pour la précision).
- Enregistrer toutes les données brutes.

ÉTAPES PRATIQUES DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

Analyse des résultats

- Calculer les paramètres (CV, récupération, R^2 , etc.).
- Comparer aux critères d'acceptation.
- Identifier les écarts éventuels et leurs causes.

ÉTAPES PRATIQUES DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

Documentation

- Rédiger un rapport de validation.
- Archiver les données pour les audits.

ÉTAPES PRATIQUES DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

Maintenance des méthodes validées

- Revalidation : Nécessaire en cas de changements (ex. : modification de l'équipement).
- Vérifications périodiques : Contrôles de routine pour confirmer la performance.

ÉTUDES DE CAS

Cas 1 : Validation d'une méthode HPLC pour le dosage d'un principe actif

Objectif : Mesurer la concentration d'ibuprofène dans un comprimé.

Paramètres testés :

- Spécificité : Absence d'interférence des excipients.
- Précision : CV = 1,2 % (n=6).
- Exactitude : Récupération = 99,5 %.
- Linéarité : $R^2 = 0,999$ sur 50-150 % de la concentration nominale.

Résultat : Méthode validée pour le contrôle qualité.

ÉTUDES DE CAS

Cas 2 : Validation d'une méthode de détection des impuretés

Objectif : Identifier les impuretés dans une matière première.

Paramètres testés :

- Spécificité : Séparation des pics d'impuretés.
- LOD/LOQ : Détection à 0,05 % et quantification à 0,1 %.
- Robustesse : Résultats stables avec variation du pH ($\pm 0,2$ unité).

Résultat : Méthode adaptée au contrôle des impuretés.