

Validation des méthodes d'électrophorèse capillaire appliquées à l'analyse des composés pharmaceutiques

H. Fabre

Faculté de Pharmacie, Avenue Charles Flahault, 34060 Montpellier Cedex 2, France

Guidelines are given on how to carry out validation for methods using capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. The similarities and differences with that of method validation in high performance liquid chromatography are outlined. The different validation criteria are successively examined and illustrated with examples issued from the different application areas of capillary electrophoresis in the pharmaceutical industry : assay of a main component, determination of impurities, chiral separations and small ions analysis.

Introduction

La reconnaissance de l'EC comme technique d'analyse par les autorités réglementaires autorisant la mise sur le marché des spécialités pharmaceutiques est à la base du développement qu'elle connaît dans les laboratoires de Recherche et Développement et les laboratoires de Contrôle de l'industrie pharmaceutique. Une enquête [1] menée en 1994 auprès de 26 grandes compagnies pharmaceutiques de Grande Bretagne et des États-Unis avait révélé qu'à cette date des méthodes d'EC avaient été incluses dans plusieurs dossiers d'autorisation de mise sur le marché (AMM) de spécialités pharmaceutiques et acceptées sans problèmes. Depuis lors, l'EC est utilisée en routine dans de nombreuses compagnies pharmaceutiques [2-3], plusieurs compagnies pharmaceutiques ont inclus ou soumis des méthodes d'EC dans les dossiers d'enregistrement de nouveaux médicaments [4-5], Les premières monographies contenant des méthodes d'EC pour le chlorhydrate d'éthambutol et le borate d'épinéphryl [5-6] devraient être introduites dans la pharmacopée des États-Unis et un avant-projet de monographie générale sur l'EC a été proposé [7] pour cette même pharmacopée. Le présent article a pour but de donner à l'analyste nouvellement confronté à l'utilisation de cette technique, des recommandations en matière de validation des méthodes. Les critères à valider et la méthodologie de validation en EC ne diffèrent pas fondamentalement de ceux appliqués par exemple en chromatographie liquide haute performance (CLHP), tech-

nique de loin la plus utilisée dans le contrôle pharmaceutique, mais il existe des aspects particuliers inhérents à l'EC [8] qu'il est important de considérer. Nous examinerons les principales caractéristiques de validation des méthodes en EC en soulignant les similarités et différences par rapport à la CLHP. Les différents points de la validation seront illustrés par quelques exemples issus de notre laboratoire [9-12] ou empruntés à la littérature [13-29]. Ces exemples, destinés à montrer les performances de la technique, couvrent les principaux secteurs d'application de l'EC dans l'industrie pharmaceutique [1] : détermination du titre d'une substance, identification, dosage d'impuretés, séparations chirales et dosage des « petits ions ».

Cadre réglementaire de la validation analytique en matière d'analyse pharmaceutique

Pour l'analyse pharmaceutique, la référence internationale de base en matière de validation analytique est actuellement constituée par deux textes [30-31] publiés dans le cadre d'ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Ces textes ont été établis pour combler les différences qui existent souvent entre différents recueils et textes réglementaires de l'Union Européenne, des États-Unis et du Japon. Ils constituent des « recommandations » ; des approches différentes peuvent être proposées mais elles doivent être justifiées dans le dossier d'AMM.

Ces textes concernent la validation des procédures d'analyse les plus communes :

- procédures d'identification permettant de s'assurer de l'identité d'un analyte dans un échantillon,
- procédures concernant les tests limites ou tests quantitatifs d'impuretés destinés à évaluer la pureté de l'échantillon,
- procédures de détermination du titre d'un échantillon.

Les caractéristiques à étudier (Tab. I) et la méthodologie à appliquer varient en fonction du type de procédure à valider.

Tableau I. Critères de validation en fonction du type de procédure à valider (d'après les recommandations de la Conférence Internationale d'Harmonisation) [30].

Critères	Type de procédure à valider			
	Identification	Dosage d'impuretés	Test limite d'impuretés	Dosage comp. majeur
Exactitude	-	+	-	+
Fidélité				
<i>Répétabilité</i>	-	+	-	+
<i>Fidélité intermédiaire</i>	-	+	-	+
Spécificité (2)	+	+	+	+
Limite de détection	-	-	+	-
Limite de quantification	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Intervalle	-	+	-	+

- Signifie que le critère n'est normalement pas évalué,

+ signifie que le critère est normalement évalué,

(1) dans les cas où la reproductibilité (analyse inter-laboratoires) a été évaluée, la fidélité intermédiaire n'est pas nécessaire,

(2) le manque de spécificité d'une procédure d'analyse pourrait être compensé par l'utilisation d'autres procédures d'analyse,

(3) peut être nécessaire dans certains cas.

Étude des critères de validation en EC : similitudes et aspects particuliers par rapport à la CLHP

Spécificité (*specificity*)

La spécificité correspond à la capacité de la méthode de déterminer l'analyte de manière non univoque en présence de composés susceptibles d'être présents. Notons que le terme sélectivité paraît un terme plus approprié que le terme spécificité adopté par ICH.

La spécificité est confirmée en montrant que le résultat analytique n'est pas affecté par la présence d'impuretés, produits de dégradation, intermédiaires de synthèse et/ou d'excipients.

Pour un test d'impuretés ou une détermination de titre dans une matière première la spécificité de la méthode est testée en EC comme en CLHP, en préparant des solutions de l'analyte surchargées à un niveau de concentration approprié avec les composés susceptibles d'interférer (produits de dégradation, intermédiaires de synthèse, ...). Si les impuretés ou produits de dégradation ne sont pas disponibles, des solutions de l'analyte dégradées dans des conditions forcées (lumière, pH, chaleur, oxydation, hydrolyse acide ou alcaline) sont injectées et les profils de séparation sont examinés. Pour la détermination du titre d'un principe actif dans une formulation, la non-interférence des excipients de la formulation et des solvants d'extraction doit aussi être étudiée en injectant une solution de placebo analytique traité suivant la procédure à valider.

Il est également recommandé de tester comme en chromatographie liquide la pureté du pic électrophorétique.

L'approche la plus commune est l'utilisation de détecteurs à barrette de diodes qui équipent la plupart des appareils d'EC et permettent à l'aide de techniques diverses (superposition spectrale, rapport d'absorbance à deux longueurs d'onde, « match factor »...) de s'assurer de la pureté des pics [9,30]. La détection des impuretés dans un pic est limitée comme en CLHP [33] par les différences spectrales entre le composé principal et l'impureté et le degré de résolution entre l'impureté et l'analyte. Il est également possible de vérifier l'homogénéité des pics en utilisant l'EC en tant que méthode micro-préparative. Si la méthode est bien contrôlée, des injections répétées en séquence permettent de recueillir des fractions suffisantes et de les réanalyser avec une autre technique, par exemple la CLHP [14] : l'obtention d'un seul pic permet de conclure à la pureté de la fraction collectée.

D'autres aspects plus particuliers à l'EC doivent être examinés au stade de la validation, notamment la répétabilité de la sélectivité.

En EC, une électrolyse du tampon se produit au cours des séparations sous l'effet de la tension appliquée : elle se traduit par une acidification de l'électrolyte du côté anodique et une alcalinisation du côté cathodique. Ce changement dans la valeur du pH varie en fonction de la capacité tampon et de la force ionique de l'électrolyte, de la tension appliquée, du volume des flacons d'électrolyte et de la durée de séparation. Le changement de pH peut affecter fortement la sélectivité des séparations et conduire même à une inversion des pics [33] puisque le pH contrôle le taux d'ionisation des espèces et le niveau du flux électroosmotique. Il est donc important de déterminer au stade de la validation la répétabilité des temps de migration et de notifier dans le protocole le nombre

maximum d'injections qui peuvent être réalisées avec un même couple de flacons de séparation.

Il faudra aussi vérifier dans le cas des séparations chirales réalisées avec des cyclodextrines (CD) substituées si la sélectivité de la séparation est maintenue en utilisant différents lots de CD et/ou des CD issus de différents fournisseurs. En effet, les CD substituées peuvent présenter des degrés de substitutions différents ou des substituants en différentes positions sur la CD ou avoir des taux de pureté différents qui peuvent influencer la sélectivité de la séparation énantiomérique [26-27,35-36].

Linéarité

La linéarité de la réponse en fonction de la concentration doit être étudiée dans un intervalle de concentration approprié.

En EC comme en CLHP, la linéarité de la gamme d'étalonnage est en général établie avec 5 concentrations minimum. Dans le cas de l'analyse d'un produit principal, la gamme de linéarité étudiée se situe entre 80 – 120 % ou 50 – 150 % ou 40 – 160 % de la concentration cible où se situe le dosage. Pour les impuretés, la linéarité doit être démontrée en présence du produit principal, en maintenant sa concentration fixe et en ajoutant des concentrations croissantes de l'impureté ; l'intervalle de linéarité étudié se situe autour du taux maximum d'impuretés toléré ; si le taux maximum toléré est de 0,1 % (m/m) par rapport au produit principal l'intervalle étudié sera par exemple 0,05 % – 0,2 % (m/m) ou au-delà.

En EC, l'analyse quantitative est effectuée le plus souvent en utilisant les surfaces de pics plutôt que les hauteurs car la gamme de linéarité est plus étendue avec les surfaces [37]. Il doit être noté aussi que la gamme dynamique des détecteurs UV en EC est plus limitée qu'en CLHP, en raison de la géométrie cylindrique de la cellule de détection. Cette gamme dynamique est le plus souvent suffisante pour réaliser le dosage des impuretés apparentées en % (surface/surface), à l'intérieur d'une même injection. Si le composé majeur (présent à forte concentration pour pouvoir quantifier les impuretés) donne un signal situé en dehors de la zone de linéarité, il est possible de remédier à ce problème en réalisant deux injections : l'une correspondant à une quantité faible de l'échantillon permettra d'obtenir une réponse du composé majeur dans la zone de linéarité, l'autre correspondant à une quantité forte de l'échantillon permettra de détecter et quantifier les impuretés. Ces deux injections peuvent être réalisées en EC à partir d'une seule solution concentrée de l'échantillon en faisant varier le volume injecté [38]. Le taux d'impuretés est ensuite calculé en tenant compte des volumes injectés. Il est essentiel dans le calcul du taux d'impuretés en % (surface/surface) d'utiliser les surfaces corrigées (surface/temps de migration) pour tenir compte des temps de résidence différents des espèces dans la fenêtre du détecteur.

La relation surface-concentration est linéaire [9-11,13,15-19,22-28,30]. Les droites d'étalonnage passent par l'origine lorsque des volumes constants de solutions de concentration croissante sont injectés, mais ne passent pas par l'origine [9] lorsque des volumes croissants d'une solution de concentration

constante sont injectés, en raison du phénomène d'injection « spontanée ».

Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse d'accord entre la valeur trouvée et la valeur acceptée comme vraie ou acceptée comme référence.

Pour la détermination du titre du principe actif dans une matière première, l'exactitude de la procédure peut être testée en comparant les résultats obtenus avec ceux d'une méthode indépendante dont les caractéristiques sont connues ou en déterminant le titre sur un matériau de référence. Pour la détermination du titre dans une forme pharmaceutique, l'exactitude est validée : i) le plus souvent en préparant puis en dosant, selon la procédure, des formulations reconstituées, surchargées en analyte à concentration variable ; un minimum de 3 répétitions à 3 concentrations est recommandé ; ii) si les composants ne sont pas disponibles, en comparant les résultats obtenus à ceux d'une méthode indépendante ou en ajoutant à l'échantillon à analyser des quantités connues d'analyte et en vérifiant si les surcharges sont retrouvées. Cette dernière approche ne permet pas de s'assurer de l'absence d'interférences de la matrice sur la réponse de l'analyte, aussi la vérification de l'homogénéité des pics avec un détecteur à barrettes de diodes, constitue-t-elle un complément utile de cette approche.

Pour les impuretés, l'exactitude est validée en ajoutant des quantités connues d'impuretés aux échantillons ; si les impuretés ne sont pas disponibles, les résultats peuvent être comparés à ceux d'une procédure indépendante.

L'utilisation d'une « technique orthogonale », basée sur un principe différent, pour vérifier l'exactitude d'une méthode d'EC est souvent utilisée dans l'industrie pharmaceutique, surtout pour dénombrer et doser les impuretés dans les principes actifs [40]. Ainsi, pour la détermination du titre du céfotaxime et du taux de ses impuretés apparentées, il a été montré que les résultats d'EC sont en bonne concordance avec ceux de la CLHP [9-10]. L'analyse de traces de principes actifs à partir de tampons d'écouvillonnage, réalisée dans le cadre de la validation des procédures de nettoyage des cuves de fabrication de composés pharmaceutiques, a montré des résultats concordants entre ces deux méthodes [18]. Le taux de produits de dégradation formés dans des essais de dégradation forcée du chlorhydrate de mitoguozone [29] a été trouvé similaire en utilisant l'EC et la CLHP. Il est important de noter que pour que les taux de produits de dégradation en % (surface/surface) puissent être comparés, les facteurs de réponse des impuretés doivent être du même ordre de grandeur que celui du produit principal pour les deux méthodes (ce qui implique l'utilisation de pH de séparation et de longueur d'ondes de détection similaires). Dans le domaine des séparations chirales, une bonne concordance existe entre les résultats de dosage obtenus avec des méthodes d'EC et les séparations chromatographiques sur colonne chirale, comme le montre le dosage de la ropivacaine (R) dans des solutés injectables de ropivacaine (S) [27] ou la détermination de la composition énantiomérique d'un principe actif [12]. Dans le domaine du dosage des petits ions, les résultats de la validation croisée EC-complexométrie ont montré la

validité de l'EC pour déterminer la stoechiométrie d'un principe actif, l'acamprosate de calcium [11].

Fidélité

La fidélité exprime le degré de dispersion entre une série de mesures obtenues à partir de prises d'essai multiples d'un même échantillon homogène dans des conditions déterminées. Elle doit être effectuée sur des échantillons réels, à défaut sur des échantillons reconstitués. Elle peut être établie à trois niveaux : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.

La répétabilité

Elle exprime la fidélité lorsque les mêmes conditions opératoires (même analyste, même appareil, ...) sont appliquées sur un court intervalle de temps.

La répétabilité du système est évaluée en EC comme en CLHP par injections successives (souvent dix injections) d'une même solution étalon. Les réponses analysées sont les temps de migration (ou les mobilités) et les surfaces (ou les hauteurs). Parmi les principaux facteurs qui contribuent à assurer une bonne répétabilité des temps de migration et des surfaces en EC [39] figurent la capacité tampon de l'électrolyte, l'introduction d'étapes de rinçage entre injections, le volume injecté et l'utilisation d'un étalon interne.

La répétabilité des temps de migration est un paramètre important si les temps de migration sont utilisés pour confirmer l'identité des substances ; elle est souvent voisine de 1 % en EC. La mobilité des espèces (calculée en ajoutant un marqueur de flux électroosmotique à l'échantillon) ou les temps de migration relatifs par rapport à un étalon interne permettent une identification plus sûre car ils conduisent à une meilleure répétabilité [41]. Ainsi, les coefficients de variation des temps de migration relatifs du calcium par rapport au magnésium, choisi comme étalon interne, sont inférieurs à 0,1 % sur deux capillaires de fournisseurs différents [11].

La répétabilité des surfaces ou des surfaces corrigées en EC est souvent voisine de 1 – 2 % pour un produit principal [23], ce qui est souvent insuffisant pour l'analyse pharmaceutique. Aussi est-il recommandé, chaque fois que cela est possible, d'utiliser un étalon interne pour s'affranchir des variations du système d'injection : la répétabilité des surfaces relatives est alors souvent inférieure à 1 % et comparable à la CLHP [2,11,23].

La répétabilité de la procédure dans son ensemble doit aussi être évaluée comme en CLHP en répétant la procédure dans sa totalité (préparation de l'étalon et de l'échantillon) avec $n \geq 6$ déterminations indépendantes, ou en testant séparément la répétabilité de préparation de l'échantillon et de l'étalon respectivement ($n \geq 6$). Des coefficients de variation voisins de 1 % sont couramment obtenus en utilisant un étalon interne sur les solutions échantillons de matière première ou dans le cas de formulations où le protocole analytique de préparation de l'échantillon est simple [11,22-23,25].

Fidélité intermédiaire

Ce terme désigne dans ICH, les variations à l'intérieur d'un même laboratoire quand un ou plusieurs facteurs sont chan-

gés ; les facteurs changés sont le plus souvent le jour/et ou l'analyste, et/ou l'appareillage... Dans tous les cas il faudra préciser le ou les facteurs que l'on fait varier.

Variations entre jours

Ces variations sont étudiées en préparant chaque jour une nouvelle solution d'électrolyte, de solution étalon et échantillon. De faibles variations sont en général observées [11,27-28].

Variations entre capillaires

Les séparations doivent être répétées sur différents lots de capillaires ou sur des capillaires de différents fournisseurs ; une bonne concordance a été trouvée pour les TM relatifs et les surfaces relatives Ca/Mg sur deux capillaires issus de fournisseurs différents [11-28].

Variations entre lots de réactifs

Nous avons déjà mentionné dans l'étude de la spécificité qu'il était important de tester, en particulier, différents lots et/ou fournisseurs de cyclodextrines substituées. Si des électrolytes prêts à l'emploi sont utilisés, différents lots devront être également testés.

Variations entre analystes

Chaque analyste devra préparer son capillaire, ses solutions d'électrolyte, d'étalon et d'échantillon.

Variations entre appareils

Les méthodes analytiques dans l'industrie pharmaceutique sont destinées à être utilisées dans plusieurs laboratoires et donc en général sur divers appareils. En chromatographie liquide, le facteur « appareil » n'est pas considéré comme un facteur essentiel au stade de la validation, sauf dans le cas de méthodes utilisant un gradient de solvants. Par contre, en EC les appareillages présentent des systèmes d'introduction de l'échantillon différents (utilisant la pression, le vide, la différence de niveau entre flacons) et différents systèmes de contrôle de température du capillaire (refroidissement par liquide réfrigéré, par air pulsé...). D'autre part, les capillaires ont des longueurs totales et des distances du point d'injection à la fenêtre optique différents. Il en résulte que les conditions opératoires devront être légèrement modifiées d'un appareil à l'autre et qu'il peut être important de tester si la méthode est transférable sur des appareils différents.

Reproductibilité

Ce terme désigne pour ICH la *fidélité entre laboratoires* (analyses collaboratives). L'étude de la reproductibilité n'est pas listée dans les critères à évaluer dans le cadre du dossier d'AMM ; elle est souvent appliquée à la standardisation de la méthodologie, par exemple pour les méthodes pharmacopées.

Des méthodes d'EC portant sur une séparation chirale [15], la détermination de la stoechiométrie d'un principe actif [16] et le titre d'un principe actif dans une formulation [17] ont été appliquées par sept compagnies pharmaceutiques, utilisant des appareils de conception différente. Les résultats satisfaisants d'un point de vue sélectivité, exactitude et répétabilité ont

montré que les méthodes d'EC peuvent être transférées entre sites. L'utilisation en routine de diverses méthodes d'EC sur différents sites et dans différents laboratoires confirme que les méthodes d'EC, correctement validées, ne posent pas de problèmes particuliers [2,23,25].

Robustesse

La robustesse est une mesure de la capacité de la méthode de rester non affectée par des variations faibles, délibérément introduites dans les paramètres de la méthode. Elle donne une indication de la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation. La robustesse n'est pas listée dans les critères de validation de ICH mais il est noté qu'elle doit être considérée à une étape appropriée du développement de la procédure d'analyse. Les tests de robustesse permettent de fixer des tolérances sur chacun des facteurs de la méthode.

La robustesse est le plus souvent étudiée en faisant varier les paramètres de la méthode simultanément selon une matrice d'expériences bien définie. Les facteurs testés sont les facteurs considérés critiques dans les séparations : composition de l'électrolyte (pH, force ionique, concentration en ion absorbant en détection UV indirecte, concentration en cyclodextrines, en tensio-actif ou en modifiant organique), tension appliquée, temps d'injection, température de séparation, longueur d'onde de détection. Les réponses étudiées sont la résolution, les temps de migration, le nombre de plateaux théoriques ou les surfaces de pics. Des plans factoriels fractionnaires saturés [21] ou non saturés [19,20,22,24,27] ont été utilisés pour optimiser les méthodes et dépister les facteurs critiques. Les plans fractionnaires autres que les plans saturés ont été le plus souvent utilisés car les possibilités d'interactions entre facteurs sont plus élevées en EC qu'en CLHP [8]. Ils ont été appliqués à des méthodes concernant des séparations chirales [27], le dosage de solvants organiques [24] de contre-ions [20,22] ou d'impuretés [18]. Les facteurs trouvés significatifs dans ces plans de criblage ont été quelquefois étudiés dans un plan de surface de réponse [19,20] qui donne un descriptif plus complet de l'effet des facteurs dans la région de la méthode. La réalisation des tests de robustesse implique un grand nombre d'expériences qui est facilité en EC par la complète automatisation de l'appareillage et par le fait que l'équilibre du capillaire entre les changements d'électrolyte est rapidement atteint.

Stabilité des solutions

En EC, comme en CLHP, il est nécessaire de déterminer le temps pendant lequel les solutions échantillons et les solutions étalons peuvent être utilisées sans dégradation notable ; la stabilité est souvent établie à 4 °C, à température ambiante et dans le passeur d'échantillons. L'utilisation d'un passeur réfrigéré peut être nécessaire pour retarder une éventuelle dégradation. Dans le cadre d'un test d'impuretés, la stabilité du principe actif (en solution à forte concentration) après sa mise en solution peut être particulièrement critique pour s'assurer de la fiabilité des dosages de l'impureté. Ainsi, il a été montré que le dosage du déacétylcéfotaxime, produit de dégradation du céfotaxime, doit être effectué en utilisant un passeur d'échantillon réfrigéré à 5 °C et dans l'heure qui suit la préparation

de la solution de céfotaxime, car le céfotaxime s'hydrolyse rapidement en déacétylcéfotaxime [10].

Un aspect propre à l'EC concerne l'étude de la stabilité de la solution d'électrolyte. En raison des faibles volumes consommés quotidiennement (10 à 20 mL/jour), l'électrolyte est utilisé sur plusieurs jours, voire plusieurs semaines ou plusieurs mois. Il sera donc essentiel de déterminer la durée de vie des solutions d'électrolyte. Cette stabilité est très variable suivant le type d'électrolyte : le tampon borate de sodium peut être conservé au moins trois mois à température ambiante [2], tandis que l'électrolyte chromate-bromure de tétradécyltriméthylammonium [42] devra être préparé journellement.

Limite de détection (LD) et de quantification (LQ)

La LD correspond à la *quantité la plus faible d'analyte qui peut être détectée dans l'échantillon, mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte.* Elle est souvent définie comme la quantité d'analyte qui donne un rapport signal/bruit égal à 3.

La LQ correspond à la *quantité d'analyte la plus faible qui peut être quantifiée avec une exactitude et une fidélité convenables.* Elle n'est évaluée que pour les impuretés et les produits de dégradation. Un coefficient de variation voisin de 10 % et une exactitude voisine de ± 10 % sont en général tolérés au niveau de la LQ.

Les limites de détection et de quantification peuvent être évaluées comme en CLHP en se basant sur une évaluation visuelle, sur le rapport signal sur bruit ou sur l'écart-type de la réponse et la pente de la droite d'étalonnage [32]. Les estimations devront être validées en analysant les échantillons surchargés à ce niveau ($n \geq 6$).

En général, la LD (en concentration) en EC est supérieure à celle en CLHP ; cependant des impuretés du céfotaxime ont pu être dosées en EC à un taux de 0,02 % (surface/surface totale) alors qu'elles n'étaient pas détectables en CLHP [10]. Des impuretés à des taux $\leq 0,05$ % ou moins sont couramment détectées ou dosées dans les principes actifs [43,44].

Les facteurs contribuant à abaisser la LD et la LQ sont l'augmentation du diamètre du capillaire (qui a pour effet d'augmenter le parcours optique et le volume injecté), l'augmentation du temps ou de la pression d'injection, l'utilisation d'un solvant de l'échantillon de faible conductivité par rapport à l'électrolyte, le choix d'un tampon dont les ions ont une mobilité voisine de l'analyte, l'utilisation de cellules en forme de « bulle » ou en Z haute sensibilité. Enfin il est souvent possible d'abaisser la LD en détectant les composés à des longueurs d'onde basses (200 nm) qui ne peuvent être utilisés en CLHP à cause de l'absorption des solvants organiques de la phase mobile.

Intervalle d'application

L'intervalle d'application de la méthode correspond à l'intervalle (concentration inférieure et supérieure incluses) dans lequel la procédure s'est révélée satisfaisante d'un point de vue exactitude, fidélité et linéarité. Elle ne doit pas être utilisée en dehors de ces limites.

Conclusion

Nous avons essayé de donner dans cet article un aperçu général de la validation des procédures d'analyse utilisant l'électrophorèse capillaire dans le domaine de l'analyse pharmaceutique, en soulignant les aspects particuliers qu'elle présente par rapport à la validation en chromatographie liquide. Ces points particuliers concernent notamment :

- le capillaire (lot, fournisseur),
- la source de réactifs (par ex. : lot et fournisseur de cyclo-dextrines, d'électrolyte prêts à l'emploi...),
- la stabilité des solutions d'électrolyte,
- la répétabilité à long terme des injections (effet d'appauvrissement du tampon),
- l'étude de la robustesse (surtout pour la détection UV indirecte),
- le transfert de méthodes entre appareils.

Il est d'autre part important de souligner qu'un protocole de méthode d'EC doit mentionner :

- le procédé de traitement du capillaire neuf,
- la procédure de rinçage entre injections,
- la procédure de rinçage et de stockage du capillaire,
- la préparation détaillée du tampon.

En routine, il est recommandé de dédier un capillaire à chaque application (surtout lorsque des tensio-actifs sont incorporés à l'électrolyte) et de vérifier avant chaque série d'analyses, que le système est opérationnel en réalisant des tests de conformité (répétabilité d'une série d'injections, calcul de la sélectivité et de la résolution entre les paires critiques de composés, du nombre de plateaux théoriques et vérification de la limite de détection pour les impuretés).

Ces remarques générales peuvent être étendues à d'autres domaines que celui de la pharmacie (chimie, agro-alimentaire, cosmétologie...).

Références

- Altria, K. D.; Kersey, M. *LC-GC* **1995**, *8*, 201-208.
- Altria, K. D.; Bryant, S. M.; Hadgett, T. A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1091-1101.
- Communications personnelles.
- Brettnall, A. E.; Hodgkinson, M. M.; Clarke, G. S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1071-1075.
- Weinberger, R. *Amer. Lab.* **1997**, *38*.
- Cecil, T. L. Capillary Electrophoresis : USP Case Studies, Capillary Electrophoresis Conference, Washington, DC (USA), 4-5 décembre 1997.
- Pharm. Forum.* **1996**, 1725-1735.
- Altria, K. D.; Rudd, D. R. *Chromatographia* **1995**, *41*, 325-331.
- Fabre, H.; Castaneda Penalvo, G. *J. Liquid Chromatogr.* **1995**, *18*, 3877-3887.
- Castaneda Penalvo, G.; Julien, E.; Fabre, H. *Chromatographia* **1996**, *42*, 159-164.
- Fabre, H.; Blanchin, M. D.; Julien, E.; Segonds, C.; Mandrou, B.; Bosc, N. *J. Chromatogr. A* **1997**, *772*, 265-269.
- Segonds, C.; Fabre, H. Poster, Prague (République Tchèque), Tenth ITP 96, 17-20 septembre 1996.
- Thomas, B. R.; Ghodbane, S. *J. Liquid Chromatogr.* **1993**, *16*, 1983-2006.
- Altria, K. D.; Dave, Y. K. *J. Chromatogr. A* **1993**, *633*, 221-225.
- Altria, K. D.; Harden, R. C.; Hart, M.; Hevizi, J.; Hailey, P. A.; Makwana, J. V.; Porsmouth, M. J. *J. Chromatogr. A* **1993**, *641*, 147-153.
- Altria, K. D.; Clayton, N. G.; Hart, M.; Harden, R. C.; Hevizi, J.; Makwana, J. V.; Porsmouth, M. J. *Chromatographia* **1994**, *39*, 180-184.
- Altria, K. D.; Clayton, N. G.; Harden, R. C.; Makwana, J. V.; Porsmouth, M. J. *Chromatographia* **1995**, *40*, 47-50.
- Altria, K. D.; Hadgett, T. A. *Chromatographia* **1995**, *40*, 23-27.
- Altria, K. D.; Filbey, S. D. *Chromatographia* **1994**, *39*, 306-310.
- Filbey, S. D.; Altria, K. D. *J. Capil. Electroph.* **1994**, *3*, 190-195.
- Rogan, M. M.; Altria, K. D.; Goodall, D. M. *Chromatographia* **1995**, *38*, 723-729.
- Altria, K. D.; Assi, K. H.; Bryant, S. M.; Clark, B. J. *Chromatographia* **1997**, *44*, 367-371.
- Altria, K. D.; Frake, P.; Gill, I.; Kelly, M. A.; Rudd, D. R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1995**, *13*, 951-957.
- Altria, K. D.; Howells, J. S. *J. Chromatogr. A* **1995**, *696*, 341-348.
- Altria, K. D.; Elgey, J.; Howells, J. S. *J. Chromatogr. B* **1996**, *696*, 111-117.
- Sänger-van de Griend, C. E.; Gröningsson, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 295-301.
- Sänger-van de Griend, C. E.; Wahlström, C.; Gröningsson, K.; Widahl-Näsman, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1051-1061.
- Tjornelund, J.; Hansen, S. H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1077-1082.
- Thomson, C. E.; Gray, M. R.; Baxter, M. P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1103-1111.
- Fotsing, L.; Fillet, M.; Bechet, I.; Hubert, P.; Crommen, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1113-1123.
- Text on Validation of Analytical Procedures, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for human use., IFPMA Ed., Genève, 1994.
- Text on Validation of Analytical Procedures: Methodology International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for human use., IFPMA Ed., Genève, 1996.
- Fabre, H.; Le Bris, A.; Blanchin, M. D. *J. Chromatogr. A* **1995**, *697*, 81-88.
- Shafaati, A.; Clark, B. J. *Anal. Proc.* **1993**, *30*, 481-483.
- Rickard, E. C.; Bopp, R. J. *J. Chromatogr. A* **1994**, *680*, 609-621.
- Cai, H.; Nguyen, T. V.; Vigh, G. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 580-589.
- Watzig, H. *J. Chromatogr. A* **1995**, *700*, 1-7.
- Altria, K. D. *Chromatographia* **1993**, *35*, 493-496.
- Altria, K. D.; Fabre, H. *Chromatographia* **1995**, *40*, 313-320.
- Altria, K. D. *J. Chromatogr. A* **1993**, *646*, 245-247.
- Wielgos, T.; Havel, K.; Turner, P. poster HPCE 98, Orlando (USA), 1-5 Février 1998.
- Altria, K. D.; Bryant, S. M. In: Quantitative analysis of small ions by capillary electrophoresis, Manuel Beckman, 1997; p 39.
- Altria, K. D. *J. Chromatogr. A* **1996**, *735*, 43-56.
- Fabre, H.; Perrin, C.; Bosc, N. *J. Chromatogr. A* **1999** (sous presse).