

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU"
CLUJ-NAPOCA**

FACULTATEA DE FARMACIE



IOLANDA NISTOR

**OPTIMIZAREA METODELOR SEPARATIVE PRIN INTERMEDIUL
METODOLOGIEI PLANIFICARE
EXPERIMENTALA – DESIGN SPACE**

**Rezumatul tezei de doctorat
în vederea obținerii titlului științific de
Doctor în Științe Medicale, domeniul Farmacie**

**Coordonatori științifici
Prof. Dr. RADU OPREAN
Prof. Dr. PHILIPPE HUBERT**

2012

Cuprins

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII	14
1. Cromatografie lichida	16
1.1. Aspecte istorice	16
1.2. Principii de baza	17
1.3. Tipuri de cromatografie lichida	18
1.4. Parametri cromatografici	19
1.5. HPLC contemporan	22
1.6. Dezvoltarea metodelor cromatografice	23
2. Proceduri de reglementare in domeniul dezvoltarii biofarmaceutice	25
2.1. Calitate prin design (QbD)	25
2.2. Parametrul critic de calitate (CQA)	25
2.3. Parametrii critici ai procesului (CPPs)	26
2.4. Sistem de conceptie (DS)	26
2.5. Riscul in managementul calitatii	27
3. Chemometrie aplicata dezvoltarii metodelor analitice	27
3.1. Planificare experimentală (DoE)	28
3.2. Designul suprafetelor de raspuns	29
3.3. Intervale de toleranta	29

CONTRIBUȚII PERSONALE	33
1. Obiective	35
2. Metodologia planificare experimentală – design space	35
2.1. Introducere	35
2.2. Materiale și metode	37
2.3. Rezultate și discuție	45
2.4. Concluzii	55
3. Aplicarea unei noi strategii de optimizare pentru separarea alcaloizilor terciari extrași din frunzele de <i>Strychnos</i> <i>usambarensis</i>	57
3.1. Introducere	58
3.2. Materiale și metode	61
3.3. Rezultate și discuție	64
3.4. Concluzii	74
4. Implementarea abordării Design Space pentru separări enantiomerice în cromatografia solvenților organici polari	80
4.1. Introducere	80
4.2. Materiale și metode	82
4.3. Rezultate și discuție	88
4.4. Concluzii	102
5. Concluzii generale	106
6. Originalitatea tezei	108
REFERINȚE	109

Cuvinte-cheie: HPLC, planificare experimentală, spațiu de concepție, metodă de optimizare, *Strychnos usambarensis*, compus chiral, enantioseparare.

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cromatografia lichidă este tehnica analitică de primă alegere în domeniul farmaceutic. Aceasta este folosită în principal pentru a separa, identifica și cuantifica compuși de interes și substanțele corespunzătoare. Cromatografia lichidă a devenit o necesitate pentru controlul calității medicamentelor, studiul de stabilitate sau furnizarea informațiilor calitative și cantitative pentru cercetători în discipline variate ca și chimia sintetică, toxicologie, chimie farmaceutică. Cercetarea care este în căutarea unor strategii inovatoare pentru dezvoltarea unor metode cromatografice este, prin urmare, tot mai importantă în domeniul analitic.

În mediul actual ghidat de conceptele de calitate prin design (QbD) și spațiu de concepție (DS), recomandate de Conferința Internațională privind Armonizarea (ICH), metodologiile pentru optimizarea metodelor cromatografice ar trebui să ofere analiștilor, alături de condiții cromatografice robuste, o bună înțelegere a procesului de optimizare și o credibilitate sporită a predicțiilor.

Prima parte a tezei este structurată în trei capitole ce reprezintă o prezentare succintă a conceptelor de cromatografie lichidă, a procedurilor de reglementare pentru dezvoltarea biofarmaceutică și chemometrie aplicată dezvoltării metodelor analitice.

În partea de contribuții personale a acestei lucrări, primul capitol descrie testarea unei metodologii ce combină atât modelarea comportamentului cromatografic al compușilor, cât și optimizarea condițiilor analitice.

Această metodologie, bazată pe planificarea experimentală, includerea erorii de predicție și propagarea acestei erori începând de la răspunsurile modelate și până la criteriul de separare, a permis formalizarea și identificarea spațiilor de concepție.

Al doilea capitol este o aplicație a acestei noi strategii pentru separarea alcaloizilor terțiari extrași din frunzele plantei *Strychnos usambarensis*, în timp ce al treilea capitol prezintă punerea în aplicare a acestei metodologii pentru separări enantiomerice în cromatografia solvenților organici polari.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Metodologia planificare experimentală – design space

Optimizarea condițiilor de operare în cromatografia lichidă pentru separarea mai multor compuși din probe complexe este adesea complicată. Într-adevăr, separarea compușilor poate fi dificilă din cauza comportamentelor cromatografice similare sau din cauza unor proprietăți fizico-chimice extreme de diferite (de exemplu, polaritatea, pKa, log P). Deoarece în ultimele decenii și mai ales în ultimii ani, s-au făcut o mulțime de îmbunătățiri în domeniul dezvoltării metodei, este astfel posibil prevederea unor strategii

diferite ce ar putea fi aplicate pentru a găsi separări optime într-un mod destul de automatizat.

Principala dificultate este faptul că înainte de validarea și transferul acestor metode analitice, aceste strategii trebuie să ofere previziuni precise și robuste. Instrucțiunile ICH Q8 (R2) oferă o orientare armonizată pentru a îmbunătăți robustețea și fiabilitatea dezvoltării farmaceutice. În acest ghid DS este definit ca "o combinație multidimensională și interacțiunea variabilelor de intrare (de exemplu, atributele materiale) și parametrii procesului a căror posibilitate de a oferi o asigurare a calității a fost demonstrată".

Pentru a descrie această definiție, se poate presupune că, "combinația multidimensională și interacțiunea variabilelor de intrare și a parametrilor de proces" este un spațiu multidimensional (sau subspațiu) ale cărui dimensiuni sunt factorii utilizați în timpul dezvoltării metodei.

Ulterior, orientarea menționează "a căror posibilitate de a oferi o asigurare a calității a fost demonstrată", ceea ce înseamnă că dimensiunea acestui spațiu este definit de un set de combinații ale nivelurilor factorilor în care un proces oferă rezultate de calitate. În domeniul LC, mai exact atunci când optimizarea separării este scopul principal, DS prezice un spațiu unde separarea este realizată ținând seama de incertitudinile măsurătorilor, ale procesului și ale modelelor.

Calitatea separării poate fi evaluată printr-un criteriu cromatografic, cum ar fi rezoluția ($R_s = 2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1}) / (w_{b,1} + w_{b,2})$); cu $t_{R,2} > t_{R,1}$ și $w_{b,1}$, $w_{b,2}$ lățimile picurilor la momentul inițial, $t_{R,1}$ și $t_{R,2}$ timpuri de retenție ale picurilor perechii critice), precum și incertitudinea metodei sunt estimate de probabilitatea de a atinge un prag dat al unui anumit criteriu (de exemplu, probabilitatea pentru R_s să fie mai mare decât 1.5) în utilizări viitoare ale metodei. De asemenea, afirmă că "lucrând în spațiul de concepție nu este considerată ca o schimbare".

În consecință, în cadrul dezvoltării metodelor de separare, DS poate fi considerat ca fiind o zonă a robusteții teoretice deoarece modificările parametrilor metodei nu vor afecta în mod semnificativ calitatea separării. Astfel, nici o scădere a calității în separare nu ar trebui să fie observată pe durata lucrului în DS. În consecință, pentru optimizarea separărilor HPLC și calcularea DS, DoE este una din strategiile cele mai adecvate.

Astfel, pe baza strategiei DoE, o metodologie recentă a fost folosită pentru a modeliza și pentru a prezice timpurile de retenție în funcție de anumiți factori cromatografici selecționați (de exemplu, compoziția fazei mobile, gradientul de timp, pH-ul fazei mobile) și apoi pentru a optimiza separarea. De asemenea, eroarea de predicție a fost estimată ulterior, în scopul permiterii calculului DS. Cu toate acestea, DoE presupune înregistrarea cromatogramelor în condiții de funcționare foarte diferite. Prin acest mod, selectivități foarte distincte sunt obținute. Detectarea și identificarea picurilor în fiecare cromatogramă poate deveni, astfel, dificilă și cronofagă. Prin urmare, o metodologie suplimentară bazată pe analiza componentelor independente

(ICA) a fost dezvoltată pentru a detecta și identifica picurile din cromatogramele obținute în urma aplicării DoE.

Două probe test au fost selectate pentru a evalua aceste metodologii complementare. Primul eșantion (eșantion 1) a fost trimis de la Eli Lilly and Company și a fost considerat ca un eșantion necunoscut. Un amestec test similar a fost deja folosit de Biswas et al. pentru a efectua un studiu pentru o metodă screening. Cu toate acestea, în această lucrare, atât numărul compușilor cât și natura lor nu au fost făcute cunoscute în mod deliberat pentru a putea testa ambele metodologii.

Al doilea eșantion (eșantion 2) este o formulare farmaceutică împotriva răcelii. Studii ce au implicat unii dintre acești compuși au fost publicate anterior: separarea celor trei substanțe active folosind o coloană poli(etilenglicol), separarea celor trei substanțe active utilizând coloane ciano, comparația între cinci coloane HPLC, comparația între electroforeză și separarea LC și validarea unei metode HPLC pentru cuantificarea de substanțe active. În plus, o revizuire a metodelor de analiză publicate pentru separarea unora dintre aceste substanțe pot fi găsite în lucrările lui Marin *et al.*. Aceste publicații abundente subliniază interesul care încă este prezent în ceea ce privește separarea și cuantificarea acestor compuși. Cu toate acestea, deoarece îndulcitorii unei noi formule fără zahăr nu au fost luați în considerare în metodele menționate anterior, o nouă metodă de dezvoltare a fost necesară.

Optimizarea automată a separării cromatografice este primul pas critic în cadrul dezvoltării automatizate a metodei cromatografice. În această lucrare, metodologii precum DoE, ICA, regresia liniară multiplă, propagarea erorii și DS au fost aplicate cu succes pentru a separa nouă compuși dintr-un eșantion necunoscut în mai puțin de 40 min și cei șapte compuși ai unei formulări farmaceutice. În plus, pentru acest eșantion din urmă, timpul de analiză a fost redus la mai puțin de 14 min.

Această metodologie globală este, de asemenea, foarte flexibilă deoarece alegerea fiecărui criteriu și a limitei lor de acceptare sunt făcute de către analist. În plus, o evaluare a robusteții DS a fost efectuată în timpul studiului de față. Criteriul de separare S a demonstrat în mod clar capacitatea robusteții în cadrul DS identificat. Acesta întărește faptul că DS definește un spațiu în care separările sunt complete și în care metoda este robustă și chiar mai robustă în cazul unui DS larg.

Cu toate acestea, deoarece mărimea DS depinde de valoarea lui π , studii suplimentare sunt încă necesare pentru a defini strategia de ajustare posibilă pentru acest parametru. În cele din urmă, în cazul în care un compus este eliminat din unul din amestecurile testate, cum ar fi un ingredient activ din formularea farmaceutică, DS actual ar putea defini în mod evident optima și robustețea spațiului pentru separarea ulterioară a amestecului fără experimente suplimentare.

2. Aplicarea unei noi strategii de optimizare pentru separarea alcaloizilor tertiary extrași din frunzele de *Strychnos usambarensis*

Separarea HPLC a șase alcaloizi extrași din frunzele de *Strychnos usambarensis* a fost dezvoltată și optimizată prin intermediul unei metodologii puternice pentru modelarea răspunsurilor cromatografice, bazate pe trei etape, și anume DoE, ICA și DS. Acest studiu a fost prima aplicare a unei noi strategii de optimizare asupra unei matrice complexe de origine naturală. Compușii separați sunt izomerii isostrychnopentamină și strychnopentamină, 10-11-hidroxiusambarine și hidroxiusambarine, de asemenea, strychnofilină și strychnofolină.

Trei parametri LC au fost optimizați folosind un design multifactorial care cuprinde 29 experimente ce includ 2 replici ale punctului central. Parametrii au fost procentul de modificatori organici utilizați la începutul unui profil de gradient care a constat în proporții diferite de MeOH și MeCN, timpul gradientul pentru a ajunge la 70% din modificatori organici pornind de la procentul inițial și procentul de MeCN găsit în faza mobilă. În urma aplicării planificării experimentale, modele predictive multiliniare au fost dezvoltate și utilizate în scopul obținerii condițiilor optime de analiză.

Condițiile optime au fost: metanol/acetoneitril- pentansulfonat de sodiu (pH 2.2; 7,5 mm) (33.4:66.6, v/v), la un debit al fazei mobile de 1mL/min pe durata unui timp de gradient de 40.6 de minute. Faza organică inițială conținea MeCN 3,7% și 96,3% MeOH.

Metoda a arătat o bună concordanță între datele experimentale și valoare predictivă pentru tot spațiul definit de parametrii studiați. Îmbunătățirea timpului de analiză și optimizarea separării compușilor de interes a fost posibilă datorită instrumentelor originale și puternice aplicate.

Înlocuirea parțială a MeCN de MeOH a fost un succes, permițând reducerea costurilor și menținerea unei calități ridicate a rezultatelor în ceea ce privește propunerile ICH Q8 și abordarea DS.

O separare optimă a fost realizată în special pentru strychnopentamină, isostrychnopentamină, 10-hidroxiusambarină și 11-hidroxiusambarină. O separare bună a fost, de asemenea, obținută pentru o altă pereche de izomeri ce este reprezentată de strychnofilină și strychnofolină, reușind astfel pentru prima dată după cunoștințele noastre, achiziționarea unui profil LC-UV pentru compușii de interes.

În plus, metoda rezultată din strategia de optimizare multifactorială a permis în mod simultan reducerea timpului de dezvoltare globală a metodei și a furnizat informații cu privire la separarea și sensibilitatea datorită detectării unor compuși noi în amestecul de origine vegetală analizat, compuși a căror separare și identificare rămâne încă delicată.

În cele din urmă, acest studiu a permis achiziționarea profilelor izomerilor care permit identificarea perioadei optime de colectare a plantei *Strychnos usambarensis*.

3. Implementarea abordării Design Space pentru separări enantiomerice în cromatografia solvenților organici polari

Această lucrare se concentrează pe punerea în aplicare a unei abordări DS și pe CPP-urile care trebuie luate în considerare atunci când se aplică conceptele QbD prezentate în ICH Q8 (R2), Q9 și Q10 pentru dezvoltarea metodelor analitice și pentru optimizarea a trei compuși chirali. În acest sens, o metodă HPLC utilizând o fază staționară cu o bază polizaharidă care conține un selector tris celuloză(4-cloro-3-metilfenilcarbamat) în cromatografia solvenților organici polari a fost luată în considerare. Efectele acidului trifluoracetic (TFA) și a concentrației n-hexanului într-o fază mobilă de MeCN au fost investigate într-o gamă largă de temperaturi pentru coloana analitică.

O bună compatibilitate s-a găsit între datele obținute în urma folosirii unui design central compozit și comportamentele cromatografice prezise prin aplicarea metodologiei DoE-DS. Atributul critic de calitate reprezentat aici de criteriul de separare (S_{crit}) a permis evaluarea calității enantioseparării. Separarea de bază pentru compușii de interes într-un timp de analiză de mai puțin de 20 de minute a fost posibilă datorită instrumentelor originale și puternice aplicate care au facilitat o înțelegere îmbunătățită a metodei.

În cele din urmă, avantajul metodologiei DoE-DS constă în acordarea posibilității de a evalua concomitent robustețea și condițiile optime care sunt dependente de compus.

Obiectivul stabilit de a ajunge la o enantioseparare de bază a fost atins în cromatografia cu solvenți organici polari cu ajutorul unei metodologii QbD compatibile cu DoE-DS. Rezultatele preliminare cu privire la natura compușilor au fost obținute prin folosirea HPLC-ului combinat cu dicroism circular și spectrometrie UV-VIS.

O bună înțelegere a efectelor CPP-urilor asupra unei faze staționare cu bază de polizaharid care conține un selector tris celuloză(4-cloro-3-metilfenilcarbamat) reprezintă un pas înainte pentru înlesnirea înțelegerii comportamentului cromatografic al celor trei compuși chirali. În plus, CQA ales oferă o separare acceptabilă într-un timp total de analiză scurt.

Mai mult decât atât, această metodologie promițătoare a permis stabilirea în același timp a condiției optime și a robusteții care, împreună cu eficiența acestuia, indică o strategie puternică care poate fi aplicată în analiza compușilor farmaceutici.

Rezultatele prezentate aici au demonstrat aplicabilitatea unei metodologii DOE-DS pentru a identifica DS-ul pentru un caz de separare enantioselectivă.

**“IULIU HATIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
CLUJ-NAPOCA**

FACULTY OF PHARMACY



IOLANDA NISTOR

**OPTIMIZATION OF SEPARATION METHODS BY A DESIGN OF
EXPERIMENT – DESIGN SPACE METHODOLOGY**

Abstract of the doctoral thesis

**In order to acquire the scientific title of PhD in Medical Sciences,
Field of Pharmacy**

**Scientific coordinators
Prof. PhD. RADU OPREAN
Prof. PhD. PHILIPPE HUBERT**

2012

Table of Contents

INTRODUCTION	13
REVIEW OF THE LITERATURE	14
1. Liquid chromatography	16
1.1. Historical aspects	16
1.2. Basic principles	17
1.3. HPLC modes	18
1.4. Chromatographic parameters	19
1.5. Contemporary HPLC	22
1.6. Method development	23
2. Regulatory support for biopharmaceutical development	25
2.1. Quality by design (QbD)	25
2.2. Critical quality parameter (CQA)	25
2.3. Critical process parameters (CPPs)	26
2.4. Design space (DS)	26
2.5. Quality risk management	27
3. Chemometrics applied to analytical method development	27
3.1. Design of experiments (DoE)	28
3.2. Response surface design	29
3.3. Tolerance intervals	29

PERSONAL CONTRIBUTION	33
1. Objectives	35
2. The design of experiment – design space methodology	35
2.1. Introduction	35
2.2. Materials and methods	37
2.3. Results and discussion	45
2.4. Conclusions	55
3. Application of a new optimization strategy for the separation of tertiary alkaloids extracted from <i>Strychnos usambarensis</i> leaves	57
3.1. Introduction	58
3.2. Materials and methods	61
3.3. Results and discussion	64
3.4. Conclusions	74
4. Implementation of a Design Space Approach for Enantiomeric Separations in Polar Organic Solvent Chromatography	80
4.1. Introduction	80
4.2. Materials and methods	82
4.3. Results and discussion	88
4.4. Conclusions	102
5. General conclusions	106
6. Originality of the thesis	108
REFERENCES	109

Key-words: HPLC, design of experiment, design space, optimization method, *Strychnos usambarensis*, chiral compounds, enantioseparation

I. CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

Liquid chromatography is the analytical technique of choice in the pharmaceutical field. It is mainly used to separate, identify and quantify the compounds of interest and related substances. Whether for quality control of drugs, the study of their stability or to provide qualitative and quantitative informations to researchers in disciplines as varied as synthetic chemistry, toxicology, pharmaceutics, liquid chromatography has become a necessity. Research seeking innovative strategies for the development of chromatographic methods is therefore ever more important in the analytical field.

In the current environment guided by the concepts of quality by design (QbD) and design space (DS) recommended by the International Conference on Harmonization (ICH), the methodologies for optimization of chromatographic methods should provide analysts along with more robust chromatographic conditions, a good understanding of process optimization and increased credibility of the predictions.

The first part of this thesis is structured in three chapters that are a succinct presentation of liquid chromatography concepts, regulatory support for biopharmaceutical development and chemometrics applied to analytical method development.

In the personal contribution part of this work, the first chapter describes a methodology combining both chromatographic behavior modeling compounds and optimization of analytical conditions that was tested. This methodology, based on design of experiments, the inclusion of the prediction error and the propagation of this error, from the modeled responses to the separation criterion, has allowed the formalization and the identification of design spaces. The second chapter is an application of this new strategy for the separation of tertiary alkaloids extracted from *Strychnos usambarensis* leaves, while the third one presents the implementation of this methodology for enantiomeric separations in polar organic solvent chromatography.

II. PERSONAL CONTRIBUTIONS

1. The design of experiment – design space methodology

The optimization of LC operating conditions for the separation of several compounds in complex samples is often intricate. Indeed, it can be tricky to separate compounds due to their similar chromatographic behaviors or fussy to elute all of them well separated when some have widely distinct physico-chemical properties (e.g. polarities, pKa, log P). Since past decades and mainly those last years, a lot of improvements in the fields of method development have been done and it is thus possible to foresee different strategies that could be applied to find optimal separations in a rather automated way.

The main difficulty is that these strategies need to give accurate and robust predictions prior to the validation and transfer of these analytical methods. ICH Q8 (R2) guideline provides a harmonized guidance to improve the robustness and reliability of pharmaceutical development. In this guideline the DS is defined as “the multidimensional combination and interaction of input variables (e.g. material attributes) and process parameters that have been demonstrated to provide assurance of quality”.

To decrypt this definition, it can be assumed that, the “multidimensional combination and interaction of input variables and process parameters” is a multidimensional space (or subspace) whose dimensions are the factors used during the method development. Afterwards, the guideline mentions “that have been demonstrated to provide assurance of quality” which means that the size of this space is defined by the set of combinations of factors ranges wherein a process provides quality results. In the LC field, and more precisely when the separation optimization is the main aim, the DS predicts a space wherein the separation is achieved taking into account the measurements, process and models uncertainties.

The separation quality can be evaluated by a chromatographic criterion such as the resolution ($R_s = 2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1}) / (w_{b,1} + w_{b,2})$; with $t_{R,2} > t_{R,1}$ and $w_{b,1}$, $w_{b,2}$ are the peaks widths at baseline; $t_{R,1}$ and $t_{R,2}$ being the retention times of the critical pair peaks) and the method uncertainty is estimated by the probability to reach a given criterion threshold (e.g. the probability for R_s to be higher than 1.5) in future uses of the method. It also states that “working within the design space is not considered as a change”.

Therefore, in the framework of separation methods development, DS can be clearly considered as a zone of theoretical robustness since modifications of the method parameters will not significantly affect the separation quality. Thus, no decrease of quality in the separation should be observed while working in DS. Consequently, to optimize HPLC separations and advisedly compute DS, DoE is one of the most appropriate strategies.

Thus, based on DoE strategy, a recent methodology was used to model and predict the retention times according to selected chromatographic factors (e.g. mobile phase composition, gradient time, mobile phase pH) and subsequently optimize the separation. Afterwards, the prediction error was also estimated in order to allow the DS computation. However, DoE involves the recording of chromatograms at very different operating conditions. By this way, very distinct selectivities are obtained. Peak detection and identification in each chromatogram can thus become tedious and time-consuming. Hence, an additional methodology based on independent component analysis (ICA) has been developed to detect and match peaks among the chromatograms resulting from DoE.

Two test samples were selected to evaluate these complementary methodologies. The first sample (sample 1) was sent from Eli Lilly and Company and was considered as an unknown sample. A similar test mixture was already used by Biswas et al. to conduct a method screening study. However, in this work, the amount of compounds and their nature were deliberately occulted to test out both methodologies.

The second sample (sample 2) is a common-cold pharmaceutical formulation. Studies involving some of these compounds were previously published: the separation of the three active drugs using a poly(ethyleneglycol) column, the separation of the three active drugs using cyano columns, the comparison between five HPLC columns, the comparison between electrophoresis and liquid chromatography separation and the validation of a HPLC method for the quantification of the active drugs. Furthermore, a review of analytical methods published for the separation of some of these substances can be found in the works of Marín et al.. These abundant publications highlight the interest that still remains in separating and quantifying these compounds. Nevertheless, as the sweeteners of a new sugar-free formulation were not taken into account in the aforementioned methods, a new method development was necessary.

The automated optimization of chromatographic separation is the first critical step in the framework of the automated development of chromatographic method. In this paper, DoE, ICA, multiple linear regression, error propagation and DS methodologies were successfully applied to separate nine compounds of an unknown sample mixture in less than 40 min and the seven compounds of a pharmaceutical formulation. Furthermore, for this latter sample, the analysis time was shortened to less than 14 min.

This global methodology is also very flexible as the choice of each criterion and their respective acceptance limit are made by the analyst. In addition, an evaluation of DS robustness was carried out during the present study. The separation criterion S clearly demonstrated its robustness capability within the identified DS. It strengthens the fact that DS defines a space wherein the separations are complete and the method is robust and even more robust if the DS is large. Nevertheless, as the size of DS depends on the value of π , further works are still required to define possible adjustment strategy for this parameter. Eventually, if one compound is discarded from one of the tested mixtures, such as an active ingredient of the pharmaceutical formulation, the present DS would obviously have defined optimal and robust space for the separation of the subsequent mixture without any additional experiments.

2. Application of a new optimization strategy for the separation of tertiary alkaloids extracted from *Strychnos usambarensis* leaves

The HPLC separation of six alkaloids extracted from *Strychnos usambarensis* leaves has been developed and optimized by means of a powerful methodology for modelling chromatographic responses, based on three steps, i.e. DoE, ICA and DS. This study was the first application of a new optimization strategy to a complex natural matrix. The compounds separated are the isomers isostrychnopentamine and strychnopentamine, 10-hydroxyusambarine and 11-hydroxyusambarine, also strychnophylline and strychnofoline.

Three LC parameters have been optimized using a multifactorial design comprising 29 experiments that includes 2 center point replicates. The parameters were the percentage of organic modifiers used at the beginning of a gradient profile which consisted in different proportions of MeOH and MeCN, the gradient time to reach 70 % of organic modifiers starting from the initial percentage and the percentage of MeCN found in the mobile phase. Subsequent to the experimental design application, predictive multilinear models were developed and used in order to provide optimal analytical conditions.

The optimum assay conditions were: methanol/acetonitrile-sodium pentane sulfonate (pH 2.2; 7.5 mM) (33.4:66.6, v/v) at a mobile phase flow rate of 1mL/min during a 40.6 minutes gradient time. The initial organic phase contained 3.7 % MeCN and 96.3 % MeOH.

The method showed good agreement between the experimental data and predictive value throughout the studied parameters space. Improvement of the analysis time and optimized separation for the compounds of interest was possible due to the original and powerful tools applied.

The partial replacement of MeCN by MeOH was successful, allowing reducing costs and maintaining a high quality of results in respect with the ICH Q8 guidelines and the DS approach.

An optimal separation was achieved especially for strychnopentamine, isostrychnopentamine, 10-hydroxyusambarine and 11-hydroxyusambarine. A good separation was also obtained for another pair of isomers that is represented by strychnophylline and strychnofoline, succeeding so to acquire for the first time, to our knowledge, a LC-UV profile for the compounds of interest.

In addition, the method resulting from the strategy of simultaneous multifactorial optimization reduced overall assay development time and provided information regarding separation and sensitivity due to the detection of new compounds in the analyzed mixture of plant origin, compounds whose separation and identification are still delicate.

Finally, this study permitted the acquisition of isomers profiles allowing the identification of the optimal collecting period of *Strychnos usambarensis*.

3. Implementation of a Design Space Approach for Enantiomeric Separations in Polar Organic Solvent Chromatography

This paper focuses on implementing a Design Space approach and on the CPPs to consider when applying the QbD concepts outlined in ICH Q8(R2), Q9 and Q10 to analytical method development and optimization for three chiral compounds. In this sense, an HPLC method using a polysaccharide-based stationary phase containing a cellulose tris (4-chloro-3-methylphenylcarbamate) selector in polar organic solvent chromatography mode was considered. The effects of trifluoroacetic acid (TFA) and n-hexane concentration in a MeCN mobile phase were investigated under a wide range of column temperatures.

Good adequacies were found between the observed data obtained after using a central composite design and the expected chromatographic behaviours predicted by applying the DoE-DS methodology. The critical quality attribute represented here by the separation criterion (S_{crit}) allowed assessing the quality of the enantioseparation. Baseline separation for the compounds of interest in an analysis time of less than 20 minutes was possible due to the original and powerful tools applied which facilitated an enhanced method comprehension.

Finally, the advantage of the DoE-DS approach resides in granting the possibility to concurrently assess robustness and identify the optimal conditions which are compound dependent.

The set objective of reaching baseline enantioseparation was achieved given that the three compounds studied were enantiomerically separated using a QbD compliant DoE-DS methodology in the polar organic solvent chromatography mode. Preliminary results with regards to the nature of the compounds were obtained using the HPLC method combined with circular dichroism and UV-VIS spectrometry.

A good understanding of the CPPs effects on a polysaccharide-based stationary phase containing a cellulose tris (4-chloro-3-methylphenylcarbamate) selector represents a step forward to apprehend the chromatographic behaviour of the three chiral compounds. In addition, the CQA chosen provided acceptable separation in an overall short analysis time.

Moreover, this promising methodology allowed for the optimal condition and robustness to be concurrently determined which along with its effectiveness strongly indicates a powerful strategy that can be applied in the analysis of pharmaceutical compounds.

The results presented here demonstrated the applicability of a DoE-DS methodology to identify the DS on an enantioselective case.

**UNIVERSITÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE "IULIU HATIEGANU"
CLUJ-NAPOCA**

FACULTÉ DE PHARMACIE



IOLANDA NISTOR

**OPTIMISATION DES MÉTHODES SEPARATIVES AU MOYEN
DE LA PLANIFICATION EXPÉRIMENTALE ET DE L'ESPACE DE
CONCEPTION**

Résumé de la thèse

**Afin d'acquérir le titre scientifique de Docteur en Sciences Médicales,
Domaine pharmaceutique**

Coordinateurs Scientifiques

Prof. Dr. RADU OPREAN

Prof. Dr. PHILIPPE HUBERT

2012

Table des matières

INTRODUCTION	13
REVUE DE LA LITTÉRATURE	14
1. Chromatographie liquide	16
1.1. Aspects historiques	16
1.2. Les principes de base	17
1.3. Les modes HPLC	18
1.4. Les paramètres chromatographiques	19
1.5. HPLC contemporain	22
1.6. Le développement de méthodes	23
2. Le soutien réglementaire pour le développement biopharmaceutique	25
2.1. Quality by design (QbD)	25
2.2. Le paramètre de qualité critique (CQA)	25
2.3. Les paramètres critiques du procédé (CPPs)	26
2.4. Espace de conception (DS)	26
2.5. La gestion du risque et de la qualité	27
3. La chimiométrie appliquée au développement de la méthode analytique	27
3.1. La planification expérimentale (DoE)	28
3.2. Le design de la surface de réponse	29
3.3. Les intervalles de tolérance	29

CONTRIBUTION PERSONNELLE	33
1. Objectifs	35
2. La méthodologie de la planification expérimentale – espace de conception	35
2.1. Introduction	35
2.2. Matériels et méthodes	37
2.3. Résultats et discussion	45
2.4. Conclusions	55
3. L'application d'une nouvelle stratégie d'optimisation pour la séparation des alcaloïdes tertiaires extraits des feuilles de <i>Strychnos usambarensis</i>	57
3.1. Introduction	58
3.2. Matériels et méthodes	61
3.3. Résultats et discussion	64
3.4. Conclusions	74
4. L'implémentation d'une approche planification expérimentale pour l'énantioséparation dans la chromatographie des solvants organiques polaires	80
4.1. Introduction	80
4.2. Matériels et méthodes	82
4.3. Résultats et discussion	88
4.4. Conclusions	102
5. Conclusions générales	106
6. Originalité de la thèse	108
RÉFÉRENCES	109

Mots-clés: HPLC, planification expérimentale, espace de conception, optimisation de la méthode, *Strychnos usambarensis*, composés chiraux, énantioséparation

I. ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

La chromatographie en phase liquide est la technique analytique de choix dans le domaine pharmaceutique. Elle est principalement utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composés d'intérêt et les substances connexes. Que ce soit pour le contrôle de la qualité des médicaments, de l'étude de leur stabilité ou de fournir des informations qualitatives et quantitatives à des chercheurs dans des disciplines aussi variées que la chimie de synthèse, la toxicologie, la pharmacologie, la chromatographie liquide est devenue une nécessité. La recherche de stratégies innovantes pour le développement de méthodes chromatographiques est donc de plus en plus importante dans le domaine analytique.

Dans le contexte actuel guidé par les concepts de quality by design (QbD) et de l'espace de conception (DS) recommandés par la Conférence Internationale sur l'Harmonisation (CIH), les méthodologies d'optimisation de méthodes chromatographiques doivent fournir aux analystes ainsi que des conditions plus robustes chromatographiques, une bonne compréhension de l'optimisation des processus et de la crédibilité accrue des prédictions.

La première partie de cette thèse est structurée en trois chapitres qui sont une présentation succincte des concepts de la chromatographie en phase liquide, le soutien réglementaire pour le développement biopharmaceutique et la chimiométrie appliquée au développement des méthodes analytiques.

Dans la partie de la contribution personnelle de ce travail, le premier chapitre décrit une méthode combinant la modélisation du comportement chromatographique des composés et l'optimisation des conditions d'analyse qui a été testée. Cette méthodologie, basée sur la planification expérimentale, l'inclusion de l'erreur de prédiction et la propagation de cette erreur, à partir des réponses modélisées jusqu'au critère de séparation, a permis la formalisation et l'identification des espaces de conception. Le deuxième chapitre est une application de cette nouvelle stratégie pour la séparation des alcaloïdes tertiaires extraits de feuilles de *Strychnos usambarensis*, tandis que le troisième présente la mise en œuvre de cette méthodologie pour l'énantioséparation en chromatographie des solvants organiques polaires.

II. CONTRIBUTION PERSONNELLE

1. La méthodologie de la planification expérimentale – espace de conception

L'optimisation des conditions de fonctionnement LC pour la séparation des différents composés dans des échantillons complexes est souvent compliquée. En effet, il peut être difficile de séparer les composés en raison de leurs comportements chromatographiques similaires ou délicat pour éluer tous bien séparés quand certains ont des propriétés physico-chimiques largement distinctes (par exemple les polarités, le pKa, log P). Depuis ces dernières décennies et principalement ceux des dernières années, de nombreuses améliorations dans les domaines du développement de la méthode ont été réalisées et il est donc possible de prévoir différentes stratégies qui pourraient être appliquées pour trouver des séparations optimales d'une manière assez automatisée.

La difficulté principale est que ces stratégies doivent offrir des prévisions précises et solides préalablement à la validation et le transfert de ces méthodes d'analyse. Le guide ICH Q8 (R2) fournit des lignes directrices harmonisées pour améliorer la robustesse et la fiabilité de développement pharmaceutique. Dans ce guide le DS est définie comme «la combinaison multidimensionnelle et l'interaction des variables d'entrée (attributs matériels, par exemple) et les paramètres de processus qui ont été démontrées à fournir l'assurance de la qualité».

Pour déchiffrer cette définition, on peut supposer que, la «combinaison multidimensionnelle et l'interaction des variables d'entrée et les paramètres du procédé" est un espace multidimensionnel (ou sous-espace) dont les dimensions sont les facteurs utilisés lors du développement de la méthode. Ensuite, la directive mentionne "qui ont été démontrées à fournir l'assurance de la qualité» ce qui signifie que la taille de cet espace est défini par l'ensemble des combinaisons des gammes des facteurs dans lesquelles un processus fournit des résultats de qualité. Dans le domaine LC, et plus précisément lors de l'optimisation de la séparation est l'objectif principal, le DS prédit un espace dans lequel la séparation est réalisée en tenant compte des incertitudes des mesures, du procédé et des modèles.

La qualité de la séparation peut être évaluée par un critère chromatographique comme la résolution ($R_s = 2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1}) / (w_{b,1} + w_{b,2})$); avec $t_{R,2} > t_{R,1}$ et $w_{b,1}$, $w_{b,2}$ sont les largeurs des pics à la ligne de base, $t_{R,1}$ et $t_{R,2}$ étant les temps de rétention des pics de la paire critique) et l'incertitude de la méthode est estimée par la probabilité d'atteindre un seuil donné du critère (par exemple, la probabilité pour R_s d'être supérieur à 1.5) dans les utilisations futures de la méthode. Il indique également que «travailler au sein de l'espace de conception n'est pas considéré comme un changement".

Par conséquent, dans le cadre du développement des méthodes de séparation, DS peut être clairement considéré comme une zone de robustesse théorique, car les modifications des paramètres de la méthode ne vont pas affecter de manière significative la qualité de la séparation. Ainsi, aucune diminution de la qualité de la séparation ne devrait être observée tout en travaillant dans DS. Par conséquent, afin d'optimiser les séparations HPLC et à bien calculer le DS, DoE est l'une des stratégies les plus appropriées.

Ainsi, sur la base de la stratégie DoE, une méthodologie récente a été utilisée pour modéliser et prédire les temps de rétention en fonction de certains facteurs chromatographiques (par exemple la composition de la phase mobile, le temps du gradient, le pH de la phase mobile) et ensuite optimiser la séparation. Ensuite, l'erreur de prédiction a été également évaluée de manière à permettre le calcul du DS. Cependant, DoE implique l'enregistrement des chromatogrammes dans des conditions de fonctionnement très différents. De cette manière, des sélectivités très variées sont obtenues. La détection et l'identification des pics dans chaque chromatogramme peuvent ainsi devenir fastidieuses et chronophages. Par conséquent, une méthode complémentaire basée sur l'analyse en composantes indépendantes (ICA) a été développée pour détecter et identifier les pics parmi les chromatogrammes résultant de DoE.

Deux échantillons ont été choisis pour évaluer ces méthodes complémentaires. Le premier échantillon (échantillon 1) a été envoyé par Eli Lilly and Company et a été considéré comme un échantillon inconnu. Un mélange d'essai similaire a été déjà utilisé par Biswas *et al.* pour mener une étude pour une méthode de criblage. Cependant, dans ce travail, le nombre de composés et leur nature ont été volontairement occultés pour tester les deux méthodes.

Le deuxième échantillon (échantillon 2) est une formulation pharmaceutique pour le rhume. Des études portant sur certains de ces composés ont déjà été publiés: la séparation des trois substances actives en utilisant une colonne poly(éthylène glycol), la séparation des trois substances actives en utilisant des colonnes cyano, la comparaison entre cinq colonnes HPLC, la comparaison entre l'électrophorèse et la chromatographie en phase liquide, la séparation et la validation d'une méthode HPLC pour la quantification des substances actives. En outre, un résumé publié sur des méthodes analytiques pour la séparation de certaines de ces substances peut être trouvé dans les travaux de Marín *et al.*. Ces publications abondantes représentent une évidence de l'intérêt qui reste encore dans la séparation et la quantification de ces composés. Néanmoins, comme les édulcorants d'une nouvelle formulation sans sucre n'ont pas été pris en compte dans les méthodes ci-dessus, une nouvelle méthode de développement était nécessaire.

L'optimisation automatisée de la séparation chromatographique est la première étape critique dans le cadre de la mise au point des méthodes chromatographiques automatisées. Dans ce travail, les méthodologies DoE, ICA, la régression linéaire multiple, la propagation de l'erreur et le DS ont été appliquées avec succès pour séparer les neuf composés d'un mélange échantillon inconnu en moins de 40 min et les sept composés

d'une formulation pharmaceutique. En outre, pour ce dernier échantillon, le temps d'analyse a été réduit à moins de 14 min.

Cette méthodologie globale est également très flexible parce que le choix de chaque critère et leurs limite d'acceptation sont faits par l'analyste. En outre, une évaluation de la robustesse DS a été réalisée au cours de cette étude. Le critère de la séparation S a clairement démontré sa robustesse dans les DS identifiés. Il renforce le fait que DS définit un espace dans lequel les séparations sont complètes et la méthode est robuste et encore plus robuste si le DS est grande. Néanmoins, comme la taille de la DS dépend de la valeur de π , des travaux supplémentaires sont encore nécessaires pour définir la stratégie d'ajustement possible pour ce paramètre. Éventuellement, si un composé est éliminé à partir de l'un des mélanges testés, comme un ingrédient actif de la formulation pharmaceutique, le DS actuel pourra évidemment définir un espace optimal et robuste pour la séparation d'un sous- mélange sans expériences supplémentaires.

2. L'application d'une nouvelle stratégie d'optimisation pour la séparation des alcaloïdes tertiaires extraits des feuilles de *Strychnos usambarensis*

La séparation par HPLC de six alcaloïdes extraits de feuilles de *Strychnos usambarensis* a été développée et optimisée au moyen d'une méthodologie puissante pour la modélisation des réponses chromatographiques, basé sur trois étapes, à savoir DoE, l'ICA et DS. Cette étude est la première application d'une nouvelle stratégie d'optimisation à une matrice complexe naturelle. Les composés séparés sont les isomères isostrychnopentamine et strychnopentamine, 10-hydroxyusambarine et 11-hydroxyusambarine, aussi strychnophylline et strychnofoline.

Trois paramètres LC ont été optimisés en utilisant un design multifactoriel comprenant 29 expériences qui inclut 2 répétitions de points centraux. Les paramètres sont le pourcentage de modificateurs organiques utilisés au début d'un profil de gradient consistant en des proportions différentes de MeOH et MeCN, le temps du gradient pour atteindre 70% de modificateurs organiques à partir de la proportion initiale et le pourcentage de MeCN dans la phase mobile. À la suite de l'application de la planification expérimentale, des modèles prédictifs multilinéaires ont été développés et utilisés afin de fournir des conditions optimales d'analyse.

Les conditions optimales sont les suivantes: méthanol/acétonitrile-pentane sulfonate de sodium (pH 2.2; 7.5 mM) (33.4:66.6, v/v) à un débit de la phase mobile de 1mL/min pendant un temps gradient de 40.6 minutes. La phase organique initiale contenait 3,7% MeCN et 96,3% MeOH.

La méthode a montré une bonne concordance entre les données expérimentales et la valeur prédictive à travers l'espace des paramètres étudiés. L'amélioration du temps

d'analyse et une séparation optimisée pour les composés d'intérêt ont été possibles grâce aux outils originaux et puissants appliqués.

Le remplacement partiel de MeCN par MeOH a été un succès, ce qui permet de réduire les coûts et de maintenir une haute qualité des résultats en ce qui concerne les lignes directrices de l'ICH Q8 et l'approche DS.

Une séparation optimale a été réalisée spécialement pour strychnopentamine, isostrychnopentamine, 10-hydroxyusambarine et 11-hydroxyusambarine. Une bonne séparation a été également obtenue pour une autre paire d'isomères qui sont représentées par la strychnophylline et la strychnofoline, succédant ainsi à acquérir pour la première fois, à notre connaissance, un profil de LC-UV pour les composés d'intérêt.

En outre, la méthode résultant de la stratégie d'optimisation multifactorielle simultanée a réduit le temps de développement et a fourni des informations concernant la séparation et la sensibilité due à la détection de nouveaux composés dans le mélange d'origine végétale analysé, des composés dont la séparation et l'identification sont toujours délicate.

Enfin, cette étude a permis l'acquisition de profils des isomères permettant l'identification de la période de collecte optimale de *Strychnos usambarensis*.

3. L'implémentation d'une approche planification expérimentale pour l'énantioséparation dans la chromatographie des solvants organiques polaires

Cet article se concentre sur la mise en œuvre d'une approche de l'espace de conception et sur les paramètres critiques du procédé à prendre en compte lors de l'application des concepts QbD décrits dans ICH Q8 (R2), Q9 et Q10 pour le développement et l'optimisation des méthodes analytiques pour trois composés chiraux. En ce sens, une méthode HPLC utilisant une phase stationnaire à base de polysaccharides contenant un sélecteur cellulose tris (4-chloro-3-méthylphénylcarbamate) en chromatographie des solvants organiques polaires a été pris en compte. Les effets de l'acide trifluoroacétique (TFA) et de la concentration du n-hexane dans une phase mobile MeCN ont été étudiés dans une large gamme de températures de colonne.

Des bons adéquations ont été trouvées entre les données observées obtenues avec l'aide d'un plan central composite et les comportements chromatographiques prévues en appliquant la méthodologie DoE-DS. L'attribut critique de qualité représenté ici par le critère de séparation (S_{crit}) a permis d'évaluer la qualité de l'énantioséparation. La séparation à la ligne de base pour les composés d'intérêt dans un temps d'analyse des moins de 20 minutes a été possible grâce aux outils originaux et puissants appliqués ce qui a facilité une compréhension accrue de la méthode.

Enfin, l'avantage de l'approche DoE-DS réside dans l'octroi de la possibilité d'évaluer en même temps la robustesse et d'identifier les conditions optimales qui sont dépendantes de composé.

L'objectif fixé d'atteindre une énatiométrie de base a été atteint, étant donné que les trois composés étudiés ont été séparés à l'aide des concepts du QbD conformes avec la méthodologie DoE-DS en chromatographie des solvants organiques polaires. Les résultats préliminaires en ce qui concerne la nature des composés ont été obtenus en utilisant la méthode HPLC combinée au dichroïsme circulaire et à la spectrométrie UV-VIS.

Une bonne compréhension des effets des paramètres critiques du procédé sur une phase stationnaire à base de polysaccharides contenant un sélecteur cellulose tris (4-chloro-3-méthylphénylcarbamate) représente un pas en avant pour appréhender le comportement chromatographique des trois composés chiraux. En outre, le CQA choisi offre une séparation acceptable dans un temps globale d'analyse court.

De plus, cette méthodologie prometteuse a permis de déterminer simultanément la condition optimale et la robustesse qui, avec son efficacité, indique une stratégie puissante qui peut être appliquée dans l'analyse des composés pharmaceutiques.

Les résultats présentés ici ont démontré l'applicabilité d'une méthodologie DoE-DS pour identifier le DS sur un cas d'énantiosélective.