

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

UTILISATION D'UNE MATRICE DE STANDARD ET DE LA LOI D'ARRHENIUS
POUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN MEILLEUR PROTOCOLE DES ÉTUDES
D'EXTRACTABLE ET LESSIVABLE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN CHIMIE

PAR
VINCENT PICHÉ

SEPTEMBRE 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord exprimer ma gratitude à mon directeur de recherche, le professeur associé à l'Université du Québec à Montréal, M. Jacques Lesage, pour m'avoir offert la chance de participer à ce projet. Je remercie également ma co-directrice de recherche, la professeure à l'Université du Québec à Montréal, Mme Lekha Sleno. Merci pour le support, les réponses aux questions tout au long de la recherche et l'aide à la rédaction du mémoire.

Mes remerciements à toute l'équipe de chez Neopharm Labs sans qui le projet n'aurait jamais vu le jour. Un grand merci à M. Mathieu Fournier pour l'opportunité et le soutien. Également à M. Thami Bouachraoui, M. Said Ghouami, M. Mustapha Aouidate, M. Vincent Petruccio, M. Jean-Francois Desloges et M. Anthony Lapointe pour leur aide dans les multiples facettes du développement de ce projet. J'apprécie énormément le temps qui m'a été consacré et la liberté qui m'a été donnée. Sans les nombreux soirs et fin de semaine où l'on m'a laissé accéder au laboratoire, le projet n'aurait pas pu avancer au même rythme.

J'aimerais faire une mention spéciale à Roy & LeClair et Berry d'avoir fourni du matériel indispensable à l'étude.

Je remercie vivement tous les membres du jury de me faire l'honneur d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Finalement, un gros merci et tous mes amis et ma famille pour leur soutien inconditionnel.

DÉDICACE

Je dédie plus particulièrement ce mémoire à mon cher ami Zachary pour son humour, ses mots d'encouragements et sa bonne compagnie. Ta longue moustache qui vient toujours vérifier si mon travail avance aura été un support hors du commun.

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
TABLES DES MATIÈRES	iv
LISTES DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
Chapitre 1 - Introduction générale	1
1.1 Mise en contexte	1
1.1.1 Industrie de l’emballage plastique.....	2
1.1.2 Extractables et lessivables	2
1.2 Méthode générale	4
1.2.1 Méthode d’extraction	4
1.2.3 Techniques d’analyse.....	6
1.2.3 Identification des impuretés.....	8
1.3 Évaluation des risques	9
1.3.1 Seuil de préoccupation pour la sécurité	9
1.3.2 Seuil d’évaluation analytique.....	11
1.3.3 Choix de l’étalon	14
1.4 Objectifs	15
Chapitre 2 - Développement de méthode	17
2.1 Paramètres expérimentaux	17
2.1.1 Appareil HPLC-QTOF	17
2.1.2 Matériel et réactifs.....	19
2.1.3 Paramètres chromatographiques et MS.....	20
2.1.4 Préparation des solutions	20
2.2 Optimisation de méthode.....	21

2.2.1 Choix des étalons	22
2.2.2 Phase mobiles	24
2.2.3 Autres paramètres	26
2.2.4 Changement rapide de polarité	30
2.3 Validation de méthode	32
2.3.1 Sélection finales des étalons.....	33
2.3.2 Recommandations ICH et USP	35
2.3.3 Linéarité, SST, Spécificité et LOQ	36
2.3.4 Répétabilité et précision	39
2.3.5 Stabilité	40
2.4 Méthode finale.....	41
Chapitre 3 – Étude cinétique d’extraction	42
3.1 Protocole de l’étude.....	42
3.1.1 Matériel.....	42
3.1.2 Milieu d’extraction	42
3.1.3 Protocole d’incubation.....	43
3.2 Évaluation des résultats	45
3.2.1 Traitement des données	45
3.2.2 Sélection des impuretés.....	47
3.2.3 Cinétique d’extraction.....	49
3.2.4 Prédiction par Slimstats	50
3.2.5 Lessivables.....	53
Chapitre 4 – Discussion et conclusion.....	55
4.1 Discussion.....	55
4.1.1 Méthode E&L	55
4.1.2 Extraction	55
4.1.3 Traitement des données	56
4.1.4 Conclusion et perspectives	57
4.2 Références	58
4.3 Annexes.....	62
4.3.1 Annexe A – Développement de méthode.....	62
4.3.2 Annexe B – Étude cinétique d’extraction.....	65

LISTES DES FIGURES

Figure 1 - Chaîne d'approvisionnement d'un contenant pour une compagnie pharmaceutique (Zweiben, 2010)	3
Figure 2 - Vial d'un échantillon de parfum liquide où les composés plus volatils sont en plus grande concentration dans l'espace de tête comparativement aux composés moins volatils qui sont en plus grande concentration dans le liquide (Tipler, 2014).....	7
Figure 3 - Différence de détection entre les différentes sources d'ionisation en fonction de la polarité et du poids moléculaire des analytes (ThermoFisher, 2023).....	8
Figure 4 - Application de l'AET avec l'étalon A. La bande pointillée délimite les pics à identifier et quantifier (en haut de la ligne (B)) et les pics qui ne présentent pas de risque (en bas de la ligne (C)) (Jenke, D., 2018).....	12
Figure 5 - Chromatogramme d'un AET corrigé par un facteur de 2 (Jenke, D. et Odufu, 2012)..	13
Figure 6 - RRF de 30 composés par rapport à l'étalon 2-Fluorobiphenyl (Jenke, D. et Odufu, 2012)	14
Figure 7 - Différence de signal entre deux étalons (Standard 1 et 2) de même concentration et leur effet sur la filtration des impuretés (Jordi et al., 2020)	15
Figure 8 - Schéma d'un spectromètre de masse quadripôle et à temps de vol (Allen et McWhinney, 2019).....	19
Figure 9 - Comparaison entre l'intensité des signaux et le pourcentage de ces intensités pour le BPA et l'AO2246 tiré des données en 2.2.6.....	21
Figure 10 - Pourcentage de l'aire des pics de chaque étalon en fonction de leur ionisation en mode positif et négatif à pH 8.0	25
Figure 11 - Pourcentage de l'aire des pics de chaque étalon en fonction du pH des phases mobiles.....	26
Figure 12 - Pourcentage de l'aire des pics de chaque étalon en fonction du pourcentage d'ACN utilisé dans le solvant de la solution étalon finale.....	27
Figure 13 - Pourcentage de l'aire des pics de chaque étalon en fonction du volume d'injection	28
Figure 14 - Aire des pics de l'étalon BHT en fonction du volume d'injection.....	28
Figure 15 - Aire des pics de l'étalon IRG3114 en fonction du volume d'injection.....	29
Figure 16 - Pourcentage d'intensité des étalons en fonction de la condition initiale des phases mobiles.....	30

Figure 17 - Pourcentage de l'aire des pics pour le mode FSP et le mode de polarité séparée	31
Figure 18 - EIC de chaque étalon en mode d'ionisation primaire a) positif et b) négatif	35
Figure 19 - Pourcentage de l'aire des pics de chaque étalon dans le blanc et dans l'étalon 1 (LOQ, 10%)	37
Figure 20 - EIC de 0 à 11 minutes du BPA de la solution étalon 1 et calcul du ratio S/N	37
Figure 21 - Pourcentage de recouvrement de l'échantillon dopé à la concentration de l'étalon 3 selon trois dilutions ; non dilué, dilué à 1 : 1 et dilué à 1 : 2 avec de l'ACN 60%	40
Figure 22 - Représentation du protocole d'extraction des extractables à 40 °C des CCS de PET (A), HDPE (B) et les vials de verre (C)	44
Figure 23 - Étapes de traitement des données par Profinder et MPP	45
Figure 24 - TIC de la solution étalon LOQ et spectre MS de la section entre 3.876 et 4.493 min	46
Figure 25 - Concentration en fonction du temps des impuretés extrait de l'incubation à 60 °C du composé 16, 7, 22 et 1.....	48
Figure 26 - Concentration en fonction du temps d'une impureté de formule moléculaire C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₄ extraite de l'incubation à 60 °C dans le CCS « B » avec le milieu d'extraction NaOH 0.01N en mode d'ionisation négatif où la concentration est estimée à partir de l'étalon BPA...	48
Figure 27 - Concentration en fonction du temps du composé 5 extrait de l'incubation à 40, 50 et 60 °C dans le CCS « B » avec le milieu d'extraction EtOH 70% en mode d'ionisation négatif où la concentration est estimée à partir de l'étalon BPA.....	49
Figure 28 - Profil cinétique du composé 2 et 5.....	50
Figure 29 - Projection du temps requis pour atteindre l'AET par Slimstats pour le composé CP1	52
<i>Figure 30 - Pourcentage du temps requis en jours pour atteindre l'AET à 40 °C de chaque impureté calculée par le programme statistique Slimstats à l'aide des données à 50 et 60 °C comparativement aux résultats obtenus en pratique ainsi que le pourcentage de différence (%Diff) du comparatif (Slimstats/Pratique x 100) ; a) %Diff 60 – 140%, b) %Diff ≤ 60%, c) %Diff ≥ 140%.....</i>	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Techniques analytiques utilisées par type de composé chimique	7
Tableau 2 - Évaluation des risques par groupe de médicament selon la voie d'administration et l'interaction du médicament avec le CCS (<1664>, 2021).....	11
Tableau 3 - Gradient de la phase mobile aqueuse (A) et organique (B) durant l'élution chromatographique	20
Tableau 4 - Quantité d'ingrédients pour une solution complétée à 1L avec de l'eau	21
Tableau 5 - Liste détaillée des étalons.....	23
Tableau 6 - Mode d'ionisation sélectionné pour chaque étalon.....	25
Tableau 7 - Temps de rétention (RT) des étalons élués par les phases mobiles ayant la condition initiale 90 : 10.....	30
Tableau 8 - Séquence de lecture pour la validation de méthode.....	32
Tableau 9 - Concentration des étalons dans la courbe de calibration en µg/mL.....	33
Tableau 10 - Étalons utilisés dans la méthode finale et leurs modes d'ionisation primaire et alternative.....	34
Tableau 11 - Paramètres et critères de la validation de méthode	36
Tableau 12 - %RSD du SST, du LOQ et R2 de chaque étalon	38
Tableau 13 - %REC de la solution étalon 3 fraîchement préparée versus la solution étalon 3 vieille de 42 jours conservée à 4 °C	41
Tableau 14 - Description des paramètres d'extraction de l'étude cinétique des E&Ls	44

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

%REC	Pourcentage de recouvrement
%RSD	Pourcentage d'écart-type relatif
AAF	Facteur de vieillissement accéléré <i>Accelerated aging factor</i>
AAS	Spéctrométrie d'absorption atomique
AAT	Temps de vieillissement accéléré <i>Accelerated aging time</i>
AET	Seuil d'évaluation analytique <i>Analytical evaluation threshold</i>
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
API	Ingrédient pharmaceutique actif
ASTM	Société Américaine pour les essais et les matériaux <i>American Society for Testing and Materials</i>
CCS	Système de fermeture de récipient <i>Container closure system</i>
CI	Ionisation chimique
CID	Dissociation induite par collision
E&L	Extractables et lessivables
EI	Ionisation à impact électronique
EP	Pharmacopée Européenne <i>European Pharmacopoeia</i>
ESI	Ionisation à électronébulisation
FDA	Administration des aliments et des médicaments <i>Food and Drugs Administration</i>
FSP	Changement rapide de polarité <i>Fast switching polarity</i>
GC	Chromatographie gazeuse
HCl	Acide chlorhydrique
HPDE	Polyéthylène à haute densité
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRMS	Spectromètre de masse à haute résolution
IC	Chromatographie ionique

ICP	Plasma à couplage inductif
IPA	Isopropanol ou 2-propanol
IR	Infrarouge
LOQ	Limite de quantification
LC	Chromatographie liquide
LRMS	Spectromètre de masse à basse résolution
m/z	Ratio masse sur charge
MeOH	Méthanol
MPP	Mass Profiler Professional
MS	Spectromètre de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NaOH	Hydroxyde de sodium
NVOC	Composé organique non-volatile
OINDP	Produit pharmaceutique inhalé par voie orale et nasale
PE	Polyéthylène
PET	Polyéthylène téréphtalate
PP	Polypropylène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PQRI	Institut de recherche sur la qualité des produits <i>Product Quality Research Institute</i>
Q ₁₀	Facteur de vieillissement, conventionnellement 2.0
QTOF	Spectromètre de masse quadrupôle et à temps de vol
RF	Facteur de réponse
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RRF	Facteur de réponse relative
RT	Temps de rétention
S/N	Signal sur bruit
SCT	Seuil de préoccupation pour la sécurité <i>Safety concern threshold</i>
SD	Écart-type
SST	Adéquation du système <i>System suitability test</i>

SVOC	Composé organique semi-volatile	
TAA	Température de contact accélérée	<i>Accelerated contact temperature</i>
TOF	Temps de vol	
TRC	Toronto Research Chemicals	
t _{ref}	Temps d'utilisation typique	
TREF	Température d'utilisation typique	
UHPLC	Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance	
USP	Pharmacopée des États-Unis	<i>United States Pharmacoppeia</i>
UV	Ultraviolet	
VOC	Composé organique volatile	

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

%	pourcent
°C	Degré Celsius
µg	microgramme
µM	micromolaire
bar	unité de pression
Da	Dalton
g	gramme
L	litre
ln	logarithme naturel
log	logarithme
logP	logarithme du coefficient de partage
m/z	masse sur charge
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
mol	mole
N	Normalité
pKa	logarithme de la constante de dissociation d'acide
V	volt

RÉSUMÉ

Les produits pharmaceutiques peuvent contenir des impuretés provenant d'un contact avec les matériaux d'entreposage, de distribution et d'administration. Les impuretés que l'on retrouve dans le médicament (lessivables) peuvent être liées à des composés extraits (extractables) des mêmes matériaux sous des conditions agressives de solvant et de température en laboratoire. Les études d'extractables et lessivables (E&L) sont complexes et requièrent plusieurs méthodes analytiques orthogonales pour dépister toutes les impuretés présentes. Dans le cadre de ce projet, une méthode générale de dépistage des composés organiques non volatils (NVOCs) par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (UHPLC-QTOF) a été développée. Cette méthode utilise 10 étalons caractéristiques aux E&Ls dans le but d'assurer la détection des impuretés et l'intégrité de la méthode. Une validation de méthode a été faite sous les critères de la pharmacopée des États-Unis (*United States Pharmacopoeia* (USP)). La méthode a été utilisée pour déterminer le profil cinétique d'extraction des impuretés provenant de contenant de polyéthylène téréphtalate (PET), de polyéthylène à haute densité (HDPE) et de bouchon en polypropylène (PP) avec doublure en polytétrafluoroéthylène (PTFE). Les incubations sont faites à 40, 50 et 60 °C en utilisant les milieux d'extraction d'éthanol (EtOH) 70%, d'acide chlorhydrique (HCl) 0.1N et d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0.01N. Le programme statistique Slimstats utilise la loi d'Arrhenius pour prédire à l'aide des données à 50 et 60 °C le profil cinétique théorique à 40 °C. La valeur théorique est comparée à la valeur pratique et elle s'avère valide dans 83% des cas. Cela démontre que Slimstats peut être un outil viable dans les études E&L.

ABSTRACT

Pharmaceutical drug products can contain foreign impurities that leaches from a contact with components of storage, distribution and administration systems. Impurities found in the drug product (leachables) can be extracted from these systems under aggressive conditions of temperature and solvent (extractables) during laboratory investigations. Extractables and leachables (E&L) studies are complex and need multiple complementary analytical techniques to provide a full screening of impurities. In this project, a general method for the screening of non-volatile organic compounds (NVOCs) by liquid chromatography coupled with a time-of-flight mass spectrometer (UHPLC-QTOF) has been developed. That method uses 10 typical standards generally found in E&Ls studies to guarantee the integrity of the method. A validation has been done under the United States pharmacopoeia (USP). Using this method, a study of the kinetic profile of E&L extraction from polyethylene terephthalate (PET) and high-density polyethylene (HDPE) bottles with polypropylene (PP) cap containing a polytetrafluoroethylene (PTFE) lining has been done. The concentration of impurities present was followed from incubation of these bottle at 40, 50 and 60 °C using extracting medium of 70% ethanol (EtOH), 0.1N hydrochloric acid (HCl) and 0.01N of sodium hydroxide (NaOH). The results were compiled in a statistical program (Slimstats) that uses Arrhenius Law to predict the trend for an incubation at 40 °C from the datas obtained at 50 and 60 °C. The theoretical value is compared to the practical value and shows that the prediction is valid in 83% of cases. This proves that the use of these kind of program in E&L studies is a viable tool.

Chapitre 1 - Introduction générale

1.1 Mise en contexte

Un médicament a pour but d'offrir un bénéfice thérapeutique. Idéalement, on s'attend à ce que le médicament soit pur et exempt d'impureté. En d'autres mots, il devrait seulement y avoir l'ingrédient pharmaceutique actif (API) et les excipients dans le médicament. En pratique, certaines impuretés peuvent se retrouver dans le produit fini au moment de son utilisation. Ces impuretés peuvent être connues ou inconnues et provenir de plusieurs sources différentes. Les critères pour l'analyse d'impureté sont généralement régis par les institutions de réglementation gouvernementales comme Santé-Canada ou l'Administration des aliments et des médicaments (*Food and Drug Administration* (FDA)) aux États-Unis. Les différentes pharmacopées comme celle des États-Unis (*United States Pharmacopoeia* (USP)) ou celle d'Europe (*European Pharmacopoeia* (EP)) suivent ces recommandations et ces règlements en fournissant des monographies dictant les tests à faire pour un API. Il est important d'étudier ces impuretés pour établir leur toxicité ou leur impact sur l'intégrité du médicament. Cela peut être fait en observant les effets secondaires ou par une altération de la performance du produit actif ou simplement une altération physique du produit actif. Connaître l'identité, la quantité et la source d'une impureté donne lieu à la mise en place de mesures pour éviter ou contrôler sa présence.

Les impuretés provenant de la synthèse sont connues et les tests par rapport à ses impuretés sont souvent inclus dans la monographie du médicament. On peut donc créer des méthodes d'analyse ciblant ces impuretés et ainsi surveiller leur présence et leur quantité lors de la production en masse du médicament. Il y a cependant d'autres impuretés qui peuvent provenir des additifs d'un médicament comme les colorants, les saveurs ou les agents de conservation pour en nommer que quelques-uns. Ces impuretés sont souvent plus difficiles à cibler et moins constantes d'un lot à l'autre lors de la production en masse, surtout puisque les fournisseurs peuvent changer avec le temps. Une autre source est l'environnement avec lequel le médicament est en contact. Le terme environnement est très large et peut aller du système utilisé pour l'administration comme une seringue jusqu'à l'emballage dans lequel le médicament est entreposé. Il faut donc aussi inclure le bouchon, l'étiquette collée sur le contenant, l'encre sur l'étiquette ou encore même la boîte dans laquelle l'emballage est transporté. En gros, il s'agit de tous les matériaux qui ont été en contact direct ou indirect avec le médicament de la production à l'administration au patient. Pour simplifier la terminologie, on englobe tous ces types d'environnement sous le terme « Système de fermeture de récipient » (*container closure system* (CCS)).

Plusieurs analyses dans les dernières années ont démontré l'éventail des sources d'où peuvent provenir les impuretés (Sharma *et al.*, 2004; Trier *et al.*, 2011). D'autres cas ont montré que la source d'impureté peut avoir un léger contact ou être en contact indirect avec le médicament (Paskiet et Kiehl, 2021). Le cas de contamination du médicament Eprex® entre 1998 et 2004 a suscité une inquiétude grandissante concernant les E&Ls (Wakankar *et al.*, 2010). Depuis, l'attention sur les E&Ls a augmenté et les responsables des analyses de contrôle qualité s'efforcent d'améliorer les processus dans les études E&Ls.

1.1.1 Industrie de l'emballage plastique

L'industrie des CCS en plastique contient plusieurs niveaux dans sa chaîne de production (Figure 1) et chacun de ses niveaux participe à sa manière dans la production d'un CCS (Zweiben, 2010). « N » étant le niveau final où le CCS est utilisé, l'assemblage des CCS et l'ajout d'additifs sont faits à un niveau précédent « N-2 » qui obtient les monomères d'un niveau antérieur à N-2 soit « N-4 ». Chaque entreprise participant à cette production opère avec ses secrets de fabrication ainsi qu'avec de l'équipement qui peut varier d'année en année. Il est pratiquement impossible de revenir dans la chaîne de production pour connaître la source d'une impureté ou encore de cibler d'avance cette source. De plus, avant d'être utilisé, le CCS doit être entreposé en stockage de masse comme dans des boîtes de carton ou sur des palettes de transport. Tous ces éléments sont des sources possibles d'impureté et, en fonction de la température, de l'exposition à la lumière et de l'humidité, les composés du CCS peuvent subir des dégradations ou s'altérer avec le temps. L'amalgame de composé qui se retrouve dans le plastique au moment de l'utilisation peut être une immense source de contamination. Évidemment, toutes les impuretés potentielles ne se retrouveront pas nécessairement dans le médicament.

1.1.2 Extractables et lessivables

Il serait possible de faire un dépistage direct des impuretés dans un médicament, mais cela n'est pas pratique. Bien que les impuretés soient identifiées, cette information ne fournit pas d'indication sur la provenance de ces impuretés. Étant donné la complexité d'un médicament, il faut être capable de différencier d'où provient une impureté. Les analyses permettant de bien cibler les impuretés provenant du CCS sont appelées les analyses d'extractables et lessivables (Extractables and leachables, E&Ls). Ces analyses se basent sur la différence entre les impuretés potentielles que l'on peut retrouver dans le médicament, soit les extractables, et ceux que l'on retrouve dans le médicament, soit les lessivables.

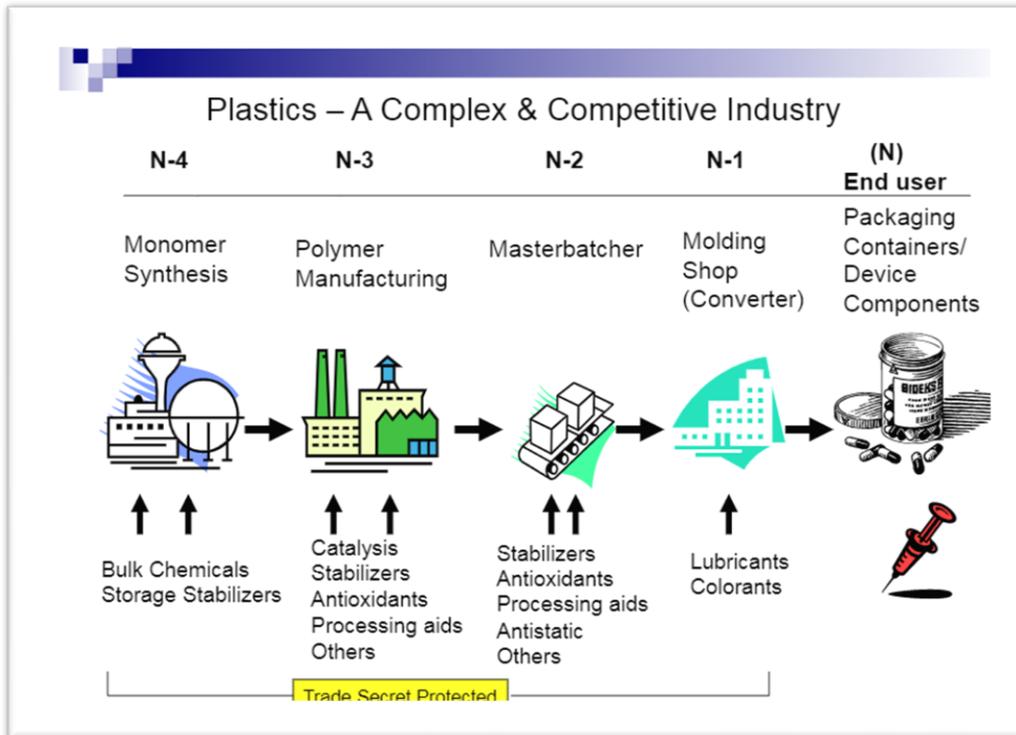


Figure 1 - Chaîne d'approvisionnement d'un contenant pour une compagnie pharmaceutique (Zweiben, 2010)

En d'autres mots, les lessivables sont n'importe quels composés chimiques présents dans un milieu parce qu'ils ont migré à la suite d'un contact avec le médium sous des conditions normales ou accélérées d'entreposage. En rappel, le médium est un matériel présent durant la fabrication du médicament, son entreposage ou son administration. Le profil des lessivables devient une caractéristique du médicament et les impuretés trouvées doivent être considérées comme étant possiblement présentes dans le médicament lors de sa fabrication, son entreposage ou son administration.

En parallèle, les extractables sont tous les composés chimiques présents dans un milieu (autre que le médicament) par migration d'un médium durant des conditions agressives d'entreposage préétablies en laboratoire. Ces conditions sont généralement variées selon le solvant utilisé, la température, le taux d'humidité et le temps d'incubation des échantillons. Les conditions agressives forcent un maximum d'extractables à migrer vers le milieu d'extraction et ainsi avoir l'ensemble de tous les extractables possible. Idéalement, le milieu utilisé devrait refléter le plus possible la composition du médicament. Par exemple, s'il s'agit d'une solution saline, il n'est probablement pas nécessaire d'utiliser un milieu organique. De manière générale, les options de milieu d'extraction sont soit une solution à haut rapport en solvant organique, soit une solution aqueuse acide ou soit une solution aqueuse alcaline. Avec le profil des extractables et des lessivables obtenu en analysant les milieux d'extractions, la relation entre les extractables et les lessivables peut être faite. Le profil des extractables est utilisé comme banque de données pour

dresser le profil des lessivables. En d'autres mots, uniquement les impuretés trouvées dans les extractables seront recherchées dans les lessivables. Ainsi, une molécule provenant des excipients de l'échantillon ou d'une dégradation de ceux-ci ne devrait pas être retenue dans le traitement des données. Cette relation entre les extractables et les lessivables est extrêmement importante et est la base de l'analyse E&L, c'est ce qui permet d'affirmer que la source de ces impuretés est bien le CCS.

1.2 Méthode générale

L'extraction des E&Ls est souvent sujette à beaucoup de changement d'étude en étude vu la variation de la composition des médicaments et des critères d'entreposage. Les paramètres d'extraction doivent être évalués selon chaque combinaison de médicament/CCS. Par exemple, une solution saline dans un vial en verre ne nécessitera pas les mêmes conditions d'extraction qu'un sirop dans un CCS en plastique. Conséquemment, si le CCS d'un médicament est changé au fil des années, une étude E&L doit être refaite. Il est important de pouvoir s'assurer que d'analyse en analyse, les résultats seront constants et précis. Cela demeure un des plus gros défis des analyses E&Ls. Des lignes directrices générales ont été décrites par USP dans les chapitres <1663> et <1664> (<1663>, 2022; <1664>, 2021). Le Conseil International d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH) prévoit sortir en 2023 un guide approfondi des études E&Ls (Q3E, 2020). En attendant, bien que ces chapitres fournissent une idée générale du protocole à suivre, beaucoup d'informations sont laissées aux jugements des analystes. Les grandes lignes de ces analyses ont été tracées, mais il reste beaucoup d'amélioration à faire. Une étude E&L est un long processus qui peut être séparé en trois grandes étapes; l'extraction des E&Ls, la détection et le traitement des données. Chacune de ses étapes peut être traitée comme une méthode à part entière et être optimisée indépendamment des autres étapes.

1.2.1 Méthode d'extraction

Le but d'une analyse d'extractables est d'imiter les conditions du temps de vie du médicament; la température, le taux d'humidité, le niveau de contact et le temps. Étant donné que le temps de péremption d'un médicament peut souvent être quelques années, il est important de trouver des moyens d'accélérer ce vieillissement dans le cadre d'une étude E&L pour obtenir les résultats plus rapidement. La migration des E&Ls vers le milieu d'extraction est considérée comme une réaction chimique de premier ordre selon la Société Américaine pour les Essais et les Matériaux (*American Society for Testing and Materials* (ASTM)) et il est reconnu dans l'industrie qu'on peut utiliser la loi d'Arrhenius pour déterminer les paramètres de vieillissement accéléré de cette façon. Le concept se résume à ; pour chaque augmentation ou diminution de 10 °C, la vitesse

d'une réaction changera par un facteur de 2. Ainsi, avec les équations EQ.1 et EQ.2, les mêmes résultats pourraient être obtenus pour un médicament ayant une date de péremption de 2 ans à 20 °C en incubant à 40 °C pendant 6 mois (EQ.3) (Jenke, D., 2019).

$$\text{EQ.1} \quad AAF = Q_{10}^{\frac{T_{AA}-T_{REF}}{10}}$$

$$\text{EQ.2} \quad AAT = \frac{t_{ref}}{AAF}$$

AAF = Facteur de vieillissement accéléré
 Q_{10} = Facteur de vieillissement, conventionnellement 2.0
 TAA = Température de contact accélérée
 TREF = Température d'utilisation typique
 AAT = Temps de vieillissement accéléré
 t_{ref} = Temps d'utilisation typique

$$\text{EQ.3} \quad AAF = 2.0^{(40^{\circ}\text{C}-20^{\circ}\text{C})/10} = 4$$

$$AAT = \frac{730 \text{ jours}}{4} = 182 \text{ jours} = \sim 6 \text{ mois}$$

Ce concept est applicable dans les études de lessivables puisqu'on analyse le médicament tel quel suite à son entreposage en présence du CCS. Cependant, pour les extractables, des milieux d'extraction plus agressifs sont utilisés ce qui change les paramètres de réaction, on ne peut pas utiliser la loi d'Arrhenius aussi facilement. Le Q_{10} peut être modifié pour exagérer le calcul et obtenir un « worst-case scenario », mais cela revient à un jugement de l'analyste et cause des variabilités entre les analyses. Le concept a aussi certaines limitations par le fait que la température ne peut pas être indéfiniment augmentée pour accélérer l'extraction. À haute température, le polymère peut subir des déformations ce qui affecte l'étanchéité du CCS et une dégradation des impuretés peut être observée (Cartledge *et al.*, 2020).

La nature du milieu d'extraction pour la partie extractables joue un grand rôle dans le groupe de composé chimique qui migrera du CCS. Il est souvent suggéré d'utiliser des solvants qui ressemblent le plus possible à la composition du médicament. S'il y a présence de solvant organique dans le médicament, il serait judicieux d'utiliser un milieu d'extraction à fort pourcentage organique. En termes de pH, on cherche à englober celui du médicament. Un large écart de pH englobe un maximum d'impureté, mais, cela peut ne pas être nécessaire dépendamment de la composition du médicament.

1.2.3 Techniques d'analyse

Des solutions d'extraction contiennent un nombre aléatoire d'impuretés de concentration et identité inconnu, sans compter que la matrice d'un médicament dans le cadre de l'extraction des lessivables peut être très complexe. Il est donc important de pouvoir s'assurer d'une bonne séparation et détection de tous les composés présents. Le nombre d'impuretés possible étant très large, on les regroupe généralement en trois catégories; les composés organiques, inorganiques et les solvants résiduels. Évidemment, aucune méthode analytique n'a la capacité d'analyser tous ces composés à elle seule. Il est reconnu que plusieurs techniques analytiques doivent être utilisées pour dépister la totalité des impuretés. Le défi est de savoir utiliser des techniques qui par leur mécanisme de détection et de séparation peuvent regrouper le dépistage d'un maximum d'impureté (Jenke, D. R. *et al.*, 2006; Kumar, 2021). Comme décrit dans le tableau 1, les techniques chromatographiques sont généralement utilisées pour le dépistage des composés organiques et ioniques tandis que les techniques de spectroscopie atomique sont utilisées pour les impuretés élémentaires.

En chromatographie, les composés sont transportés et séparés dans une colonne chromatographique à l'aide d'une phase mobile où ils sont plus ou moins retenus par la phase stationnaire dépendamment de leur affinité pour cette phase stationnaire. La séparation des composés durant l'élution facilite la détection et l'analyse des impuretés en plus de fournir certaines informations structurales sur l'analyte compte tenu de son affinité pour la phase stationnaire (Coskun, 2016). En chromatographie gazeuse (GC), l'échantillon est vaporisé à l'entrée de la colonne et transporté par un gaz porteur au travers de la phase stationnaire qui peut être liquide ou solide. Le GC avec l'échantillonnage à espace de tête (Headspace (HS)) où les analytes sont déjà sous forme gazeuse est la technique primaire pour l'analyse de composé organique volatil (VOC). Cette technique donne aussi un indice du niveau de volatilité des composés puisque les composés les plus volatils seront plus portés à se trouver dans l'espace de tête au-dessus de l'échantillon liquide comme dans l'exemple du parfum dans la figure 2. À l'autre extrême, les composés organiques non volatils (NVOC) sont analysés de façon optimale par la chromatographie liquide (LC). Entre les deux, on retrouve les composés organiques semi-volatils (SVOC) qui sont analysés en GC, mais par injection liquide. Bien que l'on décrive ces méthodes comme ayant une utilisation spécifique, la réalité est que certains de ces composés peuvent être analysés de plusieurs façons. La clé est de les utiliser de façon complémentaire, car chacune de ses techniques donnent des informations uniques et présente une sensibilité différente. Les composés inorganiques ou les petits acides organiques sont analysés par chromatographie ionique (IC) et finalement, la technique la plus efficace et la plus reconnue est la spectrométrie de plasma à couplage inductif (ICP). L'échantillon passe par une torche à plasma à plus de 7000 K et cela atomise tous les composés présents, ce qui permet de mieux analyser des matrices complexes. L'ICP est donc privilégié comparativement aux autres techniques spectrométriques comme la spectrométrie d'absorption atomique (AAS) (Harris ; Jenke, D., 2018).

Tableau 1 - Techniques analytiques utilisées par type de composé chimique

Méthode analytique	E&Ls analysés	Analyte d'intérêt
GC-MS (Headspace)	Organique volatile	Adhésif, Encre, Solvants
GC-MS (Direct Injection)	Organique semi-volatile	Plastifiants, PAHs*, Agents conservateurs
HPLC-UV-MS	Organique non-volatile	Antioxydant phénolique
ICP-MS	Élémental	Tous les éléments mentionnés dans USP <232>

*Hydrocarbure aromatique polycyclique

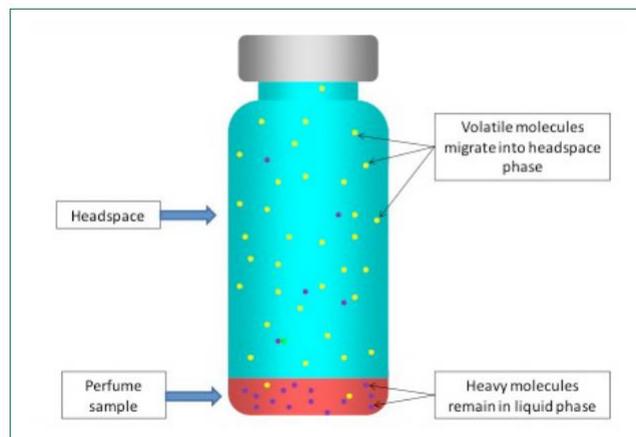


Figure 2 - Vial d'un échantillon de parfum liquide où les composés plus volatils sont en plus grande concentration dans l'espace de tête comparativement aux composés moins volatils qui sont en plus grande concentration dans le liquide (Tipler, 2014)

Tout dépendant de ce qui est visé pour l'étude, utiliser toutes ces techniques n'est pas toujours nécessaire. Comme mentionné précédemment, les études E&Ls n'ont pas de protocole précisément établi. Chaque étude est faite selon ce qui est considéré nécessaire pour l'échantillon en suivant les recommandations des instances gouvernementales. Ce qui veut dire que parfois il pourrait être justifiable de seulement faire l'analyse des NVOCs dans la mesure où on veut être optimale et rapide dans l'obtention de résultat. Il reste que pour être le plus rigoureux possible et maintenir une optique de « worst-case scenario », l'idéal serait de toujours faire l'étude E&L complète.

1.2.3 Identification des impuretés

Plusieurs détecteurs peuvent être associés aux techniques d'analyse mentionnées précédemment. Par exemple, les détecteurs ultraviolets (UV) sont très utiles et fiables dans le cadre d'analyse de contrôle qualité lorsqu'on connaît l'analyte recherché. En revanche, ce n'est pas une technique viable dans le contexte d'une étude de dépistage d'impureté puisque plusieurs molécules peuvent absorber à la même longueur d'onde. Depuis plusieurs années, la spectrométrie de masse (MS) est l'un des meilleurs détecteurs en chimie analytique par son excellente reproductibilité, sa spécificité et sa sensibilité. Le MS détecte les analytes selon leur ratio de masse sur charge (m/z) et chaque molécule à un m/z précis, deux molécules ayant le même temps de rétention peuvent être facilement détectées simultanément. Pour ces raisons, ce détecteur est favorisé dans le cadre de dépistage d'impuretés inconnues. Les appareils MS ont deux principales composantes, la source d'ionisation et l'analyseur de masse. Chaque source d'ionisation n'est pas compatible avec tous les appareils analytiques et elles ont chacune leur avantage et désavantage. Il est important d'établir les besoins de l'analyse et de bien choisir la source d'ionisation qui s'applique le mieux à la méthode choisie. L'utilisation des sources d'ionisation est résumée dans la figure 3 et démontre que l'ionisation par électronébulisation (ESI) (API-Electrospray) est celle qui couvre le plus large éventail de molécule, mais que d'autres sources pourraient permettre de mieux détecter certaines molécules. Les principales sources d'ionisation sont l'ESI ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) pour LC-MS et l'ionisation chimique (CI) ou l'ionisation à impact électronique (EI) pour GC-MS (ThermoFisher, 2023).

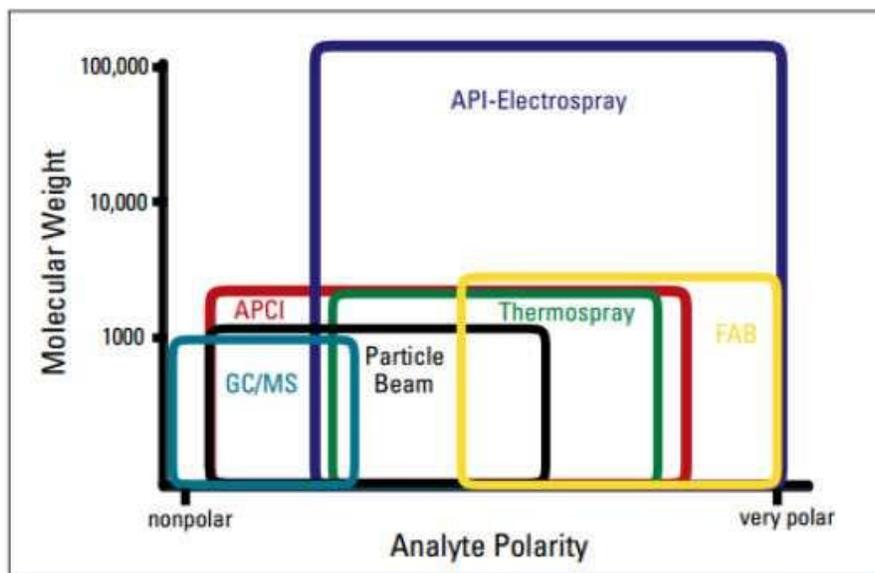


Figure 3 - Différence de détection entre les différentes sources d'ionisation en fonction de la polarité et du poids moléculaire des analytes (ThermoFisher, 2023)

Le choix de l'analyseur de masse dépend de l'objectif de la méthode. Il existe commercialement deux catégories d'analyseur de masse, ceux à basse résolution (LRMS) et ceux à haute résolution (HRMS). Bien que ceux à basse résolution puissent très bien effectuer le travail et identifier des molécules, la distinction entre deux molécules à bas poids moléculaire nécessite la sensibilité et la précision des analyseurs à haute résolution comme l'analyseur à temps de vol (TOF) ou l'Orbitrap (Allen et McWhinney, 2019; Booij et Creasey ; Harris).

La masse exacte déterminée par le ratio m/z permet d'obtenir la formule empirique de l'analyte. Pour les analyses de métaux et certains non-métaux par ICP-MS, l'identification est directe, on connaît immédiatement quel élément est présent. Cela ne s'applique pas aussi facilement aux molécules polyatomiques, car plusieurs liaisons sont possibles pour une formule empirique donnée, on n'obtient donc généralement qu'une identification partielle. Des banques de données commerciales ou publiques sont disponibles et parfois fournies avec les logiciels de traitement de données des spectromètres de masse. Les banques de données sont couramment utilisées en GC-MS par la quasi universelle utilisation de l'EI comme source d'ionisation contrairement au LC-MS qui manque de constance due aux multiples sources d'ionisation et analyseurs de masse.

Pour une identification plus détaillée, il est possible de combiner les analyseurs de masse. Lorsqu'on combine deux MS de cette façon, le premier MS sert à fragmenter les molécules qui seront ensuite analysées par le deuxième MS. Par exemple, le spectromètre de masse en tandem (MS/MS) est un excellent outil pour l'élucidation structurale de composé inconnu. On peut aussi penser au MS-QTOF qui offre la haute résolution du QTOF ainsi que la fragmentation. Le spectre MS des fragments procure énormément d'information sur la structure de l'analyte. Même avec ces outils, il est de mise de comparer l'impureté identifiée à un standard pour confirmer son identité. D'autres techniques comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) et les spectres infrarouges (IR) sont souvent employés comme outil parallèle aux spectres MS pour aider à l'identification (Thomas *et al.*, 2012). Dans tous les cas, une confirmation avec un standard de l'impureté est fortement conseillée sinon on ne s'en remet qu'au comparatif avec les banques de données qui peuvent dans certains cas donner des fausses identifications. D'autant plus que l'utilisation d'un standard permet la quantification de l'impureté (Allen et McWhinney, 2019; Booij et Creasey).

1.3 Évaluation des risques

1.3.1 Seuil de préoccupation pour la sécurité

Les résultats d'analyse E&L peuvent souvent contenir un très grand nombre de molécules (voir une liste partielle de molécule potentielle d'étude E&L) (Jenke, D., 2015). Identifier et quantifier toutes ces molécules est manifestement un travail laborieux et n'est potentiellement pas

toujours nécessaire. De manière générale, on reconnaît qu'il peut y avoir un niveau d'exposition minimum, donc une concentration minimale, en dessous duquel les effets indésirables d'une impureté sont négligeables, peu importe l'identité de celle-ci. Cette concentration minimale devient ainsi un barème dans le dépistage des études E&L. Toutes les impuretés en dessous de ce seuil seront filtrées et n'auront pas à être signalées, cette limite est définie comme étant le seuil de préoccupation pour la sécurité (*Safety Concern Treshold (SCT)*). Par exemple, l'Institut de recherche sur la qualité des produits (*Product Quality Research Institute (PQRI)*) a établi en 2008 un SCT de 0.15 µg/jour pour les produits pharmaceutiques inhalés par voie orale et nasale (OINDPs) (Norwood, D. L. *et al.*, 2008). Cette recommandation a été fortement acceptée dans l'industrie et le PQRI a publié en 2021 un SCT de 1.5 µg/jour pour les médicaments parentéraux (intraveineux, sous-cutané et intramusculaire) (Houston *et al.*, 2022). Cependant, ces SCTs sont spécifiques à des groupes de médicament en particulier, on ne peut pas l'appliquer de façon générale à tous les groupes de médicament. Il faut prendre en ligne de compte le degré de risque des groupes de médicaments dépendamment de la voie d'administration et du taux d'interaction entre le médicament et le CCS (tableau 2). Le degré de contact entre un médicament et le CCS varie en fonction de la forme physique du médicament. S'il s'agit d'un médicament liquide, les interactions avec le CCS sont beaucoup plus grandes qu'un médicament sous forme de comprimé. La voie d'administration d'un médicament affecte aussi le degré de risque. Une impureté possédant une certaine toxicité présente moins de risque si le médicament doit être consommé oralement comparativement à une injection intraveineuse. Il faut garder en tête que ces valeurs ne sont que des recommandations et que certaines impuretés devront être traitées en cas par cas. On peut penser aux groupes fonctionnels reconnus pour potentiellement causer plus de risque pour la santé comme les aflatoxin-, les N-nitroso- et les alkyl-azoxy (Ponting et Foster, 2023).

Tableau 2 - Évaluation des risques par groupe de médicament selon la voie d'administration et l'interaction du médicament avec le CCS (<1664>, 2021)

Probabilité d'interaction entre le médicament et le CCS			
Degré de risqué selon la voie d'administration	Haute	Moyenne	Basse
Haut	Aérosols et solutions pour inhalation ; Injections et suspensions injectables	Poudres stériles et poudres pour injection; Poudres pour inhalation	
Moyen	Solutions et suspensions ophtalmiques ; onguents et timbres transdermiques ; Aérosols et vaporisateurs nasaux		
Bas	Solutions topiques et suspensions ; aérosols topiques et linguaux ; Solutions orales et suspensions	Poudres topiques ; Poudres orales	Comprimés oraux et gélules orales

1.3.2 Seuil d'évaluation analytique

Le SCT est utilisé pour calculer le seuil d'évaluation analytique (*Analytical evaluation treshold* (AET)) qui tient compte des paramètres du médicament comme le dosage et de la méthode analytique utilisée (EQ.4). En utilisant un étalon à la concentration du AET, on peut filtrer les signaux d'impuretés. L'application du AET est démontrée dans la figure 4. Avec l'étalon « A », on peut tracer une ligne arbitraire (pointillé) pour trier les autres pics du chromatogramme. Dans cette situation, le pic « B » devra être identifié et quantifié tandis que le pic « C » est considéré comme ayant un risque négligeable pour la santé. Cet exemple est la méthode la plus simple de l'utilisation du AET. En réalité, l'intensité des signaux en MS n'est pas proportionnelle à la concentration entre les différents composés chimiques, ce qui veut dire que « C » pourrait être plus concentré que « A » malgré leur différence en intensité.

$$\text{EQ.4} \quad AET \frac{\mu\text{g}}{\text{CCS}} = \frac{SCT \mu\text{g}/\text{jour}}{\# \text{dose}/\text{jour}} \times (\# \text{dose total par contenant})$$

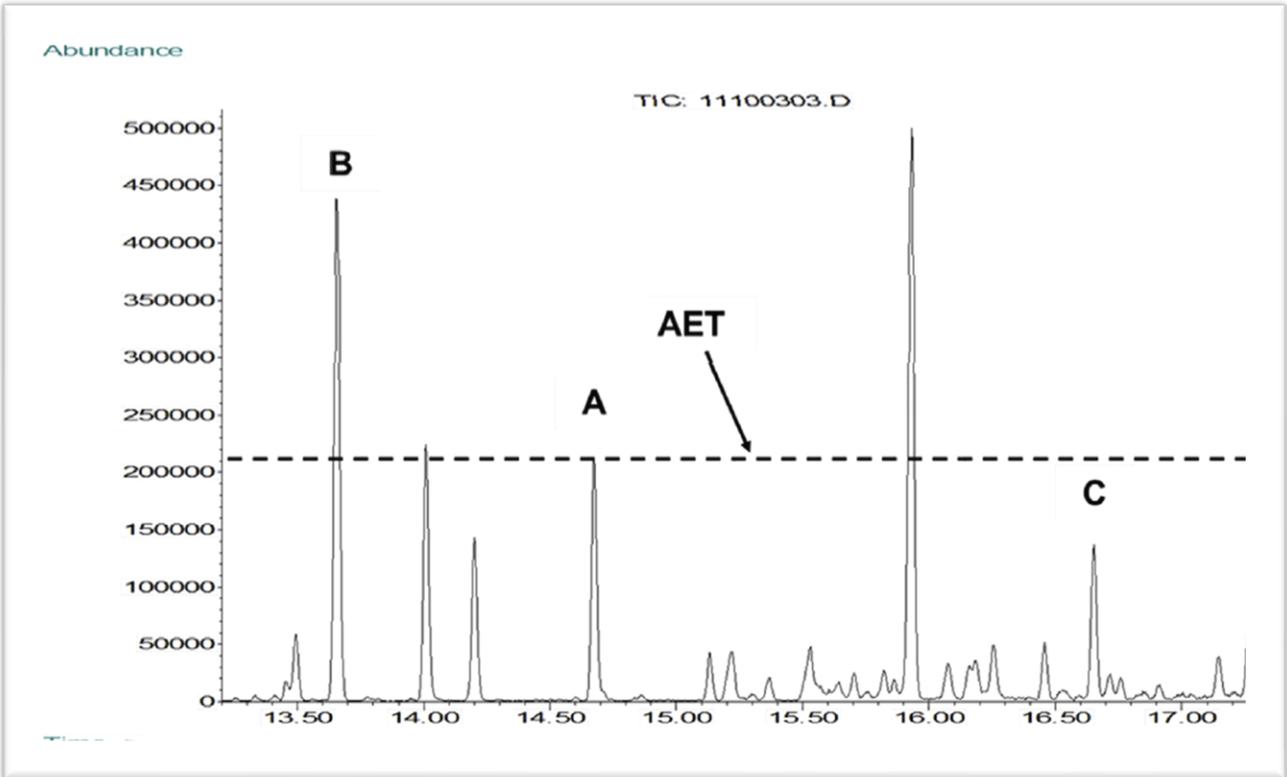


Figure 4 - Application de l'AET avec l'étalon A. La bande pointillé délimite les pics à identifier et quantifier (en haut de la ligne (B)) et les pics qui ne présentent pas de risque (en bas de la ligne (C)) (Jenke, D., 2018)

Plusieurs autres recommandations ont été soumises pour améliorer l'utilisation du AET et pallier le risque d'une mauvaise estimation des concentrations. Une des propositions est un facteur de réponse (RF) entre l'intensité de l'impureté (R_A) et du standard interne (R_S). Le RF peut être sujet à des variations selon l'appareil utilisé et la méthode chromatographique. Le facteur de réponse relatif (RRF) règle ce problème puisqu'il est un rapport de la pente de calibration de l'impureté sur celle de l'étalon. L'objectif est de comptabiliser et répertorier ce rapport entre chaque impureté identifiée et l'étalon. Dans l'optique ou une banque de données, des RRF sont développées, il serait possible de les utiliser dans les études E&L subséquentes. Avec ce concept, si RRF est connu ou inconnu, mais très près de 1, l'estimation de la concentration est très précise. En contrepartie, plus le RRF est loin de 1 et qu'il est inconnu, l'estimation n'est pas précise. Bâtir une telle banque de données peut prendre énormément de temps vu le grand nombre d'impuretés possible d'obtenir dans les études E&L. Ce concept serait applicable après plusieurs études lorsqu'assez de RRF ont été calculés. En attendant, il est suggéré de corriger l'estimation des concentrations par un facteur de 2. Cette correction provoque la détection d'un plus grand nombre de molécules qui se trouvaient normalement dans la zone d'incertitude de la figure 5 et ainsi éviter de sous-estimer les composés qui s'y trouvent. Bien que l'ajustement avec un facteur 2 est bien reconnu, cela demeure propre au jugement et peut être modifié au besoin. Dans le cas

d'incertitude, un facteur de 4 devrait englober 90% de la population d'impureté. Dans une étude par Jenke et Odufu, le RRF de 30 composés a été calculé et représenté dans la figure 6. On peut voir que la majorité des composés ont un RRF de 0.5 et plus. Une correction par un facteur de 2 (Final AET) ferait en sorte que ces composés devraient être identifiés et quantifiés dans une étude E&L. Un facteur de 4 serait optimal en englobant aussi les composés allant jusqu'à un RRF de 0.25 (Jenke, D. et Odufu, 2012).

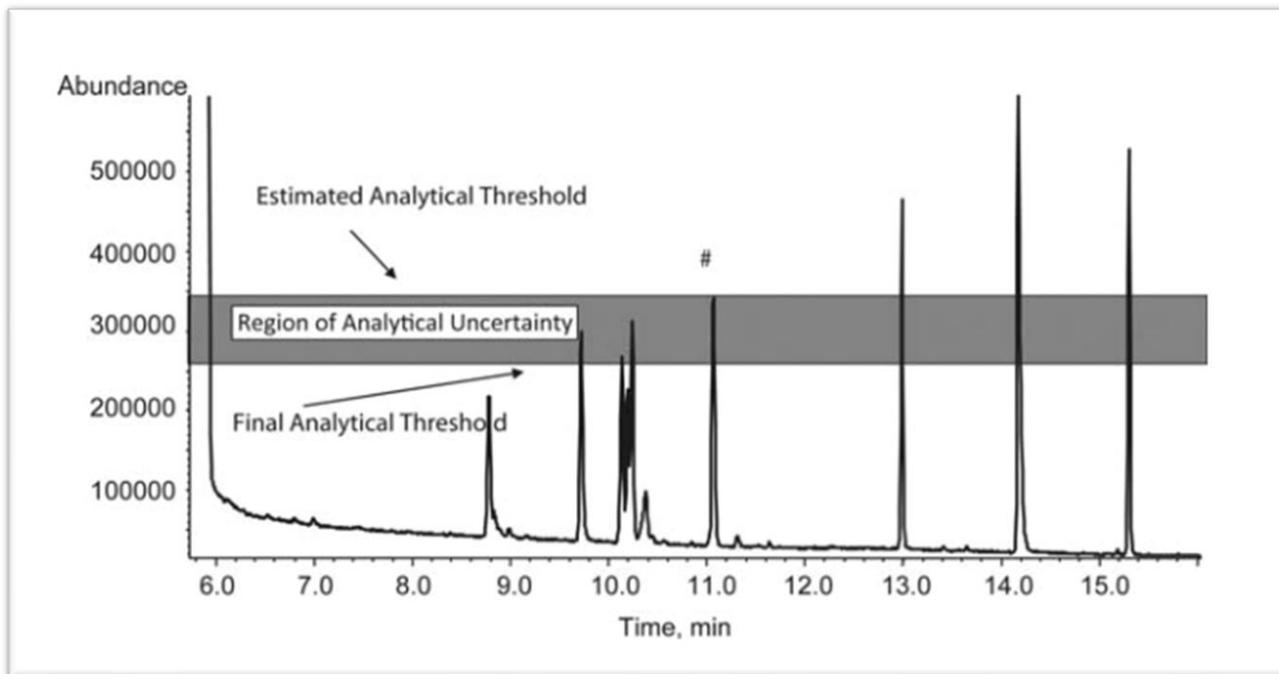


Figure 5 - Chromatogramme d'un AET corrigé par un facteur de 2 (Jenke, D. et Odufu, 2012)

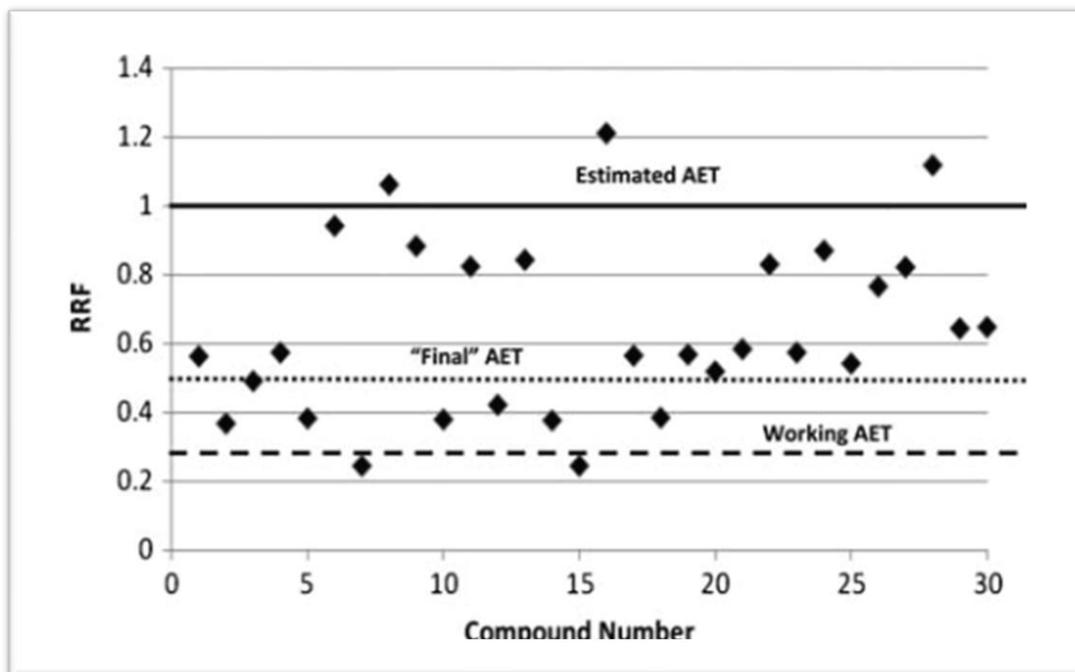


Figure 6 - RRF de 30 composés par rapport à l'étalon 2-Fluorobiphenyl (Jenke, D. et Odufu, 2012)

1.3.3 Choix de l'étalon

Puisque l'étalon est directement lié avec l'AET, un mauvais choix d'étalon pourrait causer l'exclusion de certaines impuretés qui en réalité sont au-dessus du AET. La figure 7 représente ce problème. Les étalons 1 et 2 sont à la même concentration et pourtant le choix de l'étalon 1 pourrait négativement influencer la détermination des impuretés à identifier et quantifier. Dans une étude par Jordi et al. (2020), les auteurs proposent une approche avec plusieurs étalons (Jordi *et al.*, 2020). En utilisant une base de données incluant plusieurs étalons, les études E&L deviendraient de plus en plus précises. L'idée est que même si un étalon peut sembler moins optimal, comme l'étalon 1 dans la figure 7, il pourrait s'avérer idéal pour l'estimation de la concentration d'une impureté avec lequel le RRF est de 1. Éventuellement, il serait possible que pour une méthode analytique donnée, on utilise toujours le même groupe d'étalons ayant une large gamme de réponses pour couvrir le plus de RRF possibles.

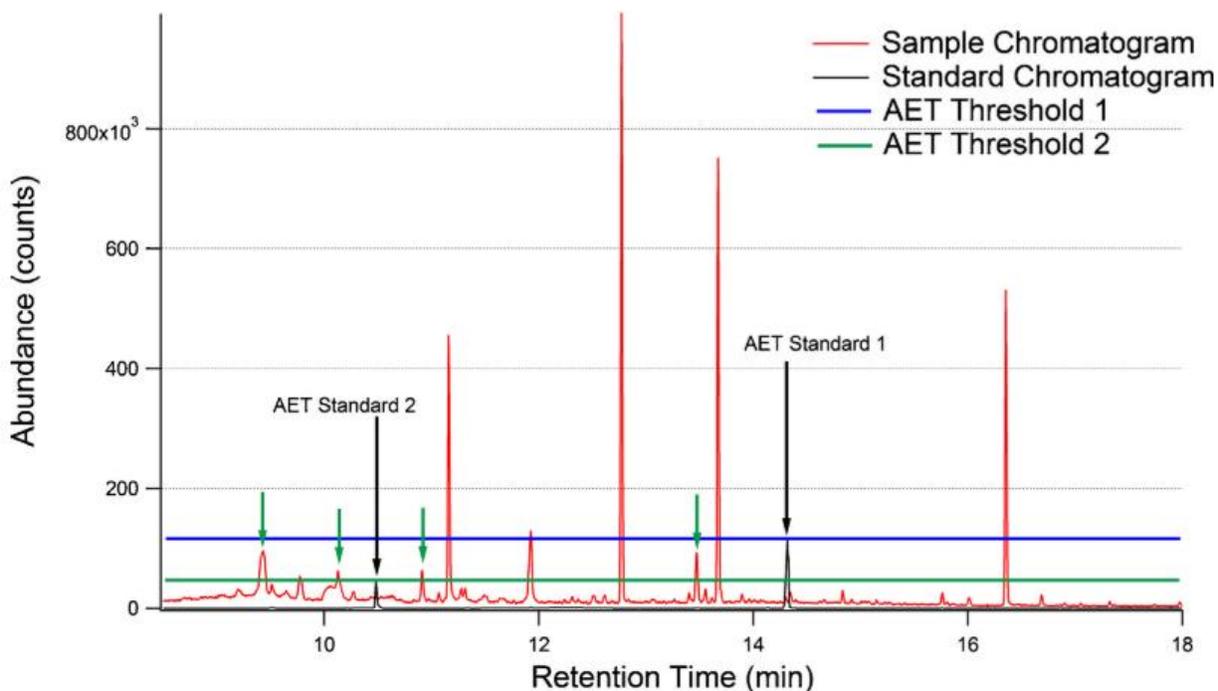


Figure 7 - Différence de signal entre deux étalons (Standard 1 et 2) de même concentration et leur effet sur la filtration des impuretés (Jordi et al., 2020)

1.4 Objectifs

Dans le cadre de ce mémoire, les trois étapes d'une étude E&L sont réévaluées. En première partie de projet, une nouvelle méthode UHPLC-QTOF est développée pour détecter les NVOCs. Cette méthode utilise un groupe d'étalons qui reflète le type de molécule que l'on retrouve habituellement dans une étude E&L. Ces étalons assureront l'adéquation du système d'étude en étude. Ils permettront une meilleure estimation de la concentration des impuretés détectées et garantiront que la majorité des impuretés sont belles et bien détectées par la méthode. Les paramètres chromatographiques sont optimisés dans le but d'obtenir des formes et des intensités de pics le plus idéal possible. Une validation est ensuite faite afin de confirmer l'efficacité et la pertinence de la méthode.

En deuxième partie de projet, une étude cinétique de l'extraction des E&Ls est réalisée. Cette étude suivra la concentration d'une liste d'extractibles au fil du temps dans des contenants de polyéthylène téréphtalate (PET) et de polyéthylène à haute densité (HDPE). Ces deux types de polymères sont très communs autant en pharmaceutique que dans l'industrie alimentaire. Les extractibles sont obtenus par des incubations à haute température (40, 50 et 60 °C) en présence de solvant agressif (EtOH, alcalin et acide). Les lessivables sont aussi suivis en utilisant une formulation simplifiée de sirop pour la toux à base de dextrométhorphan dans des températures plus douces (25, 30 et 40 °C). L'intention de cette partie est d'utiliser les données

à plusieurs temps d'incubation à une température donnée pour prédire la concentration d'une impureté à une autre température. Quelques études se sont penchées sur la prédiction des résultats en développant des modèles statistiques ou mathématiques, mais les résultats demeurent très variables selon l'impureté (Cartledge *et al.*, 2020; Jenke, D., 2019). Le logiciel Slimstats est normalement utilisé dans les études de stabilité pour déterminer le temps de vie d'un médicament. À partir des données obtenues à de plus hautes températures, Slimstats peut calculer le temps requis pour qu'un API se dégrade en dessous d'une spécification à sa température d'entreposage. Cette deuxième partie de projet approfondit l'approche statistique de prédiction de résultat, vérifie l'application du programme statistique Slimstats à cet effet et tente d'établir une corrélation entre la cinétique d'extraction des extractables et celle des lessivables.

Chapitre 2 - Développement de méthode

Les méthodes GC-MS à espace de tête et GC-MS pour l'analyse respective des VOCs et SVOCs sont depuis longtemps bien établis dans le milieu des E&Ls. Avec les multiples banques de données disponibles et la constance des résultats, le dépistage des VOCs et SVOCs est plus simple que pour les NVOCs en LC-MS. Peu d'évaluations ont été faites sur l'utilisation du LC-MS dans les études E&Ls. On peut cependant facilement trouver plusieurs études utilisant le LC-MS pour dépister les contaminations dues aux additifs de plastique et caoutchouc dans l'environnement. C'est donc dans le but d'améliorer les analyses de dépistage de NVOCs qu'une nouvelle méthode LC-MS est développée (Norwood, Daniel L. *et al.*, 2009).

2.1 Paramètres expérimentaux

2.1.1 Appareil HPLC-QTOF

Depuis plusieurs années déjà, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la technique de base en LC. La LC traditionnelle pouvait prendre plusieurs heures pour effectuer une séparation qui peut être maintenant faite en quelques minutes avec le HPLC. Le terme « HP » signifiait anciennement « haute pression », mais l'acronyme est maintenant reconnu comme étant « haute performance ». Une pompe à haute pression pousse les phases mobiles au travers de la colonne chromatographique pour accélérer l'élution des analytes. La pression moyenne de travail que peut soutenir un système HPLC est généralement entre 400 et 500 bar avec des colonnes chromatographiques ayant une grosseur de particule de 3 à 5 μm . Durant des années, les systèmes ont été améliorés et aujourd'hui certains systèmes à ultra haute performance (UHPLC) permettent d'aller jusqu'à 1000 bar de pression et de réduire la grosseur de particule à 1,7 μm . Ces systèmes sont souvent plus rapides, plus sensibles et utilisent moins de solvant. Le gros désavantage est la diminution du temps de vie des colonnes chromatographiques. Ce problème peut être pallié en réduisant le débit des phases mobiles et ainsi la pression durant les analyses, mais cela veut aussi dire augmenter le temps d'analyse. Ajouter une précolonne de garde prolonge, dans une certaine mesure, la durée de vie de la colonne en évitant les contaminations, la dénaturation et le blocage de la colonne, mais n'amoindrit pas l'usure provoquée par la haute pression (Harris).

Le choix de colonne chromatographique est extrêmement important en LC. On doit baser ce choix sur le type d'analyte que l'on s'attend à analyser. Dans le cas des études E&Ls, les molécules utilisées comme additifs dans l'industrie du plastique et du caoutchouc varient énormément. On peut y retrouver des phtalates, des amides d'acides gras ou d'autres molécules organiques (Hahladakis *et al.*, 2018). Pour ce type d'analyte, une colonne à phase inverse est la plus

appropriée pour une bonne séparation. La plus commune est la colonne ayant une phase stationnaire octadécyle (C_{18}) qu'on utilise généralement avec une combinaison de phase mobile polaire comme l'eau, le méthanol ou l'acétonitrile. Bien que la dimension de la colonne ait un impact sur la séparation des analytes, dans le cas d'un dépistage d'impuretés à très basse concentration, la séparation n'est pas autant importante. Considérant que le but de ce genre de méthode est d'effectuer quotidiennement des analyses de contrôle qualité, la rapidité est un facteur important dans le choix des paramètres. Une courte colonne est donc parfaitement justifiable pour cette méthode (Jenke, D. R. *et al.*, 2006; Legrand *et al.*, 2018; Vera *et al.*, 2018).

À la sortie du système LC, l'échantillon est encore sous forme liquide. Les sources d'ionisations ESI et APCI provoquent un changement de phase à l'entrée du MS en vaporisant l'échantillon. Le choix de l'analyseur de masse est la dernière étape avant le développement de méthode. Les E&Ls sont la plupart du temps inconnus et en très basse concentration. Le MS choisi doit prendre en compte que les analytes auront une grande variété de poids moléculaire, de concentration, de polarité et de structure. Le MS le plus adéquat pour ce genre de dépistage est le TOF. Les MS couplés donnent plus de fonctionnalité dont l'élucidation structurale des molécules inconnues, le QTOF en est un exemple (figure 8). À l'entrée de l'analyseur de masse, un premier quadripôle (Q1) permet de filtrer des ions spécifiques. Dans le cas d'un dépistage, l'écart des masses à analyser devrait être large. Le quadrupôle est formé de 4 tiges de métal parallèles jumelées en paires. En appliquant une tension positive et négative aux deux paires de tiges, les ions sont exclus ou conservés le long du quadripôle. Le deuxième quadripôle (Q2) sert de cellule de collision. C'est à cet endroit que les analytes sont bombardés de gaz neutre comme l'argon ou l'azote qui provoque une fragmentation des molécules par le processus de dissociation induite par collision (CID). De façon générale, cette option n'est pas utilisée dans le dépistage puisqu'on veut détecter les analytes intacts. L'option est quand même intéressante dans le cas où un analyte présente une concentration au-dessus du AET et qu'une identification complète doit être faite. À la sortie du Q2, les ions sont accélérés par un champ électrique (Ion Pulser) vers le détecteur. La détection des différentes masses se fait sous le principe que les ions de masse élevés se déplacent plus lentement que ceux à basse masse. Un « réflectron » est souvent inclus dans les TOFs modernes puisque certains ions de même m/z varient en temps de vol à cause de la dispersion de l'énergie cinétique et la propagation spatiale (Allen et McWhinney, 2019).

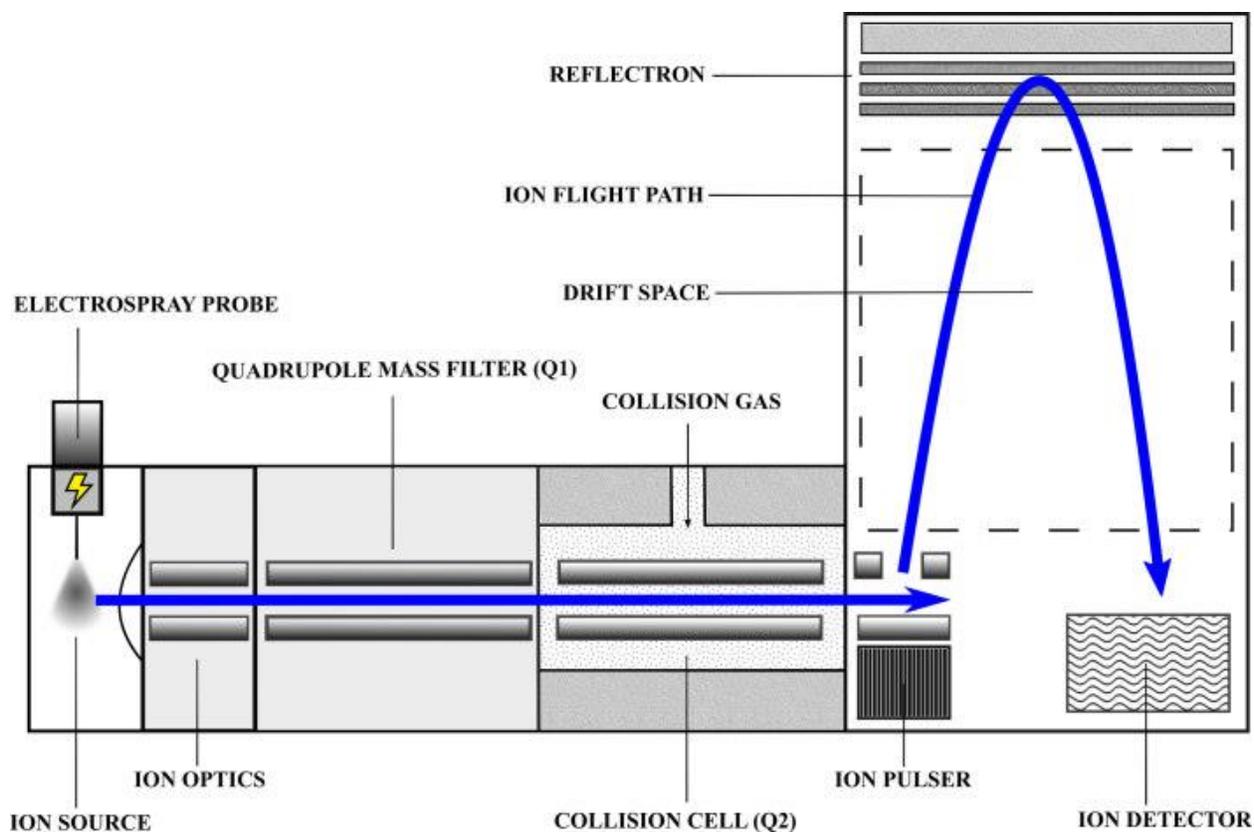


Figure 8 - Schéma d'un spectromètre de masse quadripôle et à temps de vol (Allen et McWhinney, 2019)

2.1.2 Matériel et réactifs

Le système utilisé est un Agilent 1290 Infinity II LC System couplé à un Agilent 6520B Accurate – Mass Q-tof. Les programmes suivants ont été utilisés pour le traitement des données; Agilent MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis version B.07.00 et version 10.0, Agilent Profinder version 10.0, Agilent Mass Profiler Professional version 15.1 (MPP) (Agilent), SlimStats v. 5.0.0 (H&A Scientific - Slimstat). Toute la verrerie utilisée est de classe A.

L'érucamide (EC), l'irgafos 168 (IRG168), l'antioxydant 2246 (AO2246), le bisphénol A (BPA), l'acide myristique (MA), l'acide palmitique (PA), l'acide stéarique (SA), l'acide oléique (OA), l'irganox 1330 (IRG1330), l'irganox 1076 (IRG1076), l'irganox 1010 (IRG1010), l'ammonium acétate, l'ammonium formate, le sorbitol, l'acide citrique, le benzoate de sodium, le dextrométhorphan et l'hydroxyde d'ammonium proviennent de Sigma-Aldrich. L'hostanox 03 (H03) provient d'AccuStandard. L'irganox 3114 (IRG3114) provient de TCI America. L'hydroxytoluène butylé (BHT) et le dichlorométhane proviennent de Supelco. L'oléamide (OM) provient de Toronto Research Chemicals (TRC). Le méthanol (MeOH), l'eau, le 2-propanol (IPA), l'éthanol (EtOH) et l'acétonitrile (ACN) proviennent de Fisher Chemical. La réserpine provient de USP. Tous les solvants sont de grade LC-MS et les étalons sont de grade tertiaire ou plus.

2.1.3 Paramètres chromatographiques et MS

La séparation chromatographique est faite sur une colonne Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD 2,1x50mm 1,80Micron avec une colonne de garde Agilent UHPLC Guard 3PK Zorbax Eclipse Plus C18 2,1x5mm 1,8 µm. La vitesse d'élution est de 0,4 mL/min, la longueur d'onde est de 210 nm, le volume d'injection est de 10 µL et la température est de 45 °C. La phase mobile A est de l'eau avec 5 mM de buffer et la phase mobile B est de l'ACN à 95% avec 5 mM de buffer. Le buffer est de l'ammonium acétate à pH 8,0. Le gradient est représenté dans le tableau 3.

Tableau 3 - Gradient de la phase mobile aqueuse (A) et organique (B) durant l'élution chromatographique

Temps (min)	%A	%B
0.0	90	10
1.0	90	10
5.0	1	99
25.0	1	99
25.1	90	10
30.0	90	10

Les conditions du MS sont les mêmes pour le mode positif et négatif. La source est à 350 °C, le gaz de séchage est à 12 L/min, le nébuliseur est à 35 psi, les acquisitions sont faites de 50 à 1500 m/z. Le voltage du VCap est de 4000 V, le fragmenteur est de 150 V, le Skimer est de 65 V, l'Oct. Est de 750 V et l'énergie de collision est à 0 V. La vitesse d'acquisition est de 1 spectre/sec.

2.1.4 Préparation des solutions

Des solutions stock individuelles à 1000 µg/mL de chaque étalon ont été préparées dans de l'isopropanol (IPA). Une solution finale à 25 mM pour chaque étalon est ensuite préparée dans l'ACN 90% et est utilisée tout au long de l'optimisation de méthode. La solution de rinçage de l'aiguille UHPLC est constituée de part égale de MeOH, ACN, IPA et eau. La solution de rinçage du joint de piston est constituée de MeOH 10%. La solution tampon stock est faite de 100 mM d'ammonium acétate dans de l'eau ajustée à pH 8,0 avec une solution 50% d'hydroxyde d'ammonium.

Un sirop pour la toux générique à base de dextrométhorphane est préparé pour la deuxième partie du projet, soit l'étude cinétique des lessivables. Ce sirop est utilisé dans la validation de méthode pour vérifier la précision et la répétabilité de la méthode. Seuls les excipients principaux du sirop générique sont utilisés dans la formulation (tableau 4).

Tableau 4 - Quantité d'ingrédients pour une solution complétée à 1L avec de l'eau

Ingrédient	Quantité
Sucrose	500g
Solution de sorbitol 70%	65g
Éthanol	50g
Acide citrique	0.2g
Benzoate de sodium	0.3g
Dextrométhorphane	1.5g

2.2 Optimisation de méthode

La majorité des figures représentée dans cette partie sont un pourcentage du signal obtenu (Figure 9,B). La raison est que l'intensité varie beaucoup entre chaque étalon (plusieurs ordres de grandeur). Dans le but de pouvoir afficher les données de chaque étalon sur la même figure, un calcul du pourcentage de la somme des signaux est établi (EQ.5). De cette façon, le rapport d'intensité entre les deux mesures d'un étalon est conservé (Figure 9,A).

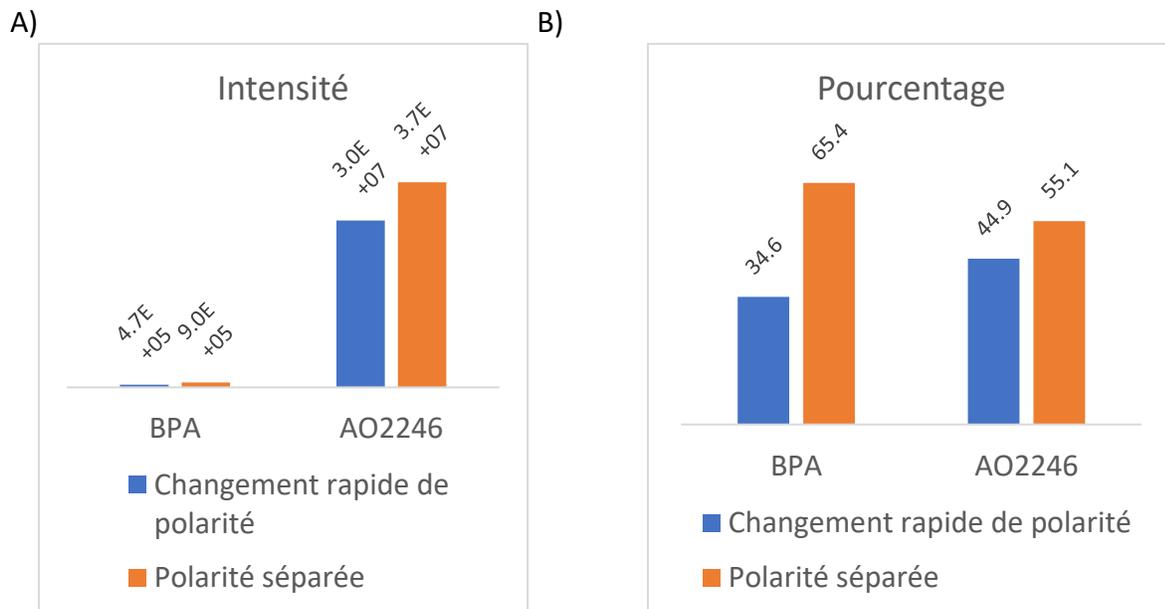


Figure 9 - Comparaison entre l'intensité des signaux et le pourcentage de ces intensités pour le BPA et l'AO2246 tiré des données en 2.2.6

$$\text{EQ. 5} \quad \text{Pourcentage } A = \frac{\text{Intensité } A}{\text{Intensité } A+B} * 100$$

2.2.1 Choix des étalons

Il y a plusieurs avantages pour lesquels un groupe d'étalons est préférable à un seul étalon. D'abord, plus de choix sont possibles lors de l'estimation des concentrations des impuretés et si on connaît en plus le RRF de ces étalons avec certaines impuretés, l'estimation sera beaucoup plus précise. Ensuite, en chromatographie, les molécules se déplacent plus ou moins rapidement sur un médium dépendamment de leur caractéristique structurale. Une colonne à phase inverse en LC retient les composés non polaires durant l'élution dépendamment du solvant d'élution. Le degré auquel une molécule est polaire ou non-polaire est décrit par son coefficient de partage entre l'octanol et l'eau (LogP). Cela représente à quel point une molécule préfère être dans un milieu aqueux (polaire) ou un milieu organique (apolaire). En utilisant un groupe d'étalons qui couvre une gamme distincte de LogP, on peut s'assurer que la majorité des molécules, autant les très polaires que très non-polaire, sortent bien de la colonne et seront détectées. Pour finir, cela permet de faire des tests d'adéquation de système (*Système suitability test (SST)*) et donc de vérifier si le système et la méthode donnent un signal constant durant l'analyse ainsi que de jour en jour. Un seul étalon est amplement suffisant pour cela, mais un groupe d'étalon peut fournir un peu plus d'information lors d'un diagnostic de problème.

Les étalons sélectionnés pour la méthode sont répertoriés dans le tableau 5 et les structures sont montrées en annexe A.5. Tous ces composés sont souvent présents dans les plastiques soit directement pour ajouter ou modifier une caractéristique du plastique ou indirectement en contaminant comme des sous-produits de la synthèse ou de la dégradation du polymère (Legrand *et al.*, 2018). Les additifs sont ajoutés pour agir en tant qu'antioxydant, plastifiant ou ignifuge pour respectivement conserver l'intégrité du CCS, augmenter sa flexibilité ou sa résistance (Farhi *et al.*, 2006; Wiesinger *et al.*, 2021). Les irganox, l'irgafos, l'hostanox 03, l'antioxydant 2246 et le BHT font tous partie du groupe des antioxydants qui ralentissent la dégradation des polymères (AccuStandard, 2013). Le bisphénol A est utilisé comme monomère dans la synthèse de plastique de polycarbonate et des résines d'époxy. Sa toxicité a longuement été étudiée et plusieurs pays ont réglementé son utilisation donc le Canada en 1999 sous la loi Canadienne sur la protection de l'environnement ("Le Bisphénol A (BPA) dans la population canadienne," 2021). L'oléamide et l'érucamide sont des agents anti-adhérents tandis que les acides gras sont souvent utilisés comme ester d'acide gras avec des triglycérols comme plastifiant (Dorival-Garcia *et al.*, 2018). La réserpine est la seule exception puisqu'il ne s'agit pas d'un E&L commun. Ce composé est utilisé dans la calibration de l'appareil UHPLC-QTOF en mode d'ionisation positif (*Agilent*).

Tableau 5 - Liste détaillée des étalons

Molécule	Formule	Masse exacte (Da)	Masse molaire (g/mol)	LogP (ChemSpider ; PubChem)	Rôle
Acide palmitique (PA)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.240230	256.4	7.6	Plastifiant
Acide myristique (MA)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.208930	228.4	6.4	Plastifiant
Acide oléique (OA)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.255880	282.5	8.2	Plastifiant
Acide stéarique (SA)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.271530	284.5	8.7	Agent de réticulation, Plastifiant
Irganox 245 (IRG245)	C ₃₄ H ₅₀ O ₈	586.350570	586.8	4.5	Antioxydant
Irganox 1330 (IRG1330)	C ₅₄ H ₇₈ O ₃	774.595095	775.2	15.0	Antioxydant
Irganox 1076 (IRG1076)	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	530.469895	530.9	13.3	Antioxydant
Irganox 3114 (IRG3114)	C ₄₈ H ₆₉ N ₃ O ₆	783.518637	784.1	9.5	Antioxydant
Irganox 1010 (IRG1010)	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂	1176.784080	1177.6	15.3	Antioxydant
Érucamide (EM)	C ₂₂ H ₄₃ NO	337.334464	337.6	9.7	Agent anti-adhérent
Hydroxytoluène butylé (BHT)	C ₁₅ H ₂₄ O	220.182715	220.4	4.5	Antioxydant
Irgafos 168 (IRG168)	C ₄₂ H ₆₃ O ₃ P	646.451483	646.9	15.5	Antioxydant
Oléamide (OM)	C ₁₈ H ₃₅ NO	281.271864	281.5	7.5	Agent anti-adhérent
Antioxydant 2246 (AO2246)	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	340.240230	340.5	5.4	Antioxydant
Hostanox 03 (H03)	C ₅₀ H ₆₆ O ₈	794.475770	795.1	11.6	Antioxydant
Bisphénol A (BPA)	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228.115030	228.3	3.1	Monomère
Résérpine (RES)	C ₃₃ H ₄₀ N ₂ O ₉	608.273383	608.7	2.7	Autre

L'ensemble de ces étalons ne sera pas conservé pour la méthode UHPLC-QTOF finale. Plusieurs de ces étalons se ressemblent beaucoup en termes de structure (Annexe B), temps de rétention (RT) et polarité. Pour alléger la méthode finale, un plus petit groupe d'étalons sera sélectionné en fonction de l'intensité des pics, l'allure des pics, le RT et le mode d'ionisation.

2.2.2 Phase mobiles

Les phases mobiles ont un impact sur l'élution des molécules à travers la colonne chromatographique. Normalement, avec une colonne C18 à phase inverse, on utilise une combinaison de phase mobile aqueuse et de phase mobile organique soit de méthanol ou d'acétonitrile (ACN). Le choix entre méthanol ou ACN dépend de la réponse obtenue par les composés à l'étude. De façon générale, l'ACN est la meilleure option, mais le méthanol peut s'avérer une meilleure option pour éliminer le « tailing » des pics ou réduire le RT des composés (Shimadzu, 2023).

L'ajout d'un tampon dans les phases mobiles aide à l'ionisation des composés pour la détection en MS. Certaines recommandations doivent être suivies autant pour le maintien du système et pour l'efficacité de la méthode. Le tampon doit être volatil pour le MS et ne doit pas précipiter avec l'élution des phases mobiles. Il est préférable que son pH soit à $\pm 1,5$ du pKa de l'analyte et la concentration recommandée pour conserver la longévité de la colonne chromatographique est d'environ 10 mM (Kafeenah *et al.*, 2019; Mannur *et al.*, 2011). L'intensité de l'aire des pics de chaque analyte a été évaluée pour des phases mobiles à 6 pH différents pour les modes d'ionisation positif et négatif. Pour les pH 2.5, 3.5 et 6.0 un tampon à 5 mM d'ammonium formate a été utilisé et pour les pH 7.0, 8.0 et 9.0 un tampon à 5 mM d'ammonium acétate a été utilisé. Trois ionisations sont étudiées soit la perte d'un proton (-H, négatif), le gain d'un proton (+H, positif) ou le gain d'un ammonium (+NH₄, positif). Le mode d'ionisation des étalons est déterminé en comparant leur aire à un pH donné (Figure 10) et est répertorié dans le tableau 6 selon le mode primaire ou alternatif. Le mode ayant la plus grande intensité est le primaire et le second plus intense est l'alternatif.

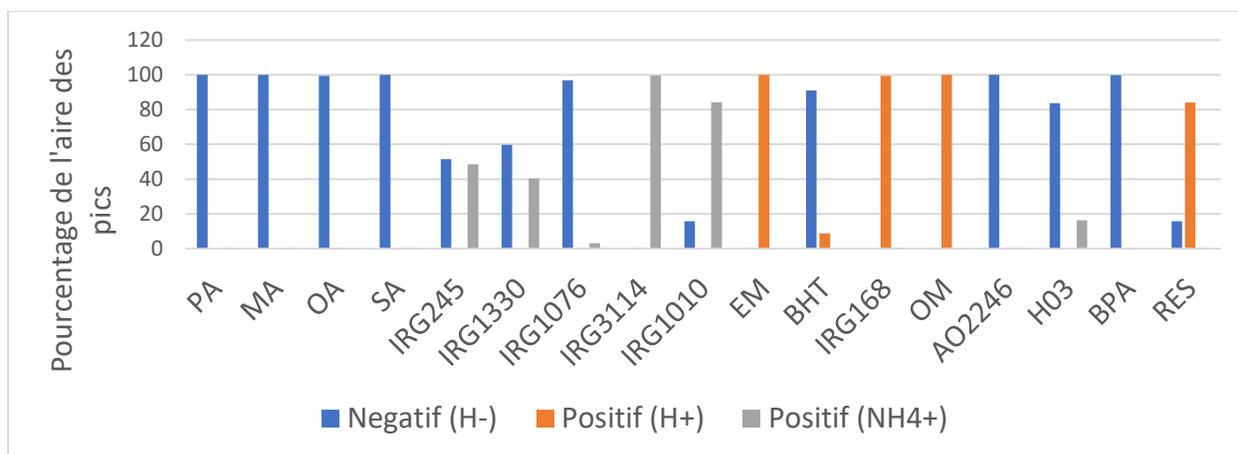


Figure 10 - Pourcentage de l'aire des pics de chaque étalon en fonction de leur ionisation en mode positif et négatif à pH 8.0

Tableau 6 - Mode d'ionisation sélectionné pour chaque étalon

Étalon	Ionisation primaire	Ionisation alternative
PA	-H	
MA	-H	
OA	-H	
SA	-H	
IRG245	-H	+NH ₄
IRG1330	-H	+NH ₄
IRG1076	-H	+NH ₄
IRG3114	+NH ₄	
IRG1010	+NH ₄	-H
EM	+H	
BHT	-H	+H
IRG168	+H	
OM	+H	
AO2246	-H	
H03	-H	+NH ₄
BPA	-H	
RES	+H	-H

Pour les pH acides, certains des étalons ne sont pas détectés tandis que pour les pH alcalins, tous les étalons ont au moins un signal dans un mode d'ionisation. Dans le but de réduire le temps d'analyse de la méthode, il est préférable d'utiliser une seule combinaison de phase mobile à un pH fixe. La figure 11 montre un comparatif des intensités de chaque étalon aux pH alcalins. La différence entre l'intensité des pics n'est pas assez flagrante pour qu'une décision claire soit faite

mis à part qu'en général, le pH 7.0 et 8.0 sont la plupart du temps supérieur au pH 9.0. Puisque les pKa de l'ammonium acétate sont de 4.75 et 9.25, un tampon à pH 8.0 est privilégié par rapport à 7.0 (Konermann, 2017).

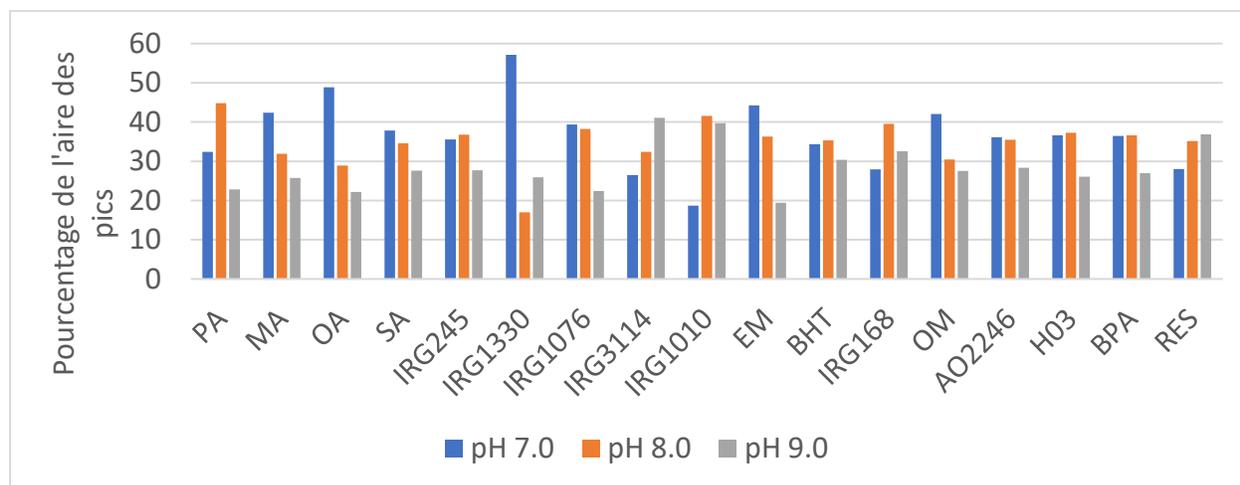


Figure 11 - Pourcentage de l'aire des pics de chaque étalon en fonction du pH des phases mobiles

2.2.3 Autres paramètres

Solvant de l'étalon

Un groupe d'étalons E&L ayant une bonne variété de structure, polarité et poids moléculaire donnera potentiellement plusieurs options de RRFs et facilitera l'estimation des concentrations d'E&Ls. Cependant, la solubilité de tous ces composés n'est pas la même (*PubChem*). Avoir une seule solution d'étalon est plus pratique dans le cadre d'analyse qu'on doit refaire quotidiennement et en général, cela simplifie la méthode. L'IPA comme solvant pour la solution stock d'étalon solubilise bien tous les composés, mais la solution étalon finale et S/N devraient ressembler aux conditions d'élution des phases mobiles. L'allure des pics est influencée si la composition du solvant des solutions à injecter est différente en polarité et force d'élution par rapport aux phases mobiles (Harris ; Shimadzu, 2023). À basse concentration, on ne peut pas voir à l'œil si un composé ne solubilise pas totalement dans un solvant. Puisque les phases mobiles sont une combinaison d'ACN et d'eau, une analyse de l'intensité de l'aire des pics en fonction du pourcentage d'ACN dans l'eau du solvant d'étalon final a été faite (figure 12). Il n'y a pas de flagrant choix à prendre vu la relative stabilité du signal selon la composition du solvant. Par soucis de ressembler le plus possible proportion d'élution des phases mobiles et parce qu'il y a une petite tendance observée, un solvant à 60% ACN est conservé.

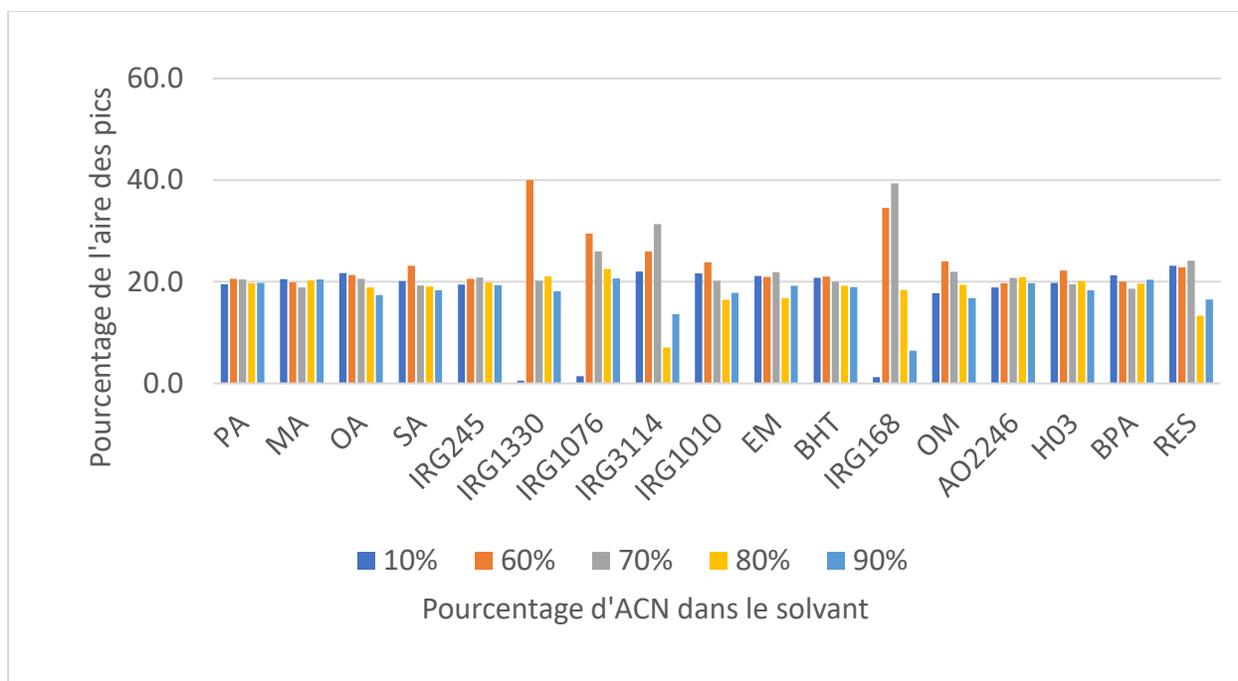


Figure 12 - Pourcentage de l'aire des pics de chaque étalon en fonction du pourcentage d'ACN utilisé dans le solvant de la solution étalon finale

Volume d'injection

De façon générale, une plus grande quantité d'analyte en LC-MS donne un plus grand signal. Cependant, il peut arriver qu'une trop grande concentration d'analyte provoque de la suppression ionique par compétition de charge, une déformation des pics en MS ou encore de l'effet de matrice (Marta *et al.*, 2016). Cela peut être observé de façon détaillée en augmentant la concentration en solution, mais on peut aussi simplement voir ces effets à plus petite échelle en changeant le volume d'injection de l'échantillon. Le signal des étalons dépendant du volume d'injection est représenté dans la figure 13. La tendance générale est que l'intensité augmente avec le volume d'injection, ce qui est le plus attendu. L'allure des pics reste la même en variant le volume d'injection comme le montre l'exemple du chromatogramme extrait de l'ion (EIC) du BHT montré en figure 14. Mise à part la différence en hauteur du pic d'intensité, l'allure du pic, soit sa largeur et son RT, est la même. En revanche, on peut voir que pour IRG3114, IRG1010 et IRG168, la tendance n'est pas suivie. En effet, le signal le moins élevé est celui pour un volume d'injection de 10 μ L tandis que le signal le plus élevé est observé à 7,5 μ L. Les trois analytes maintiennent aussi la même allure RT en variant le volume d'injection comme dans l'exemple de l'IRG3114 en figure 15. La perte de signal pourrait être attribuée à de la suppression ionique. Le volume d'injection à 10 μ L est conservé puisqu'il donne en moyenne un signal plus élevé.

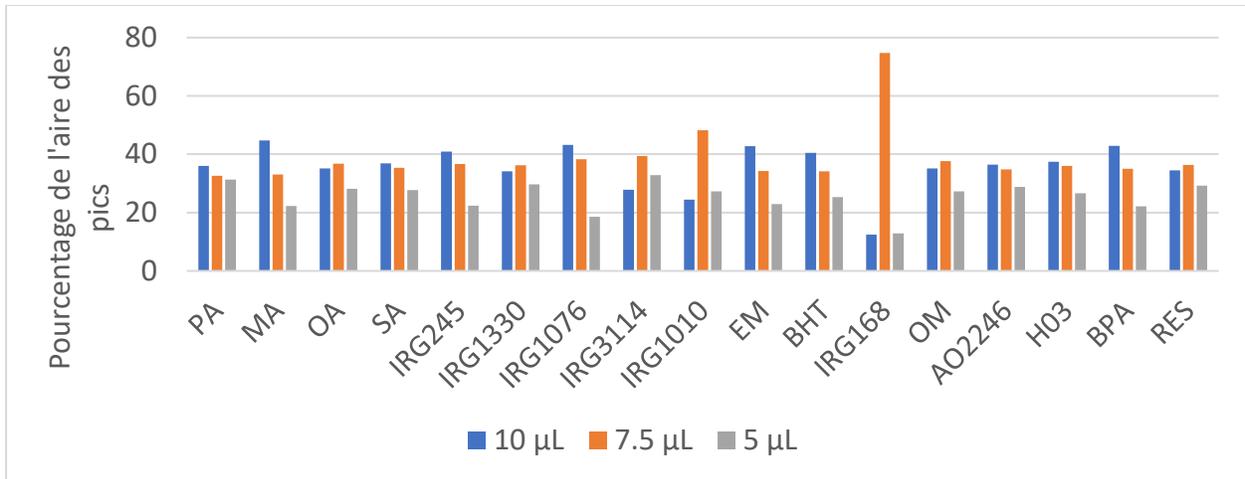


Figure 13 - Pourcentage de l'aire des pics de chaque étalon en fonction du volume d'injection

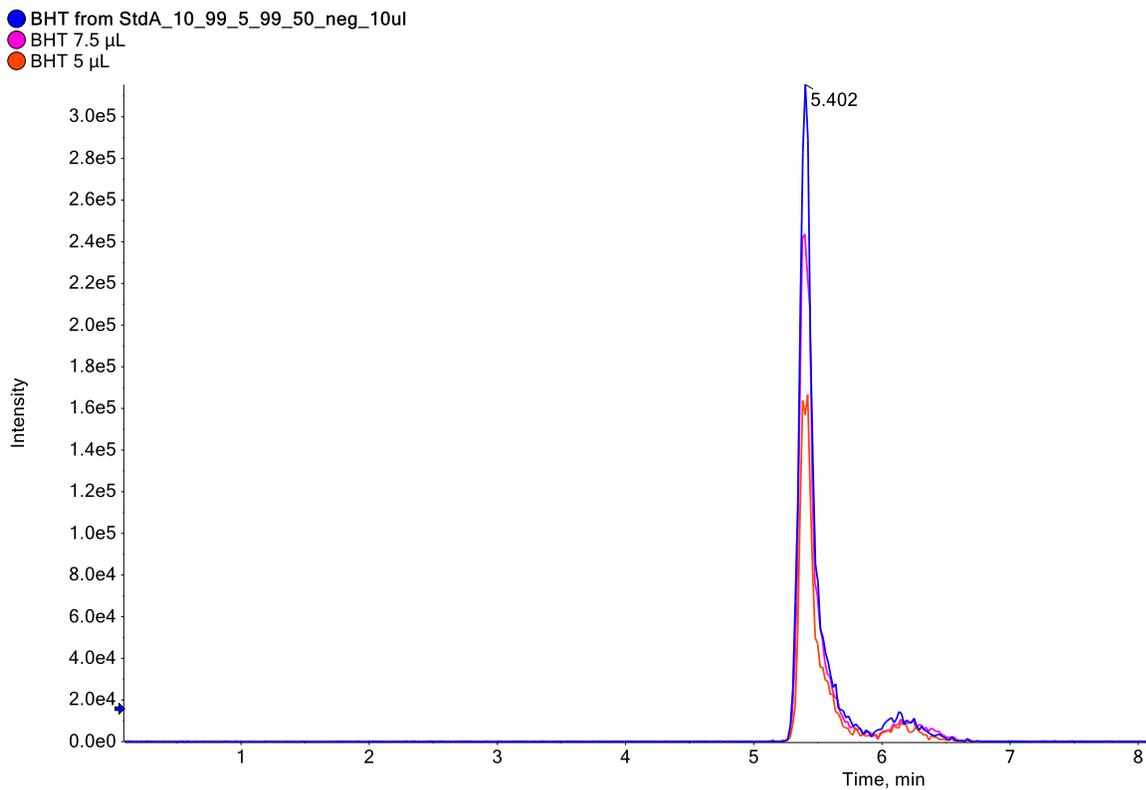


Figure 14 - Aire des pics de l'étalon BHT en fonction du volume d'injection

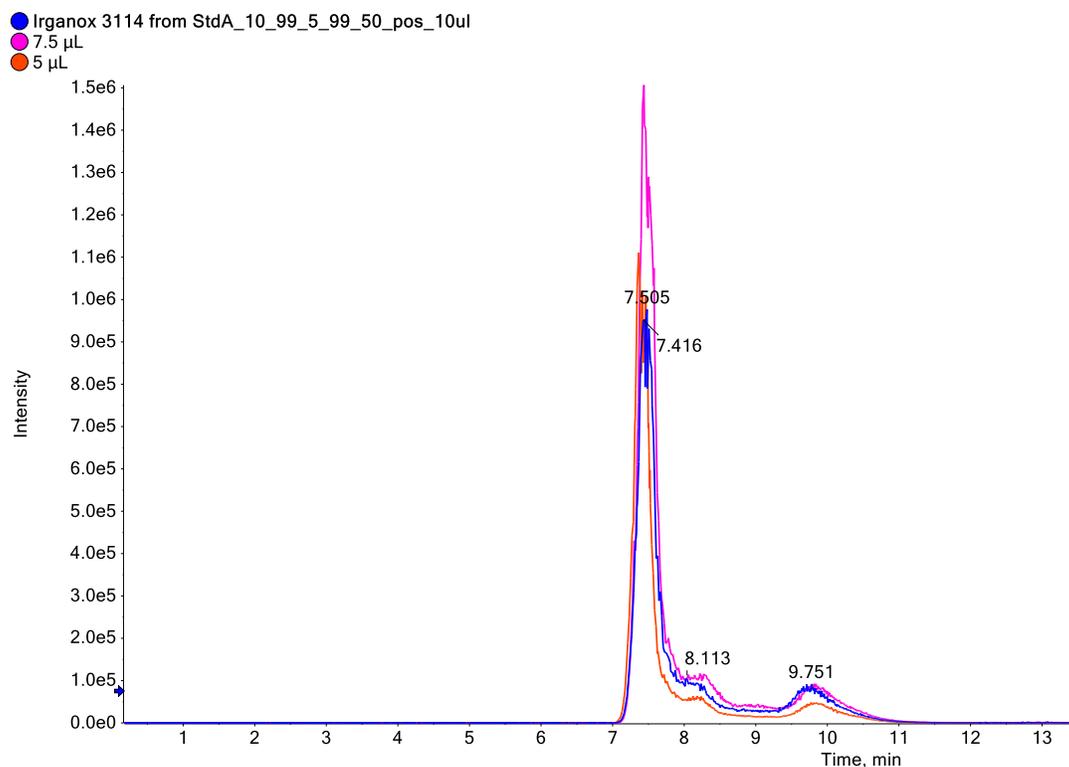


Figure 15 - Aire des pics de l'étalon IRG3114 en fonction du volume d'injection

Gradient d'élution

La séparation des composés dans la colonne chromatographique est influencée par la force d'élution de la phase mobile. Avec une colonne chromatographique à phase inverse, les composés non-polaire sont retenus par la phase stationnaire, la force d'élution est donc augmentée par une phase mobile non-polaire comme le MeOH ou l'ACN. En phase inverse, une combinaison de deux phases mobiles dont une organique et une aqueuse est utilisée. L'élution débute avec le phase aqueuse et transitionne vers la phase organique. Le temps requis pour cette transition dépend de la séparation désirée pour les analytes. Une courte transition peut être valable pour analyser des composés avec des logP très différent. Il reste qu'en HPLC-MS, on peut détecter deux composés qui sortent de la colonne au même moment puisque le MS détecte selon la masse exacte des composés. Il peut cependant y avoir une baisse de performance lorsque plusieurs analytes ayant une affinité de protonation à des concentrations élevées se retrouvent dans la source d'ionisation ESI au même moment, on appelle ce phénomène la compétition de charge. (Tang *et al.*, 2004)

Pour évaluer cet aspect de la méthode chromatographique, les RTs et l'intensité des pics des étalons sont comparés en fonction des conditions initiales des phases mobiles. Quatre conditions

initiales ont été testées selon le rapport entre la phase mobile aqueuse (A) et organique (B). Une condition initiale de 90% aqueux et 10% organique est représentée comme étant 90 : 10 (Figure 16). Dans tous les cas, le reste du gradient d'élution est le même. Certaines variations dans l'intensité des étalons sont notables. Cependant, étant donné la variété de polarité des étalons et leur RTs, il est préférable de garder un haut pourcentage d'éluant faible (aqueux) pour garder une bonne résolution des analytes à bas RT (Tableau 7)

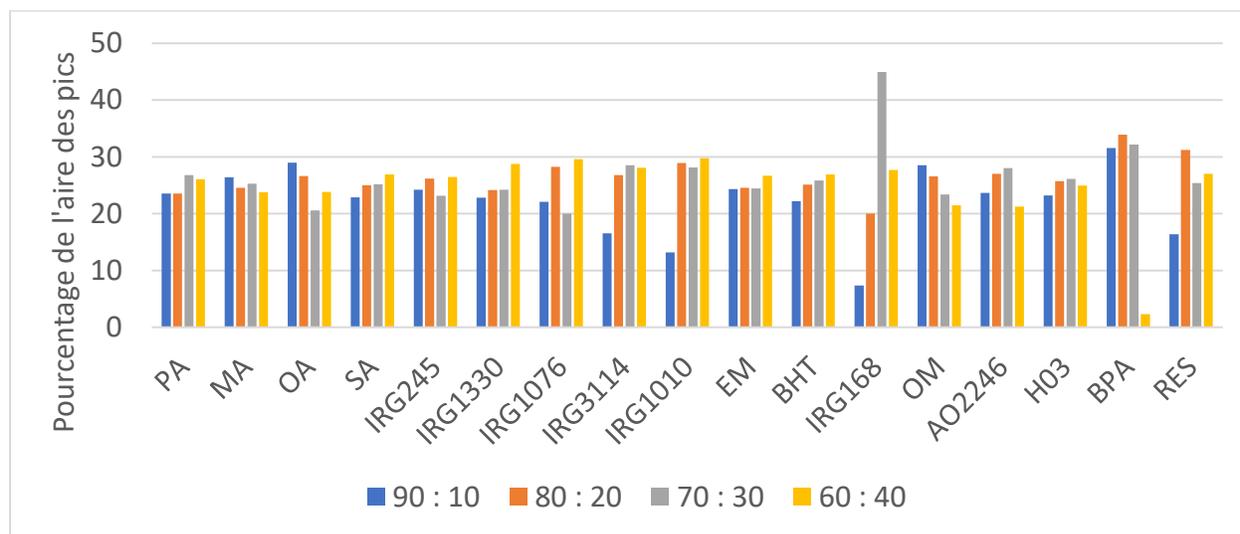


Figure 16 - Pourcentage d'intensité des étalons en fonction de la condition initiale des phases mobiles

Tableau 7 - Temps de rétention (RT) des étalons élués par les phases mobiles ayant la condition initiale 90 : 10

Étalon	RT (min)	Étalon	RT (min)	Étalon	RT (min)
BPA	3,6	H03	5,5	IRG3114	7,5
RES	4,5	AO2246	5,6	IRG1010	12,3
MA	4,6	OM	5,6	IRG1330	12,6
IRG245	5,2	OA	5,7	IRG1076	18,5
BHT	5,4	SA	6,3	IRG168	30,8
PA	5,5	EM	6,9		

2.2.4 Changement rapide de polarité

Certaines analyses ne nécessitent pas de faire une lecture dans le mode positif et négatif. Parfois, les composés recherchés sont connus et un seul mode d'ionisation est nécessaire pour effectuer

l'analyse. Dans le cas d'une analyse de dépistage comme les études E&Ls, les composés recherchés sont principalement inconnus. Les deux modes de lecture doivent être utilisés pour s'assurer d'une étude complète et intègre. Les MS ne peuvent pas lire les deux modes d'ionisations simultanément, il faut donc lire chaque séquence d'analyse en double, une fois pour le mode positif et une fois pour le mode négatif. Un mode de lecture à changement rapide de polarité (*Fast switching polarity, FSP*) est disponible sur plusieurs appareils MS et est souvent recommandé par le fabricant. En plus du temps sauvé en coupant de moitié l'analyse, utiliser le mode FSP permet d'économiser sur les réactifs et les solvants, diminuer l'impact environnementale et amoindrir le potentiel de dégradation des échantillons dans le temps. Il y a cependant un risque que le mode soit moins efficace qu'une lecture en mode d'ionisation séparé. Dans un article par Carlsson et al., la performance du mode FSP a été étudiée (Carlsson *et al.*, 2022). Bien que le mode donne des résultats acceptables, la sensibilité est réduite et les auteurs suggèrent que le mode soit évalué pour chaque situation.

La figure 17 montre un comparatif de l'aire obtenue pour chaque étalon selon le mode de lecture utilisé. Il est clair qu'en mode FSP, une baisse de signal est observée et on remarque aussi que l'IRG168 n'est plus détecté. Cela va de soit considérant qu'on s'attendait à une baisse des signaux en utilisant le mode FSP. Mise à part l'IRG168 où le signal est perdu, la baisse de signal en passant au mode FSP varie de 3 à 48%. Dépendamment du SCT et de la sensibilité requise pour l'analyse E&L, cette perte de signal pourrait être viable. Quelques paramètres MS pourraient aussi être optimisés pour améliorer les signaux en mode FSP. Dans le cadre de ce projet, puisqu'on veut le maximum d'impureté possible pour la deuxième partie du projet, soit l'étude cinétique d'extraction, le mode de polarité séparée est utilisé.

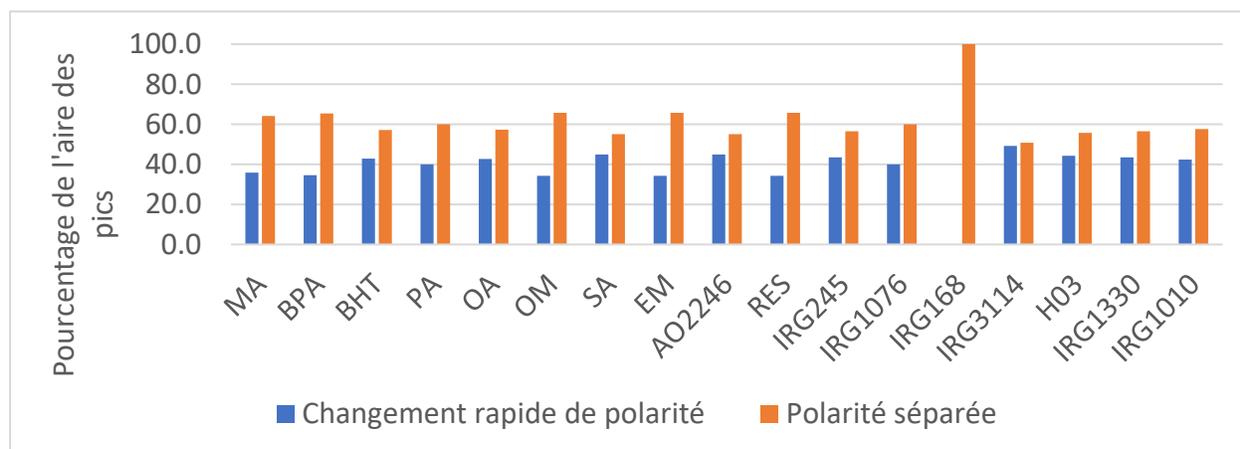


Figure 17 - Pourcentage de l'aire des pics pour le mode FSP et le mode de polarité séparée

2.3 Validation de méthode

Les méthodes utilisées pour évaluer la conformité des produits pharmaceutiques dans le cadre d'analyse de contrôle qualité doivent répondre à certains standards de précision et fiabilité. Lorsque ces méthodes font déjà partie d'une monographie ou d'un chapitre général de USP, on peut simplement vérifier qu'elles soient adéquates sous les présentes conditions d'utilisation (<1225>, 2022). Dans le cas des études E&Ls, aucune définition précise sur la validation ou le développement de méthode n'a été fait. ICH Q3E devrait apporter des indications supplémentaires sur les démarches à suivre, mais provisoirement, aucune réglementation quant à la validation de méthode E&L n'existe. On peut tout de même valider la méthode dans le but de prouver sa précision et sa fiabilité (FDA, 1999). Les différents critères de validation sont établis dans la section 2.3.2. Dans le but d'évaluer ces critères, la séquence de lecture du tableau 8 sera utilisée. En premier lieu, une courbe de calibration est injectée suivi par du nettoyage (blanc) et ensuite par les échantillons dopés. Plusieurs réplicas sont lus pour certaines solutions dans le but de vérifier des critères de validation. Puisque l'étalon 3 est celui qui sera utilisé dans la méthode validée, on le nomme l'étalon de travail (WS). La concentration du reste des étalons est établie à partir de l'étalon WS et est répertoriée dans le tableau 9.

Tableau 8 - Séquence de lecture pour la validation de méthode

Solution	Nombre d'injection
Blanc	3
Étalon 1, LOQ, 10%	6
Étalon 2, 50%	1
Étalon 3, WS, 100%	6
Étalon 4, 150%	1
Étalon 5, 200%	1
Blanc	2
Échantillon non-dopé	1
Échantillon dopé 50% (3x)	1
Échantillon dopé 100% (6x)	1
Échantillon dopé 150% (3x)	1
Blanc	3
Nettoyage	

Tableau 9 - Concentration des étalons dans la courbe de calibration en $\mu\text{g/mL}$

Étalons	1, LOQ, 10%	2, 50%	3, WS, 100%	4, 150%	5, 200%
PA	0.06	0.3	0.6	0.9	1.2
MA	0.02	0.1	0.2	0.3	0.4
IRG245	0.02	0.1	0.2	0.3	0.4
IRG1330	0.2	1	2	3	4
IRG1076	0.2	1	2	3	4
AO2246	0.02	0.1	0.2	0.3	0.4
BPA	0.05	0.25	0.5	0.75	1
EM	0.04	0.2	0.4	0.6	0.8
IRG3114	0.02	0.1	0.2	0.3	0.4
IRG1010	0.04	0.2	0.4	0.6	0.8

2.3.1 Sélection finales des étalons

Étant donné la similarité entre certains des étalons utilisés durant l'optimisation de la méthode et dans le but d'alléger la méthode, certains des étalons seront exclus pour la validation de la méthode finale. Un des objectifs de cette méthode est de couvrir des molécules ayant une large variété de logP, autrement dit, des molécules qui peuvent avoir un RT très court ou très long. En plus du RT, l'objectif est de conserver au minimum deux étalons dans chaque mode d'ionisation. L'optique est encore une fois d'alléger la méthode pour la rendre rapide et pratique dans les analyses quotidiennes. La sélection des étalons est faite selon le temps de rétention, la similitude de structure, l'allure des pics, l'intensité et le domaine de linéarité. Un domaine de linéarité préliminaire a été fait durant l'optimisation de la méthode (Annexe A.1). Les 10 étalons conservés et leur mode d'ionisation primaire et alternatif sont montrés dans le tableau 10 et leur EIC en figure 18.

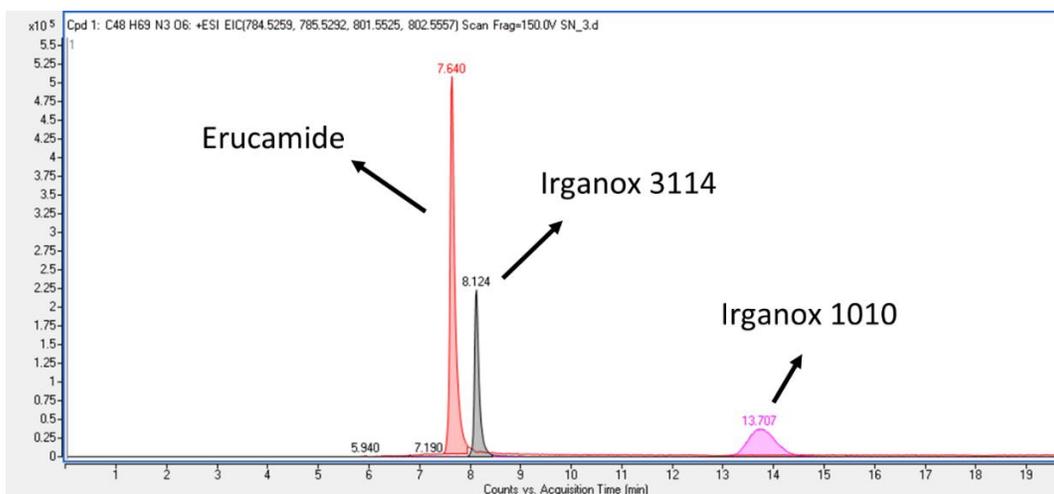
Les irganox sont très couramment utilisés comme additifs dans les CCS et ce sont aussi des molécules complexes que l'on ne retrouve pas aussi facilement dans d'autre type de contamination contrairement aux acides gras et aux amides d'acide gras (Chanotiya *et al.*, 2013; Cheng et Yu, 2020). Étant grandement utilisé comme additifs, ils sont souvent présent dans les études E&Ls et plusieurs recherches se sont déjà penchées sur le développement de méthode pour les détecter et les quantifier (Pouech *et al.*, 2014; Vera *et al.*, 2018) Ils couvrent un large étendu de RT soit 6 min pour l'IRG245 et 18 min pour l'IRG1076. Le seul du lot qui n'est pas conservé est l'IRG168. Malgré qu'il s'agit de l'étalon avec le plus haut RT (~ 30 min), son signal est souvent instable entre les lectures et cela est probablement dû à la largeur du pic relativement élevé. Pour ces raisons, la majorité des irganox est gardée pour la validation. Pour la même raison de signal instable, l'oléamide n'est pas conservé. Les 4 acides gras ont

approximativement le même domaine de linéarité et leurs signaux sont tous très stables donc seulement le PA et le MA sont conservés. Le BHT est aussi exclu puisque son domaine de linéarité couvre seulement de fortes concentrations (0.6 à 10 µg/mL) comparé aux autres étalons et cela n'est pas nécessairement souhaitable pour ce type d'analyse. La concentration des étalons devrait être le plus proche possible de la concentration du AET et la plupart du temps cette concentration est assez basse. Finalement, l'H03 est aussi retiré du groupe d'étalon simplement pour alléger la méthode et parce que déjà plusieurs étalons ont un RT semblable (6 à 7 min).

Tableau 10 - Étalons utilisés dans la méthode finale et leurs modes d'ionisation primaire et alternative

Étalon	Ionisation primaire	Ionisation alternative
PA	-H	
MA	-H	
IRG245	-H	+NH ₄
IRG1330	-H	+NH ₄
IRG1076	-H	+NH ₄
IRG3114	+NH ₄	
IRG1010	+NH ₄	-H
EM	+H	
AO2246	-H	
BPA	-H	

a)



b)

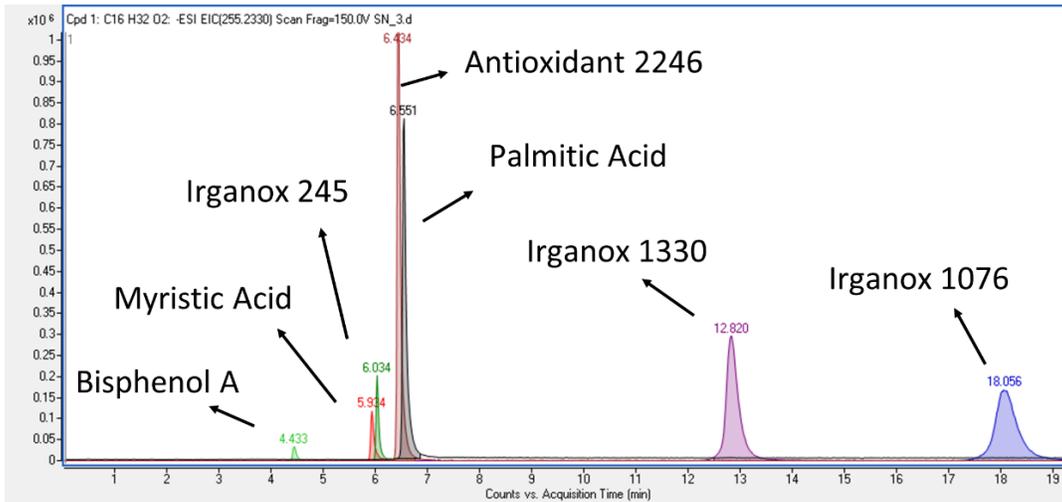


Figure 18 - EIC de chaque étalon en mode d'ionisation primaire a) positif et b) négatif

2.3.2 Recommandations ICH et USP

Les critères à suivre pour valider une méthode dépendent de l'objectif de la méthode. Un test d'identification, un test d'impureté et un essai d'un API ne sont pas soumis aux mêmes barèmes. Dans le cas d'une étude E&L, l'analyse est vu comme un test d'impureté. Puisque les impuretés ne sont pas connues, certains critères ne peuvent pas être suivis, mais les règles générales seront les mêmes pour cette validation. À partir des chapitres <621>, <1225> et <1226> de USP et des recommandations de la FDA et ICH, les paramètres de validation ont été répertoriés dans le tableau 11 (<621>, 2023; <1225>, 2022; <1226>, 2019; FDA, 2015; Q2(R1), 2005).

La majorité des critères est évaluée en termes de pourcentage d'écart-type relatif (%RSD). Ce terme est calculé par l'écart-type (SD) sur la moyenne de deux ou plusieurs données (EQ.6). Le signal sur bruit est calculé par le logiciel de traitement de données. Le pourcentage de recouvrement (%REC) est calculé selon les équations EQ.7 ou EQ.8 pour les échantillons dopés. Toutes les valeurs sont calculées à partir de l'aire des pics des étalons.

$$\text{EQ.6} \quad \%RSD = \left(\frac{SD}{\text{moyenne}} \right) * 100$$

$$\text{EQ.7} \quad \%REC = \frac{\text{Nouvelle donnée}}{\text{Donnée originale}} * 100$$

$$\text{EQ.8} \quad \%REC = \frac{\text{Échantillon dopé } X - \text{Échantillon non dopé}}{\text{Étalon } X} * 100$$

X = niveau d'étalon utilisé

Tableau 11 - Paramètres et critères de la validation de méthode

Paramètres	Solution	Nombre de préparation	Nombre d'injection	Critères d'acceptation
Adéquation du système (SST)	Étalon 3	1	6	%RSD des 6 injections $\leq 20\%$
Spécificité	Blanc	1	1	Interférence dans le blanc $< LOQ$
	Étalon 1	1	1	
Limite de quantification (LOQ)	Étalon 1	1	6	S/N ≥ 10 %RSD des 6 injections $\leq 20\%$
Répétabilité / Précision	Échantillon non-dopé	1	1	Répétabilité : %RSD des 6 injections d'échantillon dopé par étalon 3 $\leq 20\%$
	Échantillon dopé par étalon 3	6	1	
	Échantillon dopé par étalon 2 et 4	3	1	Précision : %Rec des échantillons dopé par étalon 2, 3 et 4 est entre 70 et 130%
Stabilité	Étalon 3	1	1	%Rec de l'étalon 3 après X temps est entre 90 et 110%
Linéarité	Étalon 1 à 5	1	1	Coefficient de corrélation (r^2) ≥ 0.96

2.3.3 Linéarité, SST, Spécificité et LOQ

LOQ et spécificité

La LOQ est une caractéristique des tests limites d'impuretés qui indique la concentration la plus basse que la méthode permet de quantifier avec exactitude et précision. Le premier critère à vérifier est une comparaison entre le signal du blanc et celui de la solution étalon S/N (figure 19). Ainsi, on s'assure que le signal ne provient pas d'une contamination, mais bien des solutions d'étalons. Cette valeur peut être calculé de plusieurs façons pour la méthode instrumentale et est normalement défini comme étant un S/N de 10. Pour cette validation, le S/N est obtenu à partir du logiciel de traitement de donnée MassHunter Qualitative Analysis. Le S/N calculé par MassHunter est le rapport de la hauteur du pic de l'analyte sur la moyenne de hauteur du bruit

sur 0.5 min d'élution un peu avant le pic d'intérêt. La figure 20 montre un exemple d'un S/N de 9.5 pour l'étalon BPA dans la solution étalon 1.

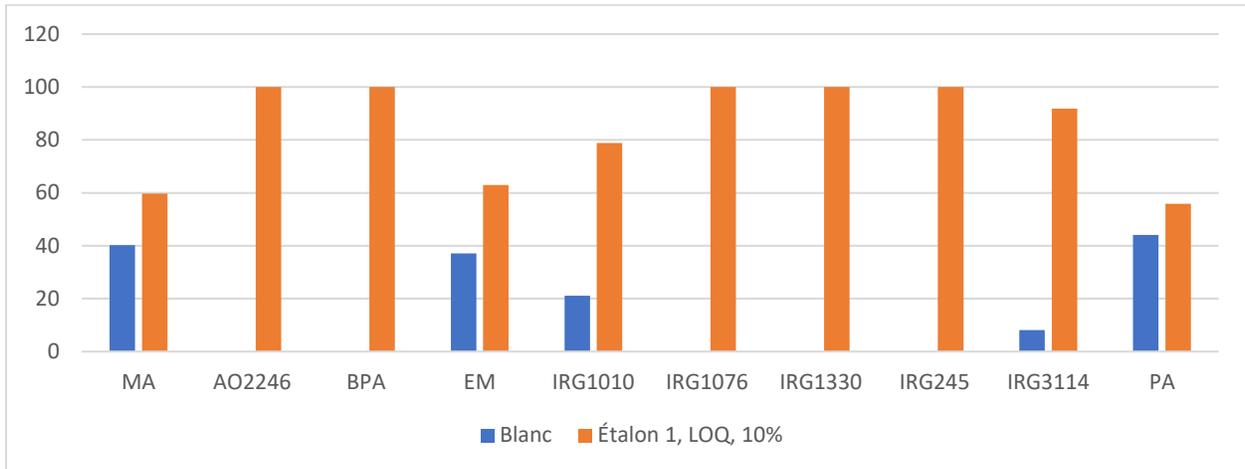


Figure 19 - Pourcentage de l'aire des pics de chaque étalon dans le blanc et dans l'étalon 1 (LOQ, 10%)

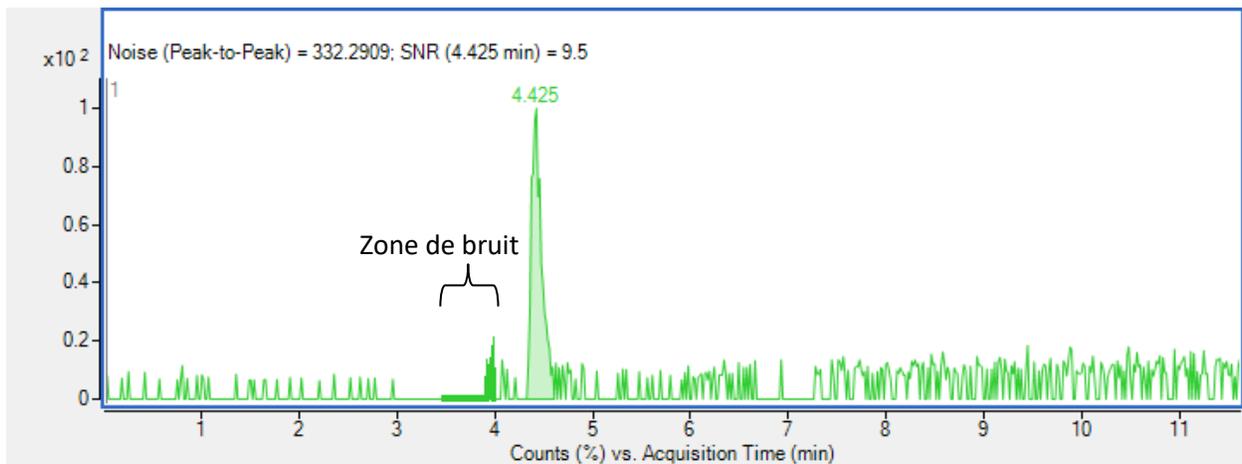


Figure 20 - EIC de 0 à 11 minutes du BPA de la solution étalon 1 et calcul du ratio S/N

Le PA, MA et EM ont un fort signal dans le blanc. Il est important de noter que plusieurs blancs sont injectés avant de passer aux étalons et aux échantillons. Avant de poursuivre la séquence, on s'assure que si l'intensité d'une contamination est stable entre chaque lecture, dans le cas contraire, il s'agirait simplement qu'un nettoyage supplémentaire de l'appareil soit nécessaire. Lorsque l'intensité de la contamination est stable, cela veut généralement dire que la source de contamination provient d'un autre endroit que de l'appareil soit des solvants, de la verrerie ou encore du matériel jetable en plastique du laboratoire. Il n'est pas inhabituel de voir ce genre de contamination (Chanotiya *et al.*, 2013; Cheng et Yu, 2020; Keller *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 2009).

Bien que cela n'est pas idéal, l'utilisation de ces étalons est quand même valide tant que le signal ne dépasse pas celui de l'étalon à plus basse concentration. D'une certaine façon, conserver ces étalons permet aussi de surveiller si le processus complet de la méthode est fait sans trop de contamination.

Linéarité

La linéarité prouve que pour l'étendu des concentrations de l'analyte utilisée dans la validation, le signal est proportionnel à la concentration. La linéarité n'est pas nécessairement une droite linéaire, mais plutôt une représentation du niveau de corrélation entre la courbe obtenue et la courbe théorique, soit le coefficient de corrélation (R^2). Dans cette validation, tous les étalons ont une tendance linéaire et leur R^2 est au-dessus de la spécification (tableau 12). Les concentrations du domaine de linéarité sont les mêmes que la courbe de calibration dans le tableau 9. Le domaine de linéarité est propre à la validation et a été choisi en fonction des plus basses concentrations possible toujours dans le but de rester proche des potentielles valeurs de AET. Un domaine de linéarité plus large que celui validé a tout de même été déterminé en Annexe B.

Tableau 12 - %RSD du SST, du LOQ et R2 de chaque étalon

	%RSD SST	%RSD LOQ	R²
MA	1.5	2.9	1.000
AO2246	0.9	1.6	0.998
BPA	1.0	2.5	0.998
EM	1.3	2.7	0.998
IRG1010	2.1	1.6	0.999
IRG1076	1.5	2.1	0.999
IRG1330	1.2	3.0	1.000
IRG245	1.3	1.9	0.999
IRG3114	0.7	4.7	1.000
PA	1.5	1.5	1.000

2.3.4 Répétabilité et précision

Dû à certains excipients, le sirop est visqueux et une trop grande différence de viscosité entre l'échantillon et les phases mobiles peut avoir un effet néfaste sur l'allure des pics et le temps de rétention (Shalliker et Guiochon, 2009). Une matrice complexe peut aussi causer de l'interférence dans les signaux des analytes. Pour observer cette interférence et l'effet de la différence de viscosité entre l'échantillon et les phases mobiles, trois échantillons dopés sont préparés; un échantillon non dilué, un échantillon dilué 1 : 1 avec de l'ACN 60% et un échantillon dilué 1 : 2 avec de l'ACN 60%. Ces tests préliminaires sont présentés sous forme de pourcentage de recouvrement dans la figure 21. Il est clair avec cette figure que le signal est atténué dans le sirop non dilué et que plus la dilution est grande, plus le signal se rapproche de celui de l'étalon. Le problème est que dans une étude classique d'E&L, on ne peut pas trop diluer l'échantillon pour deux raisons principales. D'abord, il s'agit d'une étude de dépistage d'impureté, donc les analytes seront la plupart du temps en très petite quantité. Lorsqu'on détecte un analyte, on peut facilement corriger le signal selon la dilution qui a été faite. En contrepartie, il se peut qu'un analyte soit en trop basse concentration à la base et que la dilution fasse en sorte qu'on ne le détecte plus. Cela rejoint la deuxième majeure raison qu'une trop grande dilution n'est pas souhaitable. L'AET est souvent une concentration très basse et il se peut qu'on ne puisse tout simplement pas se permettre de diluer l'échantillon. Puisque pour cette étude l'échantillon est un sirop générique fait maison et que son AET est plus arbitraire, la dilution à 1 : 2 est employé. L'injection de l'échantillon salit beaucoup la source d'ionisation et y laisse des résidus qui, au bout d'une longue séquence, auront un effet sur le signal. C'est donc pour cette raison et le fait qu'il pourrait y avoir du blocage dans la colonne chromatographique que la dilution 1:2 est choisie pour la partie répétabilité et précision de la validation.

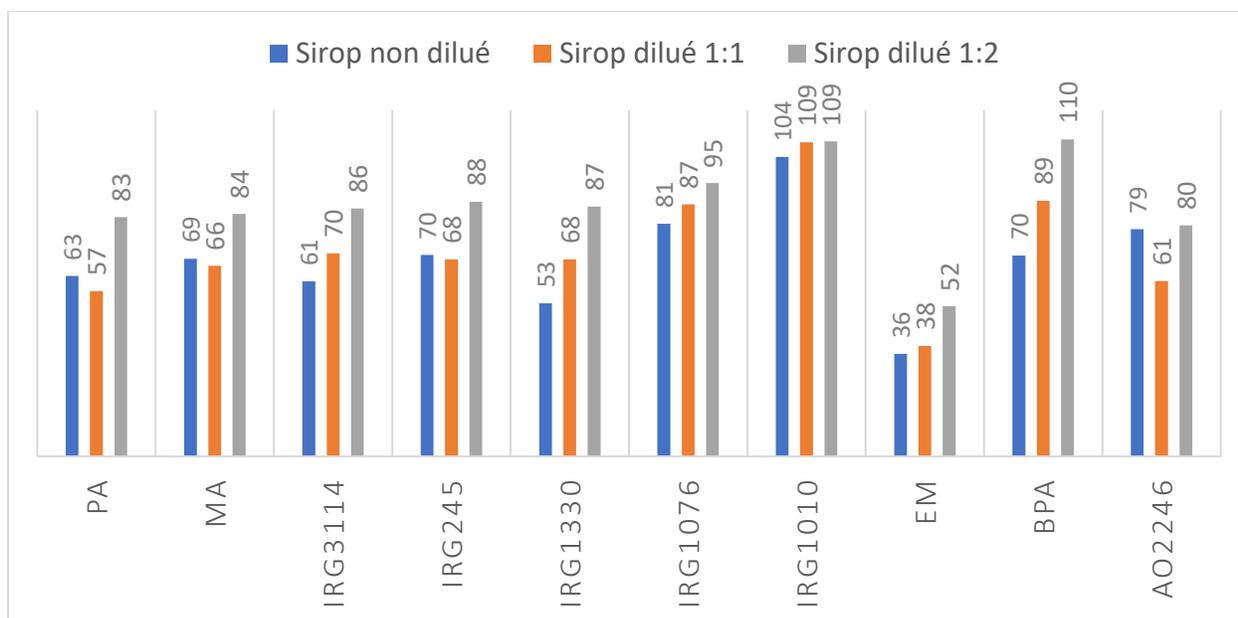


Figure 21 - Pourcentage de recouvrement de l'échantillon dopé à la concentration de l'étalon 3 selon trois dilutions ; non dilué, dilué à 1 : 1 et dilué à 1 : 2 avec de l'ACN 60%

Malheureusement, les résultats de %REC et de %RSD ne sont pas ceux attendus (voir annexe A.2, A.3 et A.4). Le recouvrement est bien en dessous de ce qui avait été obtenu dans les tests préliminaires et le signal n'est pas stable. Dans les tests préliminaires, l'échantillon non dilué était aussi dopé avec les étalons contrairement aux tests effectués pour la validation où les signaux sont corrigés par l'échantillon non dopé. L'objectif de la méthode est de pouvoir l'utiliser comme méthode générale d'analyse des E&Ls. Il n'est donc pas nécessaire de faire des tests de répétabilité et précision puisque les échantillons ne seront pratiquement jamais les mêmes. En conséquence, cette partie de la validation sera omise dans le cadre du projet.

2.3.5 Stabilité

Le test de stabilité n'est pas requis dans la validation décrite par USP (<1225>, 2022). Ce n'est pas un terme défini de façon précise, mais plutôt une variable qui peut être étudiée selon les besoins de la méthode. Cela donne principalement un indice de l'état d'une solution au travers du temps. La stabilité d'une solution est propre à tous les éléments présents lors de son étude; le solvant, la température, les analytes, le contenant utilisé, etc. Les paramètres pour déterminer la stabilité sont donc établis par l'analyste et les conditions d'entreposage doivent être les mêmes lors de son utilisation future.

La solution étalon 3 est conservé durant 42 jours à 4 °C dans une fiole en verre borosilicaté et un bouchon en polypropylène (PP) avec doublure en polytétrafluoroéthylène (PTFE). Au bout du 42 jours d'entreposage, une nouvelle solution étalon 3 est préparé. Les deux solutions sont lues sur

la même séquence est leur signal son comparé selon le %REC de la vieille solution sur la solution fraîche (tableau 13). La majorité des étalons respectent le barème de 90 à 110% établi comme critère d'acceptation. Trois des étalons ne respectent pas ce barème, soit l'IRG1330, l'IRG1076 et l'IRG1010. Des %REC trop bas comme l'IRG1330 et l'IRG1076 peuvent généralement être expliqués par une dégradation du composé ou une précipitation. Dans le cas d'une augmentation de signal comme l'IRG1010, cela est ordinairement attribué à une contamination. La doublure du bouchon en PTFE pourrait être responsable de cette contamination (Farajzadeh *et al.*, 2008). Malheureusement avec ces résultats, on doit conclure que la solution doit être fraîchement préparée à chaque analyse.

Tableau 13 - %REC de la solution étalon 3 fraîchement préparée versus la solution étalon 3 vieille de 42 jours conservée à 4 °C

	PA	MA	IRG3114	IRG245	IRG1330	IRG1076	IRG1010	BPA	EM	AO2246
%REC	101	103	96	108	85	44	3253	103	101	96

2.4 Méthode finale

La méthode a été évalué pour sa linéarité, sa spécificité, sa sensibilité, sa LOQ et sa stabilité selon les recommandations faites par USP, ICH et FDA. Les résultats ont démontré que la méthode est efficace, sensible et spécifique. La répétabilité et la précision n'ont pas été établis et cela n'a pas été jugé nécessaire dans le cadre de ce projet. Une sélection finale d'étalon a été faite considérant les résultats obtenus durant le développement de méthode et en fonction des besoins futurs de la méthode. Une réévaluation de cette validation devrait être faite dans l'optique où cette méthode sera utilisée sur un nouveau système HPLC-QTOF. Une modification des paramètres ou des produits utilisés devrait aussi entraîner une nouvelle validation.

Chapitre 3 – Étude cinétique d'extraction

Comme discuté dans le chapitre 1, la loi d'Arrhenius peut être utilisée pour définir les paramètres de l'extraction des lessivables et dans une certaine mesure ceux de l'extraction des extractables. Dans une étude de 10 cas par Jenke, l'application de cette notion a été examinée dans l'estimation de la concentration des impuretés. Ainsi, si on connaît le temps requis pour atteindre une concentration précise d'impureté à une température donnée, on peut estimer le temps requis pour atteindre la même concentration à une autre température. L'étude des 10 cas montre qu'il peut être possible de le faire, mais il faut s'attendre à plusieurs exceptions (Jenke, D., 2019). Un tel outil fiable et précis pourrait grandement améliorer les études E&Ls et mérite d'être approfondi.

3.1 Protocole de l'étude

3.1.1 Matériel

L'étude cinétique est effectuée en utilisant deux types de contenant en plastique très commun dans l'industrie pharmaceutique. Les contenants utilisés sont deux types de bouteilles de 60 mL en PET et l'autre en HDPE. Pour les deux contenants, le même type de bouchon est utilisé soit un bouchon avec une doublure de mousse en polyéthylène (PE). Le PE est de loin le plastique le plus largement utilisé en pharmaceutique et est classé en trois catégories; basse densité (LDPE), linéaire à basse densité (LLDPE) et haute densité (HDPE). Le HDPE est rigide, opaque et offre une bonne barrière à la moisissure et à l'oxygène. Le PET a une bonne résistance aux hautes températures, est léger et peut être utilisé pour former des bouteilles de différentes couleurs. Pour cette étude, les contenants en PET utilisés sont ambrés et légèrement limpides (Mohd Sabeel *et al.*, 2021).

3.1.2 Milieu d'extraction

Le sirop générique pour la toux de dextrométhorphan préparé maison avec une recette simplifiée est utilisé pour la partie lessivable de l'étude. Normalement, les contenants décrits en 3.1.1 ne sont pas utilisés pour un sirop, mais plutôt pour des médicaments secs. En revanche, le but étant d'obtenir un maximum d'impureté, avoir un niveau de contact élevé entre le médicament et le CCS est préférable. De plus, les sirops contiennent souvent un certain taux de solvant organique, principalement l'éthanol, pour augmenter la solubilité face à certains excipients et pour agir en tant qu'antimicrobien (Batista et Filho, 2020). Puisque la grande

majorité des molécules retrouvées dans les E&Ls sont grandement non-polaire, les solvants organiques sont bien souvent les milieux d'extraction dans lesquels le plus d'impureté migre (Dorival-Garcia *et al.*, 2018). C'est donc pour le contact élevé avec le CCS et la présence de solvant organique que ce type de médicament a été choisi pour l'étude.

Comme décrit dans le chapitre 1, le choix des solvants pour les milieux d'extractions de la partie extractable devrait imiter la composition du médicament le plus possible. Dans le cas de cette étude, on veut obtenir le plus d'extractables possible pour pouvoir suivre leur concentration au fil du temps. Pour le milieu d'extraction organique, une solution à 70% d'éthanol est utilisée. Pour les milieux d'extractions acides et alcalins, des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) 0.1N et d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0.01N sont utilisées. Ces deux solutions présentent respectivement un pH de 1 et 12. Ces milieux d'extractions sont généralement ceux utilisés dans les études E&Ls.

3.1.3 Protocole d'incubation

Normalement, les conditions d'incubations sont déterminées selon le temps de vie du médicament à l'étude. De plus, une étude E&L conventionnelle requiert seulement d'analyser les échantillons une seule fois à la fin de l'incubation. Dans le contexte de ce projet, l'étude cinétique requiert que plusieurs aliquotes soient prises durant l'incubation pour obtenir le profil de la concentration des impuretés au fil du temps. Le temps total d'incubation n'a pas besoin d'être prédéterminé puisqu'on peut juger au courant de l'analyse s'il est nécessaire de poursuivre l'incubation. Il est connu que dans la majorité des cas, la tendance de la concentration des E&Ls en fonction du temps est de forme logarithmique. Lorsque l'équilibre est atteint, il n'est pas nécessaire de continuer l'incubation. Ainsi, un plan général est établi (tableau 14), mais les intervalles de temps de prise d'aliquote et le temps d'incubation total peuvent être sujets à des variations. Les températures d'incubation pour les extractables sont plus élevées puisqu'on veut des conditions plus agressives pour obtenir le plus d'impureté possible. À l'inverse, des températures plus douces qui se rapprochent d'une condition d'entreposage normal (25 °C) sont utilisées pour les lessivables. L'extraction à 40 °C est faite autant pour les extractables que pour les lessivables et servira à étudier la différence de cinétique d'extraction entre les deux conditions. Les aliquotes sont prises à des plus petits intervalles de temps pour les conditions agressives dans le but de bien observer la cinétique du début d'extraction puisqu'à haute température, l'extraction des contaminants devrait aller plus vite.

Tableau 14 - Description des paramètres d'extraction de l'étude cinétique des E&Ls

Extraction	Milieu d'extraction	Température	Temps de prélèvement des aliquotes
Lessivables	Sirop	25, 30, 40 °C	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 mois
Extractables	EtOH 70%, HCl 0.1N, NaOH 0.01N	40 °C	1, 2, 3, 4, 5 et 6 mois
		50 °C	1, 2, 4, 6, 10, 15 semaines
		60 °C	3, 7, 10, 14, 21, 28, 49, 70 jours

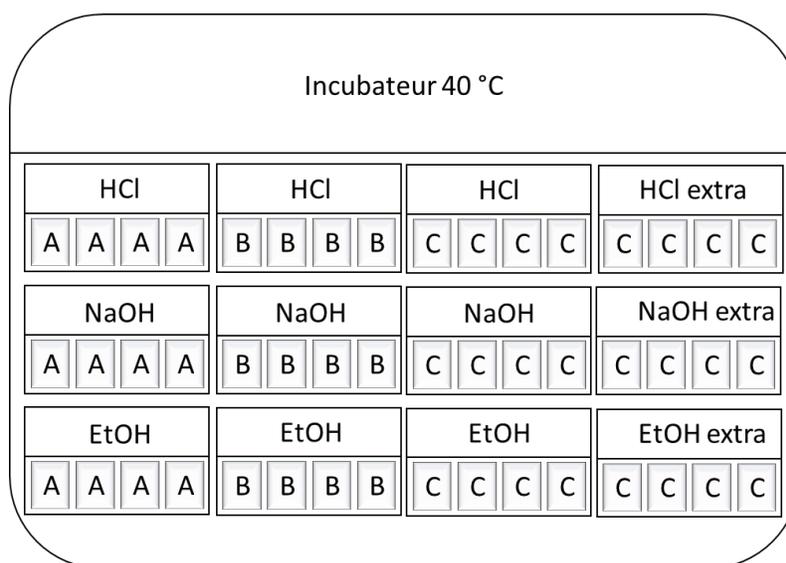


Figure 22 - Représentation du protocole d'extraction des extractables à 40 °C des CCS de PET (A), HDPE (B) et les vials de verre (C)

Chaque CCS est rempli à 40 mL avec le milieu d'extraction. La même quantité de milieu d'extraction est aussi mise dans un vial en verre et est utilisée comme blanc de réactif. Chaque combinaison de milieu d'extraction, température et CCS est fait en quadruplicata. Quatre bouteilles de blanc de réactif supplémentaire sont mises en incubation pour effectuer la correction de volume des échantillons. Tous les CCS et les vials en verre sont placés dans de grands plats en pyrex pour faciliter le transport et l'entreposage dans les incubateurs. Les CCS sont placés sur le côté de sorte que le milieu d'extraction a un bon contact avec tout le CCS ainsi que le bouchon. Une représentation de l'extraction est montrée en figure 22 où les CCS en PET, en HDPE et en verre sont représentés respectivement par A, B et C. Des aliquotes de 500 µL sont prises à chaque temps de prélèvement (tableau 14) ce volume est corrigé par une des quatre bouteilles de blanc de réactif supplémentaire. L'incubation avec le plus d'aliquotes est celle à 60 °C où 8 prélèvements ont lieu. Cela équivaut à une diminution de la concentration finale de 10% ce qui est considéré négligeable pour les fins de cette étude. Après le prélèvement d'aliquote, les échantillons sont conservés à 4 °C jusqu'à la lecture sur HPLC-QTOF.

L'analyse des lessivables suit le même protocole. Un seul milieu d'extraction est utilisé pour cette partie, soit le sirop pour la toux générique fait maison. Compte tenu des résultats obtenus dans les tests de %REC dans le chapitre 2, 1000 µL d'ACN 60% est ajouté aux aliquotes des lessivables ce qui équivaut à la dilution de 1 : 2. Un nettoyage supplémentaire de l'appareil est fait après les séquences puisque le sirop laisse beaucoup de résidus sur la source d'ionisation. La source est nettoyée avec de l'IPA 50% avant et après chaque utilisation. Si la saleté persiste, quelques secondes dans un bain sonore aident au nettoyage.

3.2 Évaluation des résultats

3.2.1 Traitement des données

Le chromatogramme qu'on obtient donne l'information sur l'intensité totale de tous les ions présents en solution durant l'élution (Total ions chromatogram, (TIC)). Bien qu'il soit possible de voir certains pics et les ions présents dans le spectre MS des TICs, extraire l'intensité d'une masse d'ion précise (Extracted Ion Chromatogram (EIC)) est beaucoup plus simple. Puisqu'on connaît la formule chimique des étalons, obtenir leur EIC est simple, mais pour les composés inconnus, il faut faire appel à des programmes de traitement de données. Plusieurs programmes existent qui permettent de chercher dans un TIC tous les EICs désirés selon multiples critères comme le RT, l'intensité des pics ou la masse exacte. Profinder et MPP de Agilent font partie de ces programmes et ils permettent dans ce projet de dresser la liste des impuretés présentes dans les échantillons. Ces deux programmes sont utilisés conjointement à la suite de l'acquisition des données comme montré en figure 23. La recherche des composés se fait par Profinder et MPP couvre le filtrage des composés et leur identification partielle par ID Browser (fonctionnalité de MPP). Profinder permet de dresser une liste préliminaire de composé selon des critères de hauteur de pic, de RT, et de récurrence pour chaque masse sur charge (m/z). Les échantillons peuvent être rassemblés en groupe, dans ce cas-ci, il s'agit de chaque quadruplicata. Cette fonction aide au traitement des données autant dans Profinder que MPP.

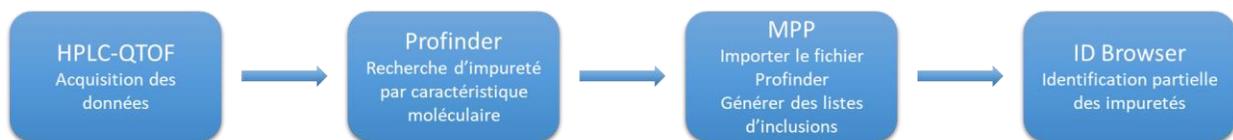


Figure 23 - Étapes de traitement des données par Profinder et MPP

La première étape est la recherche de composé selon leur intensité, c'est normalement à cette étape que le AET est utilisé comme critère de hauteur de pic. La posologie d'un médicament pour la toux typique pour enfant contenant 7.5 mg de dextrométhorphane par 5 mL de sirop est de 4 doses de 10 mL par jour. Les pots ont un volume de 60 mL, mais considérant l'expansion que peut

prendre une solution avec la chaleur durant l'incubation, un volume de 40 mL de milieu d'extraction a été utilisé. Aucun SCT précis n'existe pour les solutions orales ou les suspensions, mais il est recommandé d'utiliser le SCT à 1.5 µg/jour. Avec ces informations, on calcule le AET spécifique à cet échantillon selon l'équation EQ.9.

$$\text{EQ.9} \quad AET \frac{\mu\text{g}}{\text{CCS}} = \frac{1.5 \frac{\mu\text{g}}{\text{jour}}}{4 \frac{\text{dose}}{\text{jour}}} \times 10 \frac{\text{doses}}{\text{CCS}} = 10.375 \frac{\mu\text{g}}{\text{CCS}} * \frac{\text{CCS}}{40\text{mL}} = 0.259 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

Ainsi, la hauteur de l'étalon à la concentration du AET devient le critère de la hauteur de pic minimale pour la recherche d'impureté (Technique A). L'objectif du projet est cependant de suivre des impuretés qui ont une tendance cinétique intéressante et pour avoir un maximum de choix, on veut avoir le plus d'impureté possible à suivre. Le critère de hauteur de pic minimal est donc déterminé par une autre méthode soit par la hauteur à laquelle une distinction claire existe entre l'impureté et le bruit de fond (Technique B) (figure 24). Le spectre MS d'une section du TIC est analysé et permet de déterminer qu'une hauteur de 500 comptes est adéquate comparativement à une hauteur de 13921 comptes pour la technique A. En comparaison, le nombre d'impuretés détectées dans les dernières aliquotes de l'incubation à 60 °C (69 jours) sont de 59 pour la technique A et 741 pour la technique B.

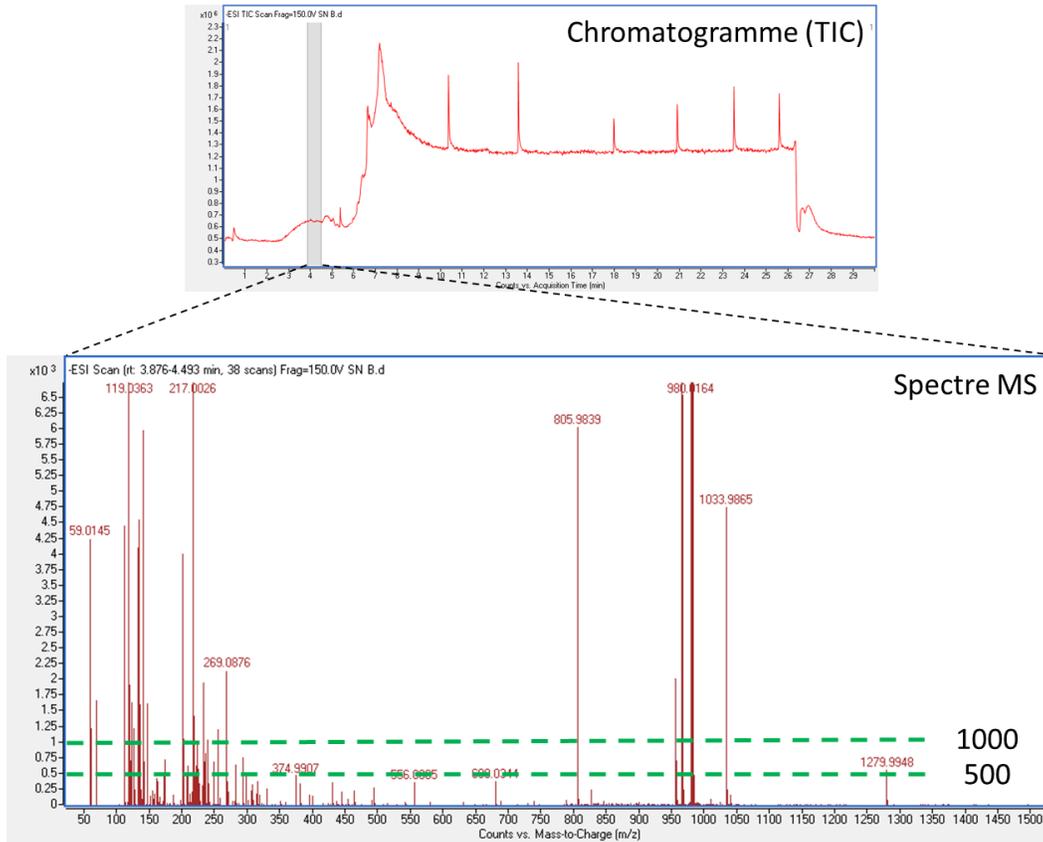


Figure 24 - TIC de la solution étalon LOQ et spectre MS de la section entre 3.876 et 4.493 min

La recherche d'impureté se fait entre 2 et 25 minutes de RT et la différence de RT par groupe est inférieure à 0.05 min. La m/z d'un groupe ne doit pas varier de plus de 30 ppm. Les adduits d'ions en mode positif sont +H, +K, +Na, +NH₄, perte H₂O et en mode négatif sont -H, -HCOO, -CH₃COO. Le fichier Profinder est importé dans MPP où les groupes d'échantillons sont filtrés selon les critères suivants ;

- Récurrence de l'impureté dans un groupe ; 3 échantillons sur 4 doivent contenir l'impureté
- Différence entre les groupes ; groupe A doit avoir une aire de pic d'au moins 2 fois celle du groupe B ou vice versa
- Blanc de réactif ; les groupes échantillons doivent être supérieurs aux groupes de blanc de réactif

3.2.2 Sélection des impuretés

La recherche de composé par Profinder et MPP pour l'extraction à 60 °C a donné 493 composés. Bien que cela serait idéal, cette liste est beaucoup trop grande pour établir la cinétique d'extraction de tous ces composés. Il se peut que certaines de ces impuretés soient des cas isolés, elles pourraient provenir du solvant, du matériel utilisé ou de l'appareil. L'occurrence des 493 composés a été évaluée pour tous les prélèvements de l'extraction à 60 °C. Ceux avec le plus d'occurrences sont utilisés dans l'étude cinétique. Une étude cinétique préliminaire de ces composés est établie pour justifier la sélection des impuretés à suivre. Les concentrations des impuretés sont estimées par produit croisé en fonction de l'aire des pics d'intensité des impuretés par rapport aux étalons et de la concentration de ces derniers. L'étalon BPA est utilisé en mode négatif et l'étalon IRG3114 en mode positif. La sélection des « meilleurs » impuretés est faite de façon à obtenir ceux qui reflètent une des tendances cinétiques attendues. La figure 25 montre les 3 types de tendances qu'on observe, soit la tendance linéaire (composé 16), l'exponentielle (composé 7) et la logarithmique (composé 22 et 1). Évidemment, dans le cas des droites linéaires et exponentielles, cette tendance ne sera pas maintenue à de très longs temps d'incubation. Il s'agit simplement de ce que l'on observe au début de l'extraction d'un composé. Cela indique quand même la différence de type de cinétique que l'on peut observer dans les études E&Ls. De façon générale, la forme logarithmique est ce à quoi on s'attend en E&L et le « plafond » atteint signifie que l'échange de l'impureté entre le CCS et le milieu d'extraction est à l'équilibre. Un dernier exemple est montré dans la figure 26 où le signal ne montre pas d'augmentation de concentration au travers du temps. Un composé qui diminue en concentration au fil du temps est généralement expliqué par la dégradation du composé. On utilise donc comme barème de sélection que les impuretés démontrent au moins une des trois tendances (linéaire, exponentielle ou logarithmique). En tout, 63 impuretés sont sélectionnées et ces composés sont ensuite étudiés pour les incubations à 50 et 40 °C.

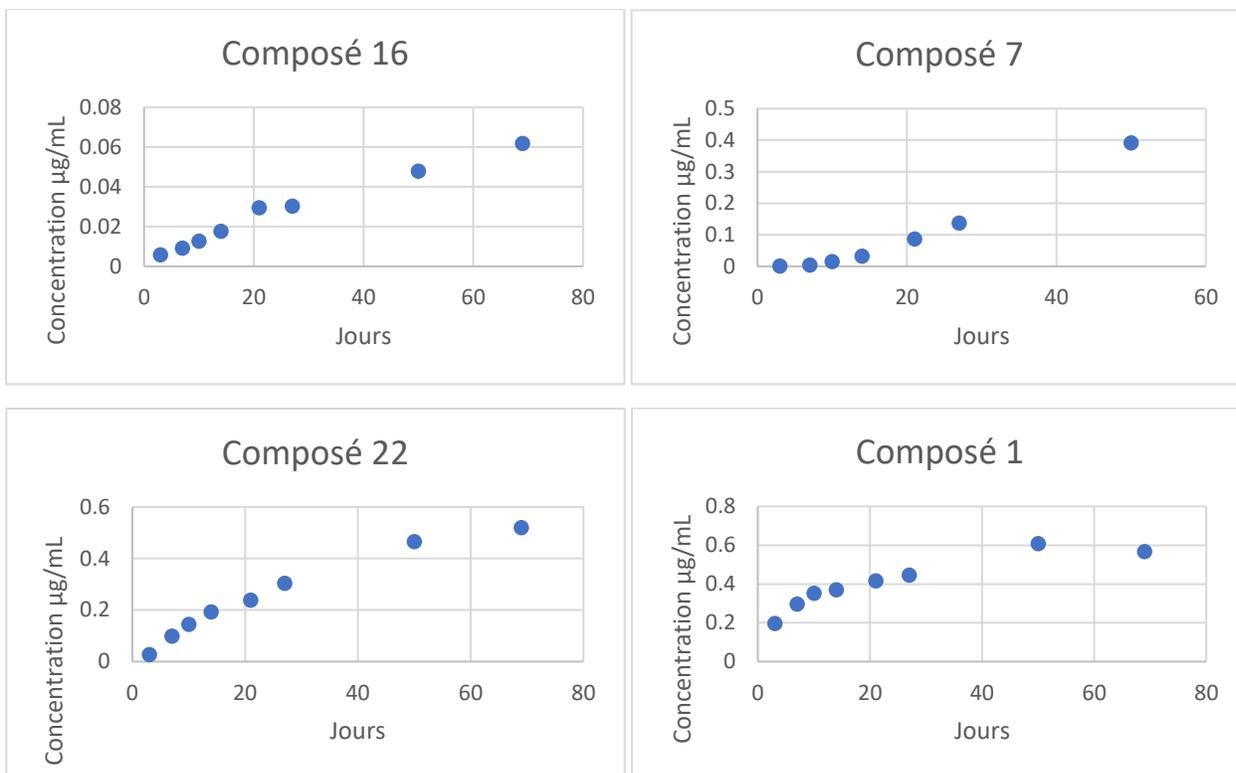


Figure 25 - Concentration en fonction du temps des impuretés extrait de l'incubation à 60 °C du composé 16, 7, 22 et 1.

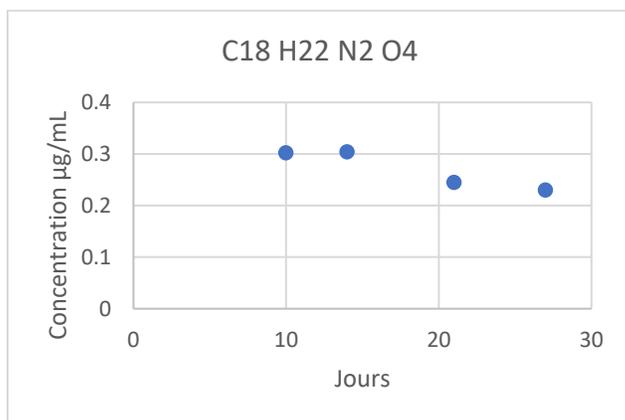


Figure 26 - Concentration en fonction du temps d'une impureté de formule moléculaire $C_{18}H_{22}N_2O_4$ extraite de l'incubation à 60 °C dans le CCS « B » avec le milieu d'extraction NaOH 0.01N en mode d'ionisation négatif où la concentration est estimée à partir de l'étalon BPA

3.2.3 Cinétique d'extraction

La figure 27 montre le profil cinétique obtenu pour le composé 1 aux températures d'incubations de 40, 50 et 60 °C. Comme prévu, la vitesse d'extraction est plus rapide à haute température et diminue avec la température d'incubation. Les deux dernières aliquotes prises pour l'incubation à 60 °C montrent une perte de signal comparé à la tendance. Dans cette situation, on assume qu'une dégradation du composé survient et les points sont retirés de la courbe. Le même processus est fait pour tous les composés contenant des données aberrantes. Le profil des 63 impuretés sélectionnées précédemment permet de filtrer encore une fois un certain nombre de composés. Certains composés montraient une bonne cinétique d'extraction à 50 et 60 °C, mais rien à 40 °C. Ces résultats sont prévisibles compte tenu que l'extraction de certains composés du CCS doit nécessiter un minimum de température pour migrer vers le milieu d'extraction. D'autres composés montraient une bonne tendance à 40 °C, mais des signaux instables à 50 et 60 °C probablement en lien avec la stabilité du composé à des températures plus élevées. La sélection finale de composés s'arrête sur 22 composés répertoriés en annexe B.1 et leur profil cinétique est montré en annexe B.2.

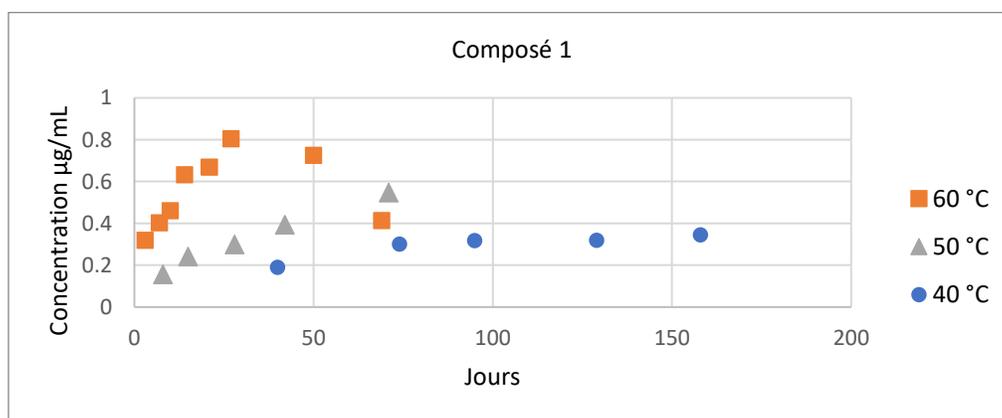


Figure 27 - Concentration en fonction du temps du composé 5 extrait de l'incubation à 40, 50 et 60 °C dans le CCS « B » avec le milieu d'extraction EtOH 70% en mode d'ionisation négatif où la concentration est estimée à partir de l'étalon BPA.

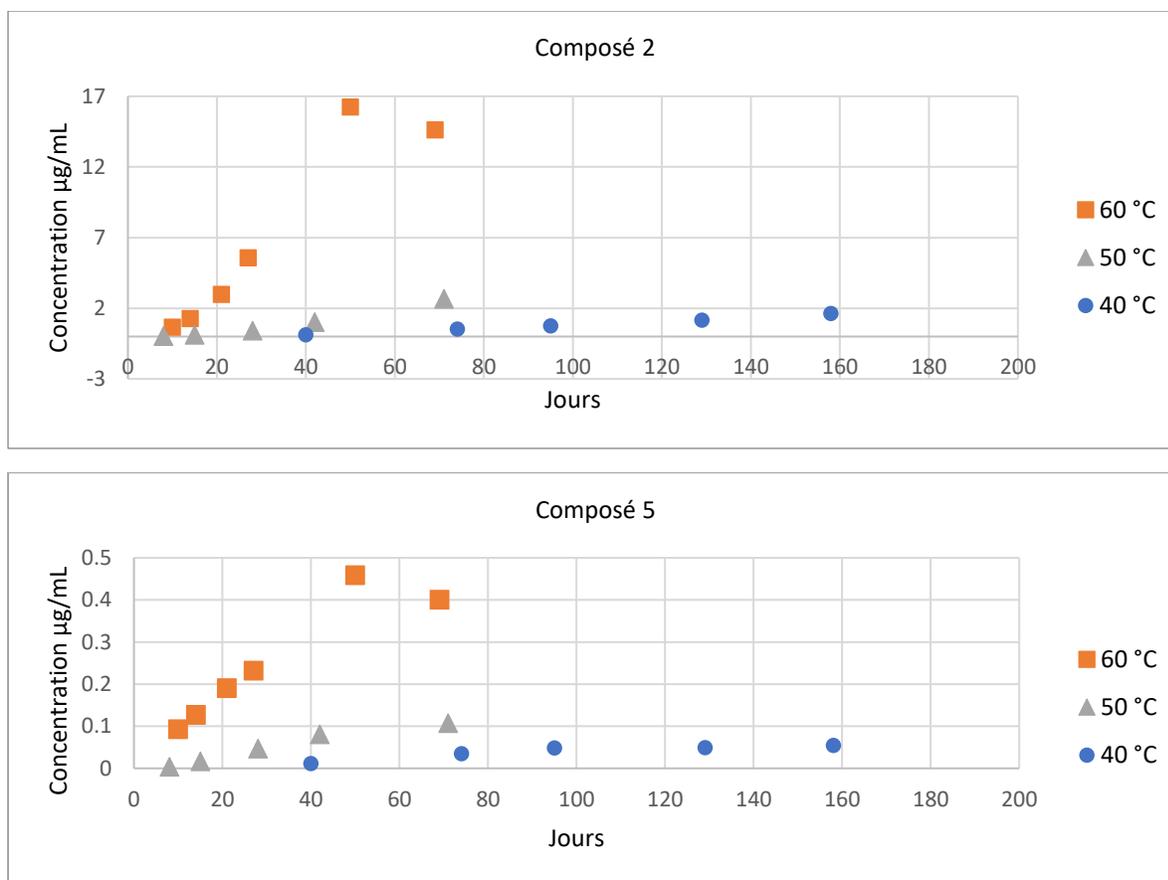


Figure 28 - Profil cinétique du composé 2 et 5

En MS, il est important de considérer la possibilité qu'un composé soit fragmenté à la source à l'entrée du MS. Cela pourrait causer des fausses identifications d'impureté et empêcherait aussi la détection de l'impureté initiale (Chen *et al.*, 2023). Comme montré en figure 28, ces deux composés présentent une tendance très similaire à première vue et doivent être inspectés pour s'assurer qu'il ne s'agit pas d'une fragmentation à la source. La tendance des signaux, le temps de rétention et des recherches en littérature permettent rapidement de déterminer s'il s'agit bien de deux composés sans aucun lien l'un par rapport à l'autre. Dans le cas présent, les deux composés ont un temps de rétention respectif de 4.6 min et 6.1 min, ce n'est donc pas une fragmentation à la source.

3.2.4 Prédiction par Slimstats

Le programme Slimstats nécessite au minimum 3 points dans deux températures différentes pour faire une prédiction dans une troisième température selon la loi d'Arrhenius (EQ.10). En utilisant l'équation de la droite obtenue par les données à 40 °C, on calcule le temps requis à cette température pour arriver au AET. Ce temps est considéré comme le temps « pratique ». En

parallèle, les données à 50 et 60 °C sont insérées dans le programme Slimstats. Le programme utilise les données à 50 et 60 °C pour déterminer les termes « A » et « E_a ». Ces termes sont propres à chaque réaction chimique et permettent ensuite le calcul de la constante de vitesse de réaction « k ».

$$\text{EQ.10} \quad k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$

k = constante de vitesse

A = facteur de collision

E_a = énergie d'activation (J·mol⁻¹)

R = Constante universelle des gaz (J·K⁻¹·mol⁻¹)

T = Température en kelvin (K)

Les unités de *k* et A sont identiques et varient selon l'ordre de réaction

Le programme applique ces valeurs pour calculer la tendance de la réaction à 40 °C (Voir annexe B.3). Normalement, ce programme est utilisé dans le cadre de dégradation d'un API ou d'apparition d'impureté suite à la dégradation de l'API. La prédiction statistique fonctionne uniquement si la réaction peut être considérée comme étant d'ordre zéro ou de premier ordre. On ne peut donc théoriquement pas utiliser les données avec une tendance logarithmique ou exponentielle. La majorité des tendances des impuretés suivent une relation linéaire au début de l'extraction et ce n'est que vers la fin de l'extraction qu'une tendance logarithmique ou exponentielle apparaît. Il est donc justifiable d'utiliser la partie linéaire des profils cinétique pour faire la prédiction du temps requis pour atteindre le AET. La déviation du modèle pour la tendance logarithmique provoquera une sous-estimation du temps requis pour atteindre le AET. Cela est entièrement acceptable dans le cadre d'un test limite puisqu'il s'agit d'un « worst-case scenario ». À l'inverse, les composés ayant une tendance exponentielle seront surestimés. Sur les 22 composés sélectionnés, seul le composé 7 présente ce genre de tendance avec l'incubation à 60 °C. On considère donc cela comme étant une exception. 18 profils cinétiques sont gardés pour l'analyse Slimstats puisque certains composés montraient des ratios d'aire plus élevé à 40 °C qu'à 50 °C.

Le programme Slimstats calcule donc avec les données des incubations à 50 et 60 °C le temps requis pour qu'un composé théoriquement incubé à 40 °C atteigne le AET (Figure 29). Les données dans Slimstats doivent être représentées sous forme de pourcentage alors les valeurs mesurées à 50 et 60 °C ont été converties en pourcentage en fonction du plus gros ratio d'aire obtenu pour ce composé. La courbe reste la même après cette conversion. Les points en « x » sur la figure représente les données mesurées à 50 et 60 °C, le AET est montré par la ligne pleine rouge et la tendance théorique calculée par Slimstats est montrée par la ligne pleine noire.

On décrit ce temps comme étant le temps « Slimstats ». La figure 30 montre la comparaison entre le temps « pratique » et le temps « Slimstats » en pourcentage. Le pourcentage de différence (%DIFF) (EQ.11) entre la valeur pratique et celle de Slimstats est indiqué sur les figures. Les

composés sont séparés en 3 figures selon la valeur du %DIFF. Slimstats parvient à prédire avec une marge d'erreur de 40% la moitié des composés étudiés (9 sur 18). 6 des composés sur 18 sont sous-estimés, c'est-à-dire en dessous de 60% de la valeur pratique et seulement 3 des composés sont surévalués soit au-dessus de 140% de la valeur théorique. Ces pourcentages sont des valeurs arbitraires qui sont jugées adéquate dans le cadre de ce projet considérant qu'il s'agit d'un test limite de dépistage. Cette marge d'erreur devrait être réévaluée selon les besoins de chaque étude E&L. Dans le cadre d'une étude E&L, une sous-estimation est valide puisque le temps requis pour que l'impureté atteigne la concentration AET est plus court. Cela équivaut à une contamination plus rapide du produit. Il en revient à dire que dans 83% des cas (15 composés sur 18), l'estimation par Slimstats est soit valide, soit sous-estimé. Il faut tout de même noter qu'une sous-estimation n'est pas idéal car cela peut engendrer des travaux supplémentaires pour l'identification et la quantification de ces composés. Surtout que la plupart de ces estimations sont entre 7,5 et 11,0 %DIFF. Cela est loin d'être un résultat précis et ne devrait pas être considéré comme valide. Comme mentionné plus tôt, l'estimation faite par Slimstats fonctionne pour des réactions d'ordre zéro ou de premier ordre. Cela justifie en partie l'écart entre les valeurs théoriques et pratiques.

EQ.11
$$\%Diff = \frac{\text{Valeur théorique}}{\text{Valeur pratique}} * 100$$

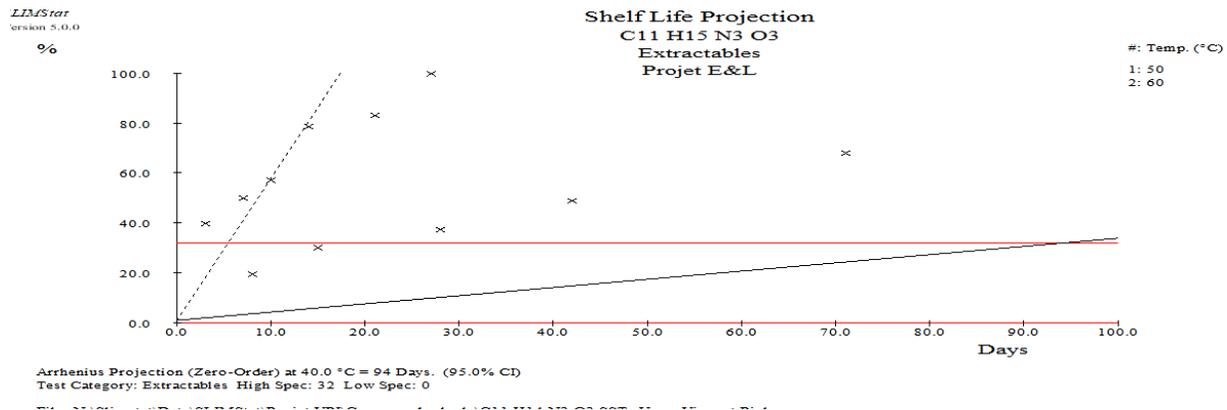
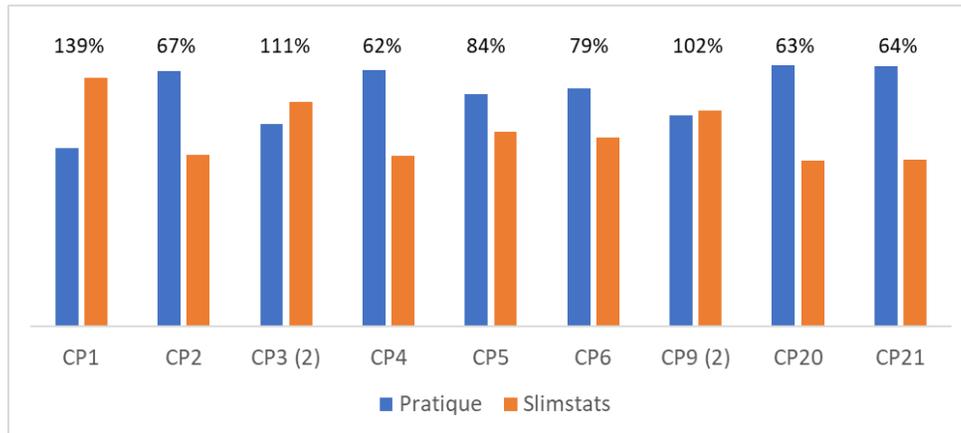
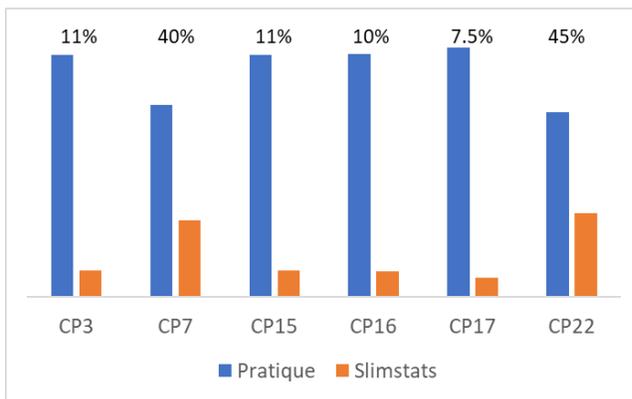


Figure 29 - Projection du temps requis pour atteindre l'AET par Slimstats pour le composé CP1

a)



b)



c)

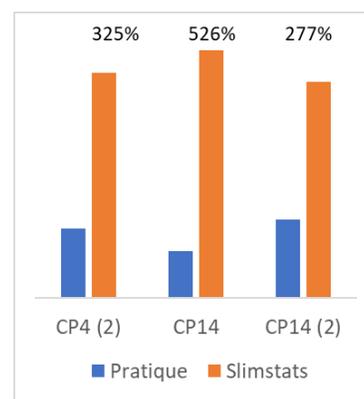


Figure 30 - Pourcentage du temps requis en jours pour atteindre l'AET à 40 °C de chaque impureté calculée par le programme statistique Slimstats à l'aide des données à 50 et 60 °C comparativement aux résultats obtenus en pratique ainsi que le pourcentage de différence (%Diff) du comparatif (Slimstats/Pratique x 100) ; a) %Diff 60 – 140%, b) %Diff ≤ 60%, c) %Diff ≥ 140%

3.2.5 Lessivables

Au total, 10 mois d'incubation à 3 températures d'incubation différentes (25, 30 et 40 °C) ont été faits pour l'étude des lessivables. Une aliquote par mois a été prélevée et analysée par la méthode développée dans le chapitre 2. Malheureusement, aucun signal stable n'a été détecté. On pouvait retrouver certaines des impuretés de la liste produit en 3.2.3, mais ces signaux n'étaient jamais présents dans au moins 3 des échantillons sur 4 d'un même quadruplicata. Il n'y avait pas de corrélation ou de tendance au travers du temps non plus. L'explication la plus simple serait que la dilution du sirop en 1 : 2 était trop grande. Bien que cela aidait à éviter l'effet de matrice et l'interférence des excipients du sirop sur les analytes, il se peut que cela réduisait trop

le signal des impuretés. De plus, les conditions beaucoup moins agressives de solvant et de température durant l'incubation des lessivables diminuent la migration des impuretés. L'objectif d'avoir choisi un sirop comme échantillon était pour avoir un maximum de surface de contact avec le CCS et d'avoir la présence d'un solvant organique qui influence positivement la migration des impuretés. L'absence de résultat dévoile cependant qu'un autre choix aurait été plus judicieux. Par exemple, un dissolvant pour vernis à ongle contient un fort pourcentage de solvant organique sans être visqueux.

Chapitre 4 – Discussion et conclusion

4.1 Discussion

4.1.1 Méthode E&L

La nouvelle méthode de détection par UHPLC-ESI-QTOF a été conçue en utilisant 10 étalons qu'on retrouve principalement comme additif dans les plastiques ou comme contaminant provenant des plastiques. À notre connaissance, aucune autre méthode de dépistage d'E&Ls utilisant plusieurs étalons n'a été développée auparavant. Ce concept permettra de s'assurer d'une élution complète et efficace de tous les composés sur une large gamme de polarité. La validation a démontré que les étalons choisis ont une bonne linéarité et une bonne adéquation du système. La solution étalon n'est pas stable au fil du temps pour 3 des étalons, soit l'IRG1330, l'IRG1076 et l'IRG1010. Il est à noter que cette stabilité a été faite sur 42 jours et il se peut que sur une plus courte durée d'entreposage, la solution soit stable. Le contenant utilisé pour l'entreposage peut être en cause de la contamination à l'IRG1010 alors un test de stabilité dans plusieurs contenants aurait pu être utile. Un test de précision et répétabilité a été tenté avec un sirop pour la toux à base de dextrométhorphan, mais les signaux étaient très instables et le pourcentage de recouvrement trop bas. Cette partie de validation était en extra et n'est habituellement pas incluse pour une méthode de dépistage générale qui est utilisée pour plusieurs types d'échantillons différents.

Bien que cette méthode ait été validée avec un groupe d'étalons, le but était de démontrer l'utilité et l'efficacité d'une méthode à plusieurs étalons. Le concept peut être modifié dépendamment des objectifs. Considérant que le dépistage d'E&L est un test limite complexe et que les cibles sont extrêmement nombreuses et inconnues, on considère nécessaire qu'une méthode assure la détection d'une large gamme de molécules. Qu'il s'agisse du poids moléculaire, de la polarité ou de l'ionisation d'une molécule, il faut être certain que la méthode puisse la détecter. Dans le cas où une méthode n'utilise qu'un seul étalon et que ce dernier est très peu retenu par la méthode chromatographique, un court temps d'analyse peut sembler suffisant, mais en réalité, plusieurs composés sont encore dans la colonne.

4.1.2 Extraction

Le problème majeur des études E&Ls est le temps requis pour effectuer les extractions. Il est reconnu qu'on peut incuber les échantillons à de plus hautes températures pour raccourcir la durée de l'incubation. La durée du temps d'incubation est normalement estimée selon la loi d'Arrhenius. De plus, cette loi peut être utilisée pour prédire la vitesse de dégradation d'un API à

une température donnée en utilisant les résultats de cette dégradation à une autre température. Cette technique est depuis longtemps utilisée dans les études de stabilité avec l'aide de programme statistique comme Slimstats. Ce projet a établi que Slimstats donne des résultats valide ou des résultats sous-estimés dans 83% des cas lorsqu'on veut estimer le temps requis pour atteindre la concentration AET. Le profil cinétique d'extraction à 2 températures d'incubation différentes doit être dressé pour pouvoir utiliser cet outil. La cinétique d'extraction nécessite de prendre plusieurs aliquotes durant l'incubation et incuber à 2 températures. En d'autres mots, la charge de travail est plus élevée pour établir un profil cinétique. Plus de données améliorerait aussi la précision de cette technique. Il est donc possible d'ajouter d'autres températures d'incubation pour augmenter la précision mais au prix d'une plus longue analyse. Évidemment, le but d'améliorer une méthode est souvent de la rendre plus rapide et efficace. Dans le cas présent, cette nouvelle méthode peut fournir de l'information supplémentaire mais beaucoup d'amélioration reste à faire. Vu la grande variété de %DIFF obtenue entre les valeurs théoriques et pratiques, cette technique nécessiterait d'être perfectionner avant d'être utilisée. Il faut clairement établir les besoins de l'étude au départ et décider d'avance s'il est nécessaire d'utiliser ce genre de technique, mais il n'en demeure pas moins que l'outil présente un très bon potentiel et mérite d'être approfondi.

Un des problèmes majeurs rencontrés dans l'étude cinétique est l'instabilité des signaux d'impuretés au travers du temps. Plusieurs impuretés étaient détectées tout au long de l'incubation, mais les signaux ne donnaient aucune tendance dans le cadre d'un profil cinétique. Les composés sont inconnus et on ne connaît pas leur stabilité. Il se peut donc que certaines des impuretés montraient une bonne tendance cinétique à 40 °C, mais une instabilité à haute température ce qui rendait le profil cinétique inutilisable. Cela démontre la difficulté que peuvent causer certaines des impuretés.

Un des objectifs du projet était aussi de voir la cinétique d'extraction des lessivables et une potentielle corrélation entre la cinétique des extractables et celle des lessivables. Puisqu'aucun résultat tangible n'a pu être collecté de ce côté, cette partie n'a pas pu être étudiée. Il est totalement justifiable d'assumer que l'utilisation de Slimstats dans la prédiction des concentrations des lessivables sera autant efficace que pour les extractables.

4.1.3 Traitement des données

Dans ce projet, les étalons ont été utilisés plutôt comme étalon substitut (surrogate standard). Des étalons substituts sont des composés chimiquement semblables à l'analyte et on les utilise généralement pour mesurer l'efficacité d'une extraction, soit une extraction sur cartouche en phase solide (SPE). Ces étalons substituts ne sont évidemment pas l'idéal, mais il s'agit tout de même de la meilleure façon de procéder pour le moment. Comme discuté en 1.3.3, pour une concentration donnée en MS, la réponse n'est pas la même pour chaque analyte. L'utilisation du

concept de RRF est recommandée, mais requiert qu'une banque de données de ces valeurs soit répertoriée. Pour aider l'efficacité de l'utilisation du RRF, il serait avantageux de doper les échantillons avec une quantité d'étalons équivalente à la solution étalon employée, soit un étalon interne. Les étalons internes permettent de compenser pour les variations du signal causées par plusieurs sources comme la matrice de l'échantillon, la fluctuation du signal de l'appareil ou la préparation des échantillons. Il est donc recommandé d'utiliser les étalons de la méthode développée dans ce projet de cette manière. La précision des RRFs et la répétabilité des estimations seront améliorées.

4.1.4 Conclusion et perspectives

Depuis l'arrivée du plastique et du caoutchouc dans l'industrie moderne, leur utilité n'a été que grandissante. Ils sont devenus indispensables dans presque toutes les sphères de la vie et occupent une très grande place dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. Ce n'est que depuis quelques dizaines d'années qu'on réalise les désavantages que ces matériaux causent et qu'on essaie de les remplacer par d'autres produits. En attendant, les études E&Ls vont demeurer une partie importante et grandissante des analyses de contrôle qualité alimentaire et pharmaceutique. Des protocoles clairs et reproductibles n'ont toujours pas été mis en place pour assurer l'intégrité de ces études, mais il n'en reste pas moins que l'industrie s'efforce à produire des méthodes de plus en plus efficaces. Ce projet avait pour but d'améliorer deux facettes des études E&Ls. Une nouvelle méthode de détection des NVOCs par UHPLC-ESI-QTOF a été développée. Les paramètres chromatographiques ont été optimisés et validés en fonction du signal des 10 étalons sélectionnés. L'utilité et l'efficacité d'un groupe d'étalons caractéristique des E&Ls ont été démontrées. Cette méthode a ensuite été utilisée pour dresser le profil cinétique des impuretés obtenues dans le cadre d'une étude E&L de deux types de contenants soit un en PET et l'autre en HDPE ayant des bouchons en polypropylène avec doublure en PTFE. L'utilisation du programme statistique Slimstats comme outil de prédiction pour la concentration des impuretés a été démontrée. Malheureusement, une corrélation entre les profils cinétiques des extractables et ceux des lessivables n'a pas pu être étudiée.

Un groupe de recherche des laboratoires PPD (Cartledge *et al.*, 2020) a développé en 2020 plusieurs modèles mathématiques pour l'estimation des concentrations du BHT comme E&L à l'aide de multiple température d'incubation. Cette approche est très intéressante et directement en lien avec l'objectif de ce projet. Il serait intéressant d'étudier l'efficacité de ces modèles avec celui de Slimstats et de vérifier leur application sur plusieurs E&Ls inconnus.

Puisque la partie de l'extraction des lessivables n'a pas été concluante, il serait intéressant de retenter l'expérience avec un échantillon moins complexe comme une solution saline. Bien qu'on perdrait la proportion de solvant organique présent dans le sirop, une matrice plus simple éviterait le besoin de dilution pour pallier à l'interférence et le salissage de l'appareil.

4.2 Références

- <621>. (2023). Chromatography. *USP*. https://doi.org/10.31003/uspfnf_m99380_07_01
- <1225>. (2022). Validation of Compendial Procedures. *USP*. https://doi.org/10.31003/uspfnf_m99945_04_01
- <1226>. (2019). Verification of Compendial Procedures. *USP*. https://doi.org/10.31003/uspfnf_m870_03_01
- <1663>. (2022). Assessment of extractables associated with pharmaceutical packaging/delivery systems. *USP*. https://doi.org/10.31003/uspfnf_m7126_03_01
- <1664>. (2021). Assessment of drug product leachables associated with pharmaceutical packaging/delivery systems. *USP*. https://doi.org/10.31003/uspfnf_m7127_02_01
- AccuStandard. (2013). *Plastic Additive Standards Guide*.
Agilent. <https://www.agilent.com/>
- Allen, D. R. et McWhinney, B. C. (2019, Aug). Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. *Clin Biochem Rev*, 40(3), 135-146. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00023>
- Batista, L. R. et Filho, N. R. A. (2020). Ethanol Content Determination in Medicine Syrups Using Headspace and Multidimensional Heart-Cut Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.*, 31(2), 394-401. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190193>
- Booij, P. et Creasey, J.). Identification of Unknown Extractables and Leachables Using Mass Spectrometry: Identification With Confidence?
- Carlsson, H., Vaivade, A., Emami Khoonsari, P., Burman, J. et Kultima, K. (2022, Apr 15). Evaluation of polarity switching for untargeted lipidomics using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1195, 123200. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123200>
- Cartledge, B., Carmichael, J., Haag, N., Hansen, E., Lato, T. et Yu, X. (2020). Predicting Extractables and Leachables from Container Stoppers. *BioPharm International*, 33(8), 40-44.
- Chanotiya, C. S., Pragadhesh, V. S. et Uniyal, G. C. (2013). Avoiding interferences and contaminants using Eppendorf Safe-Lock Tubes in mass spectrometry studies of natural products. *Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants*.
- Chen, L., Pan, H., Zhai, G., Luo, Q., Li, Y., Fang, C. et Shi, F. (2023, Jun 30). Widespread occurrence of in-source fragmentation in the analysis of natural compounds by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 37(12), e9519. <https://doi.org/10.1002/rcm.9519>
- Cheng, Y. Y. et Yu, J. Z. (2020). Minimizing Contamination from Plastic Labware in the Quantification of C16 and C18 Fatty Acids in Filter Samples of Atmospheric Particulate Matter and Their Utility in Apportioning Cooking Source Contribution to Urban PM2.5. *Atmosphere*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/atmos11101120>
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography [Review]. *North Clin Istanbul*, 3(2), 156-160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Dorival-Garcia, N., Carillo, S., Ta, C., Roberts, D., Comstock, K., Lofthouse, S., Ciceri, E., D'Silva, K., Kierans, G., Kaisermayer, C., Lindeberg, A. et Bones, J. (2018, Aug 7). Large-Scale Assessment of Extractables and Leachables in Single-Use Bags for Biomanufacturing [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Anal Chem*, 90(15), 9006-9015. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01208>
- Farajzadeh, M. A., Vardast, M. R. et Bahram, M. (2008). Optimization of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Irganox 1010 and Irgafos 168 from Polyolefins Before Liquid Chromatographic Analysis. *Chromatographia*, 69(5-6), 409-419. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0912-z>

- Farhi, R., Morel, C. et Chéron, J. (2006). *Matières plastiques & adjuvants hygiène et sécurité*. Dans L. i. n. d. r. e. d. s. (INRS) (dir.).
- FDA. (1999). *Guidance for Industry: Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics*.
- FDA. (2015). *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*. U.S. Department of Health and Human Services.
- H&A Scientific - Slimstat. <https://hascientific.com/our-products/slim-stat/>
- Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidoua, E. et Purnell, P. (2018). An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179-199.
- Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis* (8 éd.). Freeman.
- Houston, C. T., Rodrigues, A. D., Smith, B. B., Wang, T. et Richardson, M. (2022, May-Jun). Principles for Management of Extractables and Leachables in Ophthalmic Drug Products [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 76(3), 278-294. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2022.012744>
- . <http://www.chemspider.com/>.
- . <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Jenke, D. (2015, Mar). Safety risk categorization of organic extractables associated with polymers used in packaging, delivery and manufacturing systems for parenteral drug products. *Pharm Res*, 32(3), 1105-1127. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1523-z>
- Jenke, D. (2018). Identification, analysis and safety assessment of leachables and extractables. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 101, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.024>
- Jenke, D. (2019, Mar-Apr). Application of Arrhenius Kinetics to Acceleration of Controlled Extraction Studies. *PDA J Pharm Sci Technol*, 73(2), 135-169. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2018.009050>
- Jenke, D. et Odufu, A. (2012, Mar). Utilization of internal standard response factors to estimate the concentration of organic compounds leached from pharmaceutical packaging systems and application of such estimated concentrations to safety assessment. *J Chromatogr Sci*, 50(3), 206-212. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr048>
- Jenke, D. R., Story, J. et Lalani, R. (2006, Jun 6). Extractables/leachables from plastic tubing used in product manufacturing. *Int J Pharm*, 315(1-2), 75-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.02.011>
- Jordi, M. A., Rowland, K., Liu, W., Cao, X., Zong, J., Ren, Y., Liang, Z., Zhou, X., Louis, M. et Lerner, K. (2020, Jul 15). Reducing relative response factor variation using a multidetector approach for extractables and leachables (E&L) analysis to mitigate the need for uncertainty factors. *J Pharm Biomed Anal*, 186, 113334. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113334>
- Kafeenah, H. I. S., Osman, R. et Bakar, N. K. A. (2019, Oct 17). Effect of Mobile Phase pH on the Electrospray Ionization Efficiency and Qualitative Analysis of Pharmaceuticals in ESI + LC-MS/MS. *J Chromatogr Sci*, 57(9), 847-854. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz061>
- Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B. et Whittall, R. M. (2008, Oct 3). Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 627(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.043>
- Konermann, L. (2017, Sep). Addressing a Common Misconception: Ammonium Acetate as Neutral pH "Buffer" for Native Electrospray Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 28(9), 1827-1835. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1739-3>
- Kumar, N. (2021). Identifying the Impurity Profiling for Pharmaceutical Product by Using Different Analytical Techniques: An Overview *Research and Reviews in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- Le Bisphénol A (BPA) dans la population canadienne. (2021). *Santé Canada*.
- Legrand, P., Desdion, A., Boccadifuoco, G., Dufay Wojcicki, A., Worsley, A., Boudy, V. et Dufay, S. G. (2018, Jun 5). Development of an HPLC/UV method for the evaluation of extractables and leachables in

- plastic: Application to a plastic-packaged calcium gluconate glucoheptonate solution. *J Pharm Biomed Anal*, 155, 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.044>
- Mannur, V. S., Patel, D., Mastiholmath, V. S. et Shah, G. (2011). Selection of Buffers in LC-MS/MS: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 6(1), 34-37.
- Marta, Z., Bobaly, B., Fekete, J., Magda, B., Imre, T., Meszaros, K. V. et Szabo, P. T. (2016, Sep 10). Pushing quantitation limits in micro UHPLC-MS/MS analysis of steroid hormones by sample dilution using high volume injection. *J Pharm Biomed Anal*, 129, 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.024>
- Mohd Sabeel, M. M. S., Uyen Thanh, N., Ahmad, N. et Abdul Hamid, Z. (2021). Plastics Packaging for Pharmaceutical Products. Dans. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820352-1.00088-2>.
- Norwood, D. L., Jenke, D., Manolescu, C., Pennino, S. et Grinberg, N. (2009). HPLC and LC/MS Analysis of Pharmaceutical Container Closure System Leachables and Extractables. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32(11-12), 1768-1827. <https://doi.org/10.1080/10826070902959497>
- Norwood, D. L., Paskiet, D., Ruberto, M., Feinberg, T., Schroeder, A., Poochikian, G., Wang, Q., Deng, T. J., DeGrazio, F., Munos, M. K. et Nagao, L. M. (2008, Apr). Best practices for extractables and leachables in orally inhaled and nasal drug products: an overview of the PQRI recommendations [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Pharm Res*, 25(4), 727-739. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9521-z>
- Paskiet, D. et Kiehl, D. (2021). Safety Thresholds and Best Demonstrated Practices for Extractables and Leachables in Parenteral Drug Products (Intravenous, Subcutaneous, and Intramuscular).
- Ponting, D. J. et Foster, R. S. (2023). Drawing a Line: Where Might the Cohort of Concern End? *Organic Process Research & Development*. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.3c00008>
- Pouech, C., Lafay, F., Wiest, L., Baudot, R., Leonard, D. et Cren-Olive, C. (2014, Feb). Monitoring the extraction of additives and additive degradation products from polymer packaging into solutions by multi-residue method including solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Anal Bioanal Chem*, 406(5), 1493-1507. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7551-4>
- Q2(R1), I. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- Q3E, I. (2020). Guideline for Extractables and Leachables.
- Shalliker, R. A. et Guiochon, G. (2009, Jan 30). Understanding the importance of the viscosity contrast between the sample solvent plug and the mobile phase and its potential consequence in two-dimensional high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1216(5), 787-793. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.067>
- Sharma, B., Bader, F., Templeman, T., Lisi, P., Ryan, M. et Heavner, G. (2004, 01/01). Technical investigation into the cause of the increased incidence of anti-body-mediated pure red cell aplasia associated with EPREX®. *European Journal of Hospital Pharmacy*, 5, 86-91.
- Shimadzu. (2023). *Analytical and Measuring Instruments*. Shimadzu. <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/lib/lctalk/35/35lab.html>
- Tang, K., Page, J. S. et Smith, R. D. (2004). Charge Competition and the Linear Dynamic Range of Detection in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 15, 1416-1423.
- ThermoFisher. (2023). *Ionization Methods Overview*. <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology-overview/ionization-source-technology->

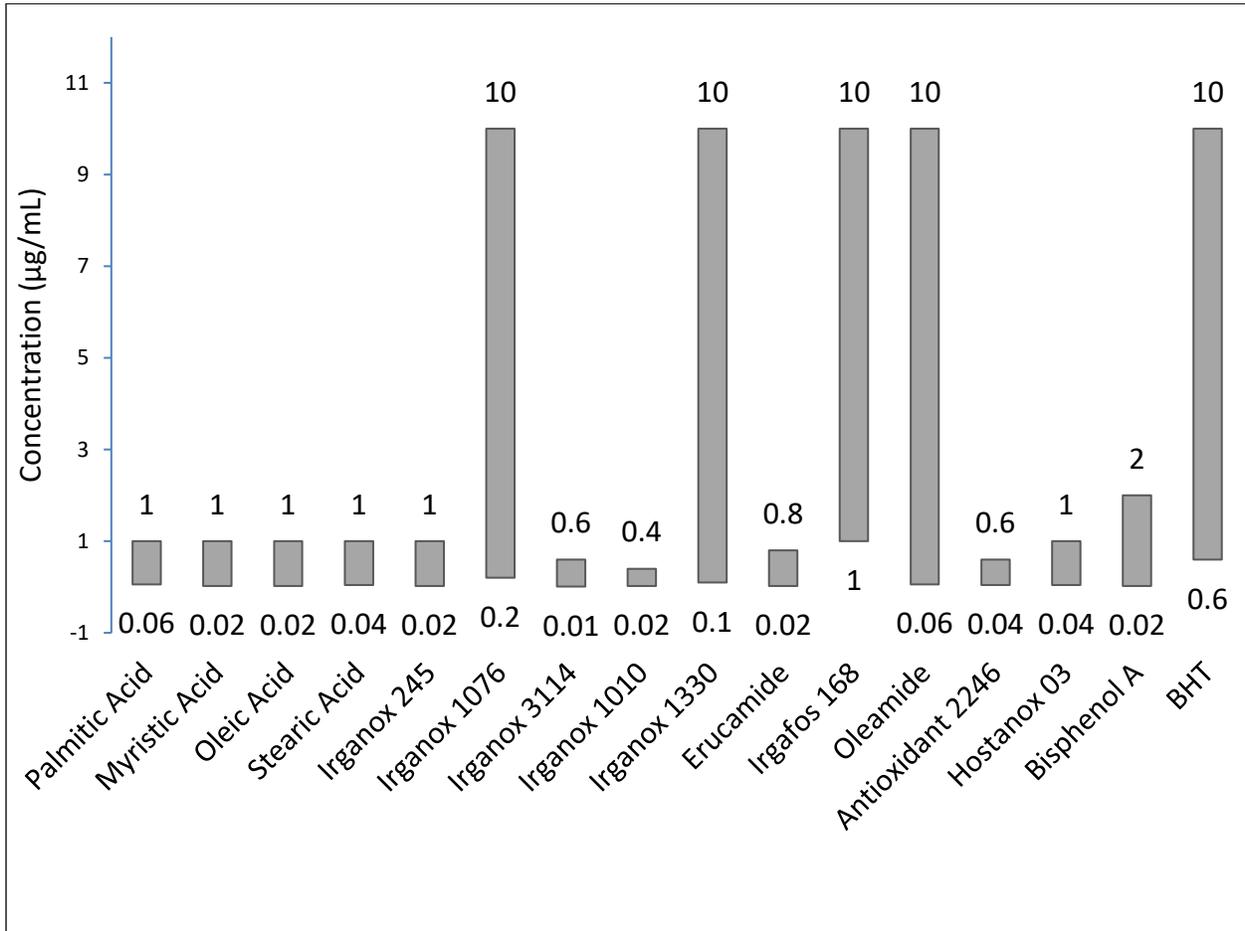
[overview.html#:~:text=ionization%20occurs%20when%20the%20collision,compounds%20using%20mass%20spectral%20libraries.](#)

- Thomas, S., Shandilya, S., Bharati, A., Paul, S. K., Agarwal, A. et Mathela, C. S. (2012). Identification, characterization and quantification of new impurities by LC-ESI/MS/MS and LC-UV methods in rivastigmine tartrate active pharmaceutical ingredient. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 57, 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.08.014>
- Tipler, A. (2014). An Introduction to Headspace Sampling in Gas Chromatography - Fundamentals and Theory. *PerkinElmer*.
- Trier, X., Nielsen, N. J. et Christensen, J. H. (2011, Sep). Structural isomers of polyfluorinated di- and tri-alkylated phosphate ester surfactants present in industrial blends and in microwave popcorn bags [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 18(8), 1422-1432. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0488-2>
- Vera, P., Canellas, E. et Nerin, C. (2018, Oct 1). Identification of non volatile migrant compounds and NIAS in polypropylene films used as food packaging characterized by UPLC-MS/QTOF. *Talanta*, 188, 750-762. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.022>
- Wakankar, A. A., Wang, Y. J., Canova-Davis, E., Ma, S., Schmalzing, D., Grieco, J., Milby, T., Reynolds, T., Mazzarella, K., Hoff, E., Gomez, S. et Martin-Moe, S. (2010, May). On developing a process for conducting extractable-leachable assessment of components used for storage of biopharmaceuticals [Review]. *J Pharm Sci*, 99(5), 2209-2218. <https://doi.org/10.1002/jps.22012>
- Watson, J., Greenough, E. B., Leet, J. E., Ford, M. J., Drexler, D. M., Belcastro, J. V., Herbst, J. J., Chatterjee, M. et Banks, M. (2009, Jun). Extraction, identification, and functional characterization of a bioactive substance from automated compound-handling plastic tips. *J Biomol Screen*, 14(5), 566-572. <https://doi.org/10.1177/1087057109336594>
- Wiesinger, H., Wang, Z. et Hellweg, S. (2021, Jul 6). Deep Dive into Plastic Monomers, Additives, and Processing Aids [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Environ Sci Technol*, 55(13), 9339-9351. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00976>
- Zweiben, C. (2010). Characterization of Extractables and Leachables for Parenteral Drug Products. *Pfizer*.

4.3 Annexes

4.3.1 Annexe A – Développement de méthode

Annexe A.1 – Domaine de linéarité pré-validation de tous les étalons en µg/mL



Annexe A.2 – %REC des échantillons dopés au niveau de concentration des étalons 2, 3 et 4.

	MA	AO2246	BPA	EM	IRG1010	IRG1076	IRG1330	IRG245	IRG3114	PA
Dopé - Étalon 3	6	13	29	3	-1	2	1	9	5	-8
Dopé - Étalon 3	5	13	29	4	-2	2	1	9	5	-8
Dopé - Étalon 3	29	39	43	31	7	12	10	30	22	11
Dopé - Étalon 3	28	39	44	39	14	12	9	30	33	10
Dopé - Étalon 3	30	39	44	30	7	12	10	30	21	12
Dopé - Étalon 3	29	38	43	26	4	11	8	29	17	12
Dopé - Étalon 2	-9	10	27	-9	-4	N/A	1	7	5	-24
Dopé - Étalon 2	-7	10	27	-7	-3	N/A	1	8	7	-25
Dopé - Étalon 2	-8	10	25	-9	-5	N/A	1	7	3	-25
Dopé - Étalon 4	16	19	31	11	0	4	2	12	6	3
Dopé - Étalon 4	15	19	31	17	3	3	3	12	10	4
Dopé - Étalon 4	15	18	30	49	29	3	2	12	43	3

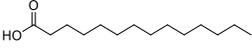
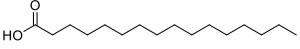
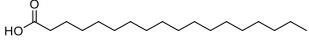
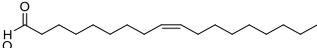
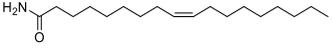
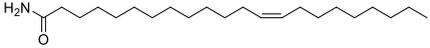
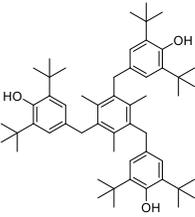
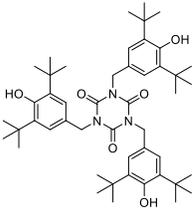
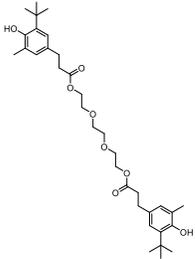
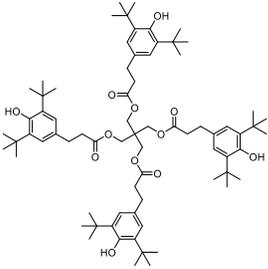
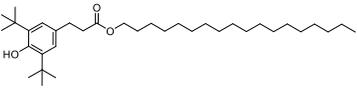
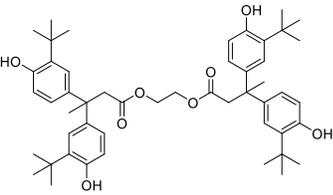
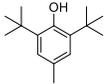
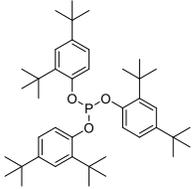
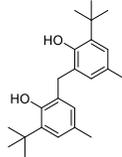
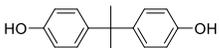
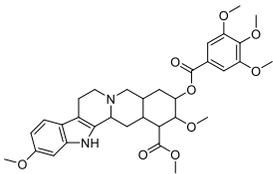
Annexe A.3 – %RSD des échantillons dopés au niveau de concentration des étalons 2, 3 et 4

	MA	AO2246	BPA	EM	IRG1010	IRG1076	IRG1330	IRG245	IRG3114	PA
Dopé - Étalon 2	3	1	4	3	11	N/A	14	6	26	1
Dopé - Étalon 3	26	44	19	32	53	61	62	47	62	21
Dopé - Étalon 4	2	2	2	48	106	6	14	3	99	2

Annexe A.4 – Signal de fond des étalons dans l'échantillon non dopé

	MA	AO2246	BPA	EM	IRG1010	IRG1076	IRG1330	IRG245	IRG3114	PA
Échantillon non-dopé	1.0E+05			2.8E+05	3.9E+04				3.4E+03	1.0E+06

Annexe A.5 – Structure des étalons

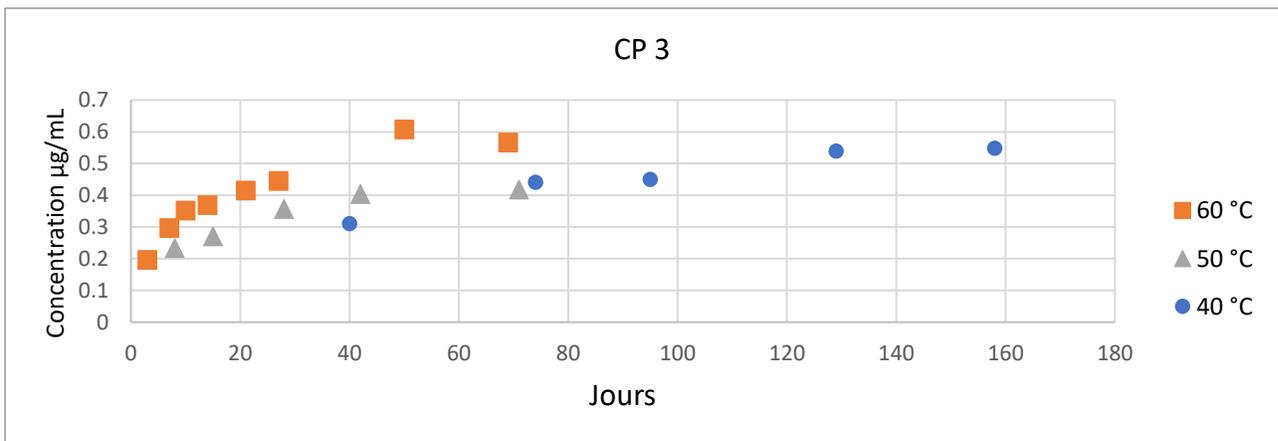
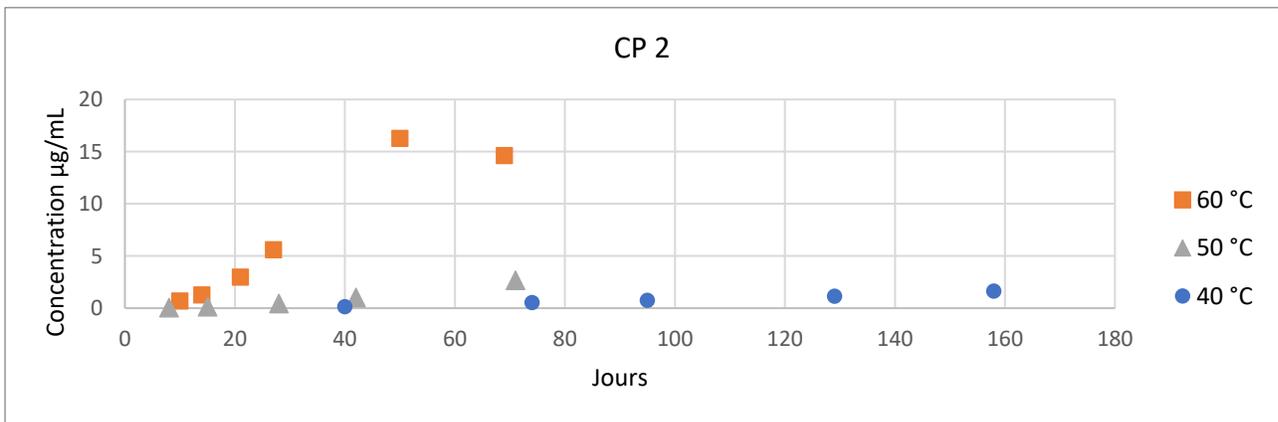
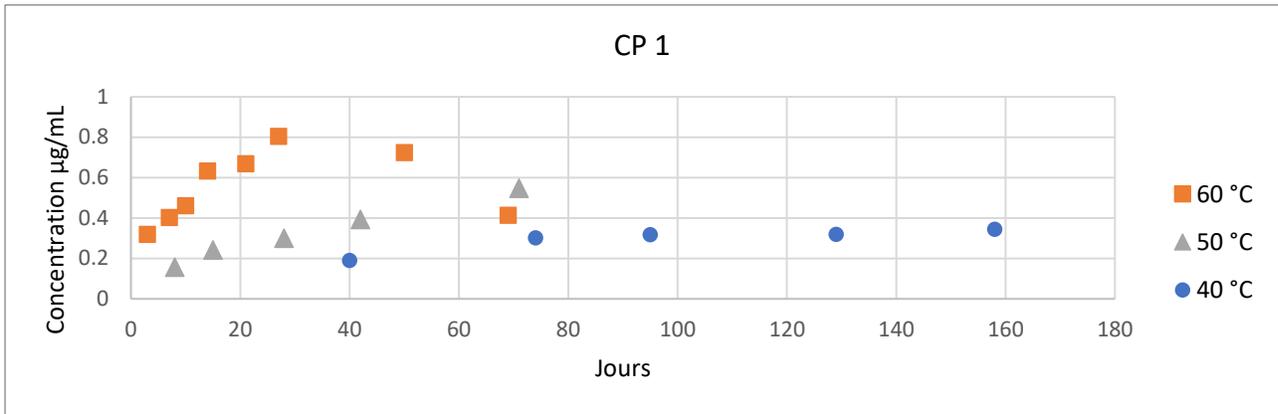
<p>Acide Myristique</p> 	<p>Acide Palmitique</p> 	<p>Acide Stéarique</p> 
<p>Acide Oléique</p> 	<p>Oléamide</p> 	<p>Erucamide</p> 
<p>Irganox 1330</p> 	<p>Irganox 3114</p> 	<p>Irganox 245</p> 
<p>Irganox 1010</p> 	<p>Irganox 1076</p> 	<p>Hostanox 03</p> 
<p>BHT</p> 	<p>Irgafos 168</p> 	<p>Antioxydant 2246</p> 
<p>Bisphenol A</p> 	<p>Résérpine</p> 	

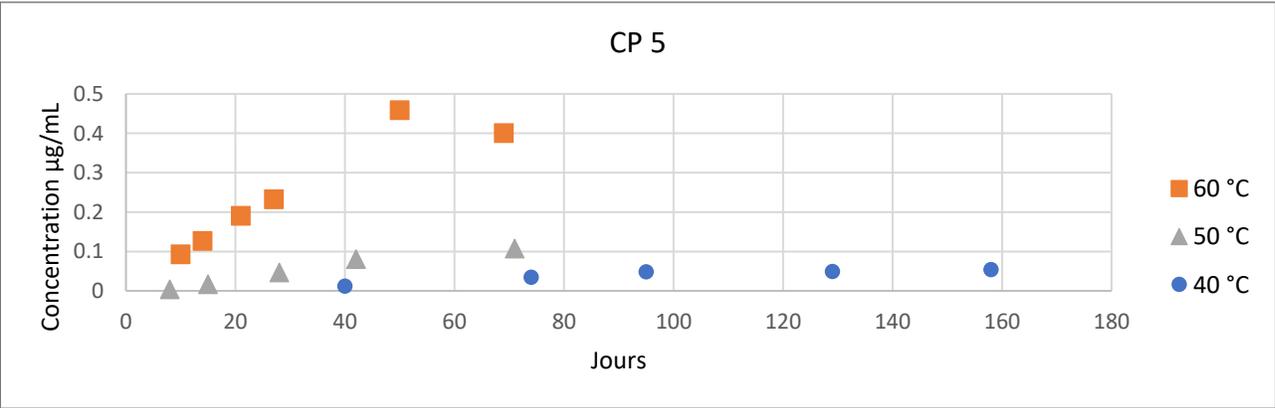
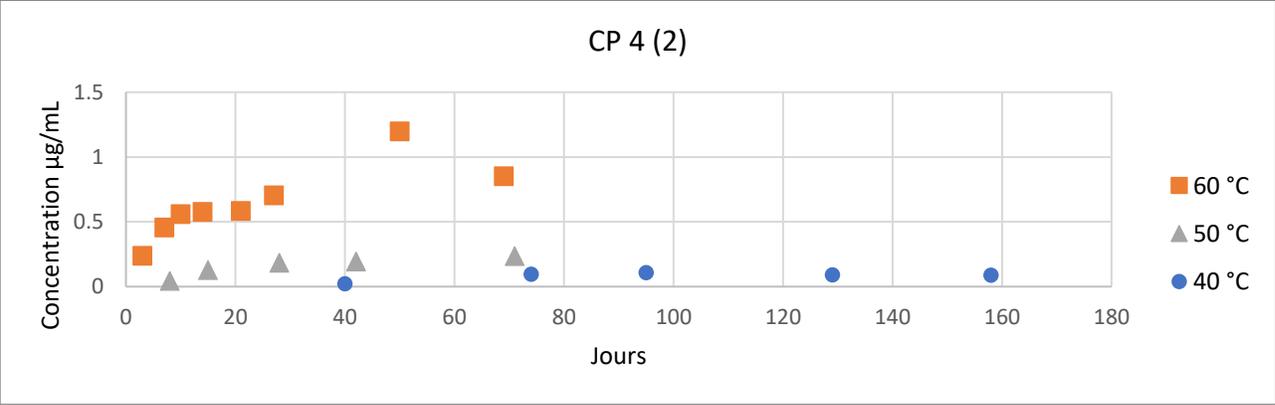
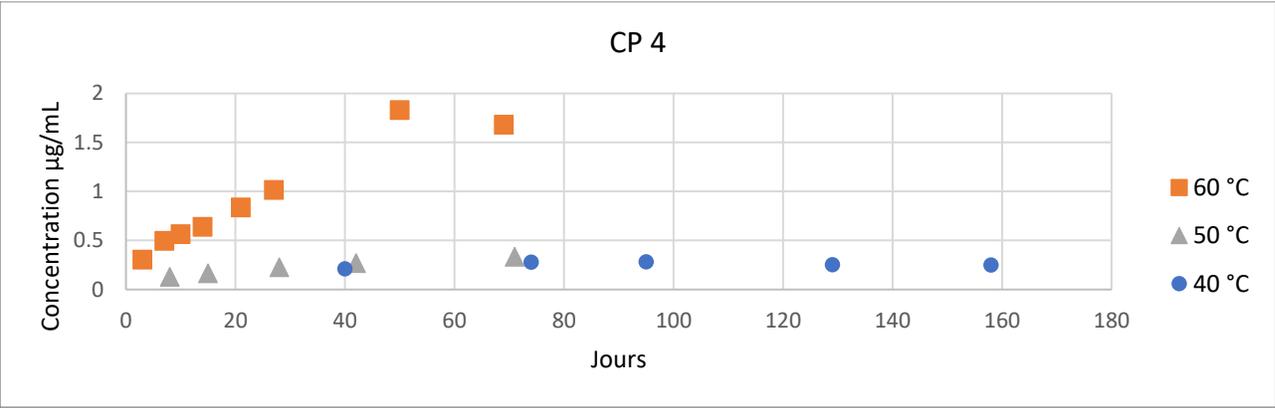
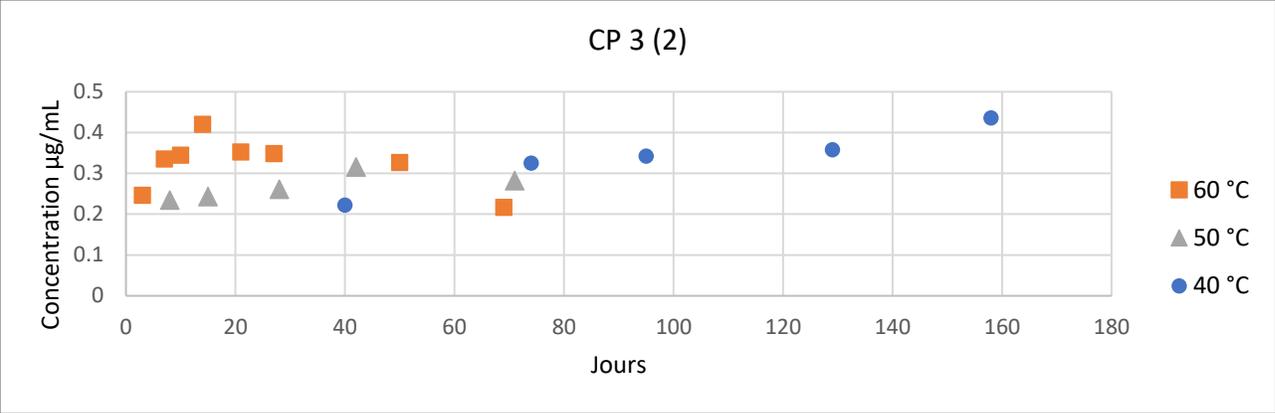
4.3.2 Annexe B – Étude cinétique d'extraction

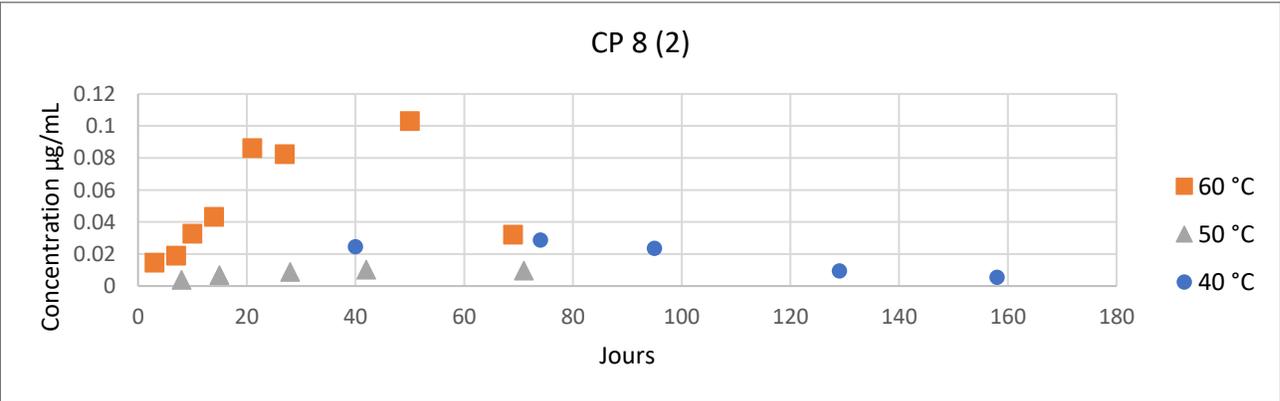
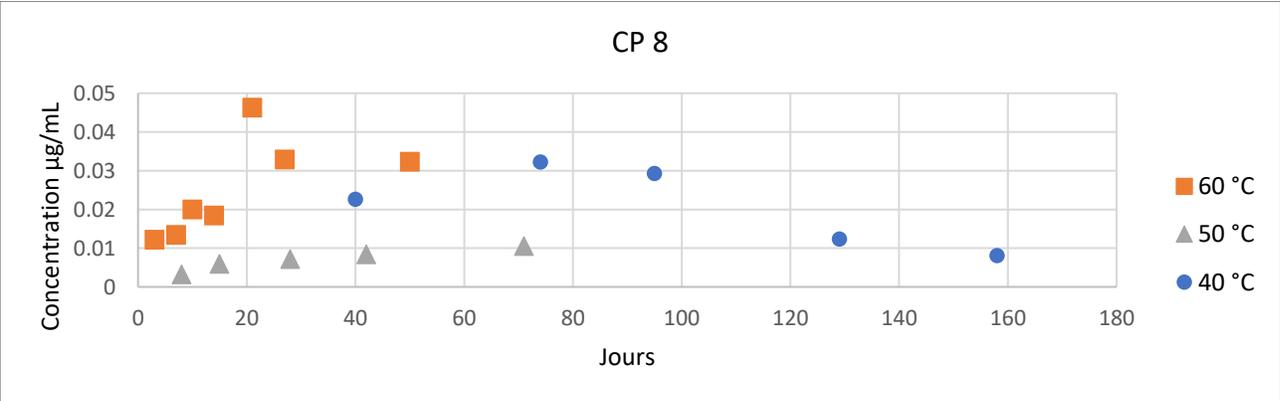
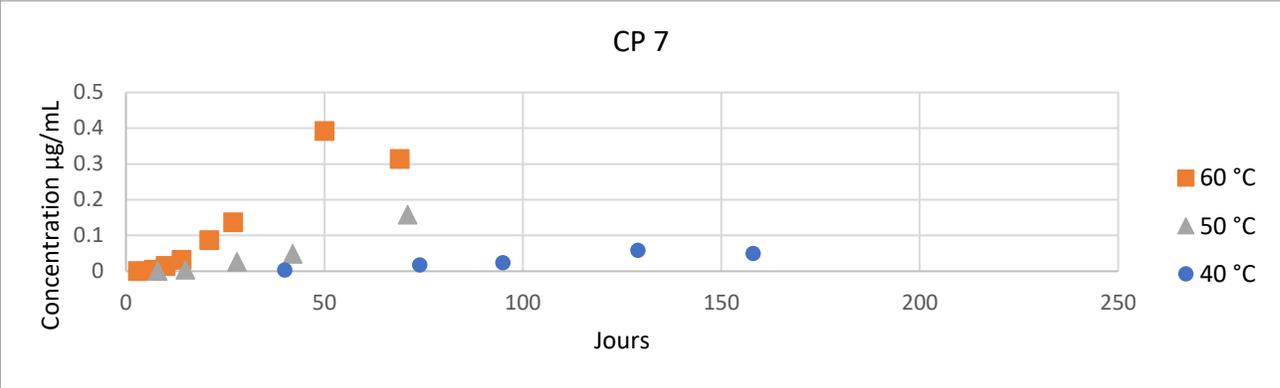
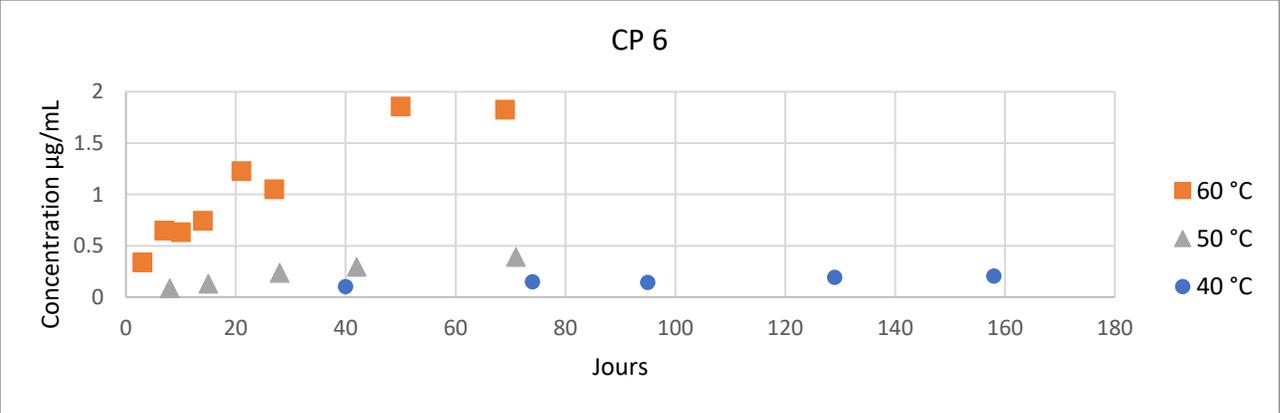
Annexe B.1 – Liste des composés sélectionnés pour l'étude cinétique

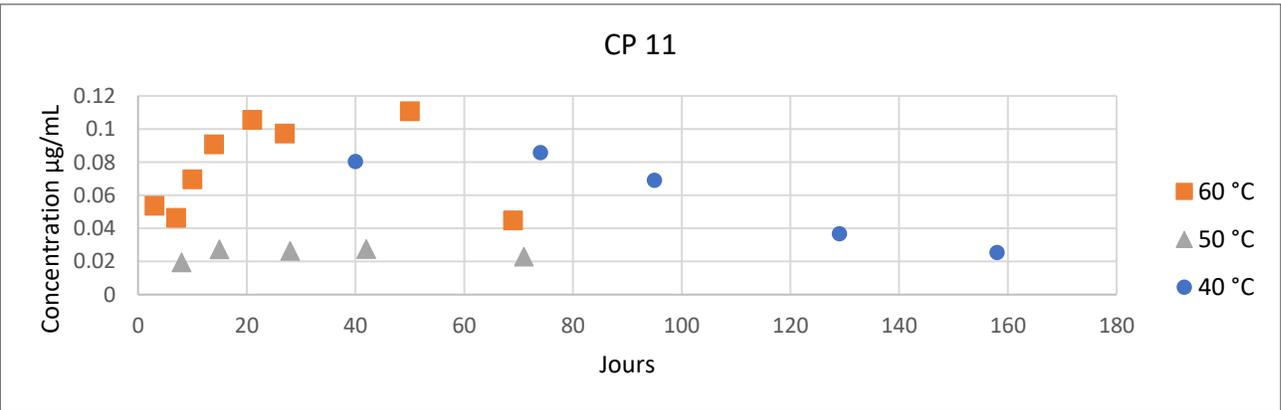
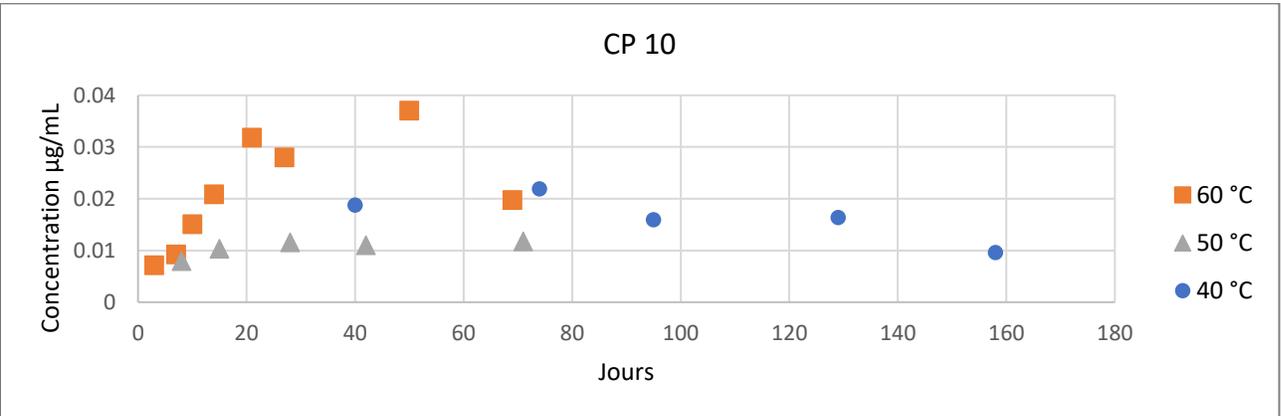
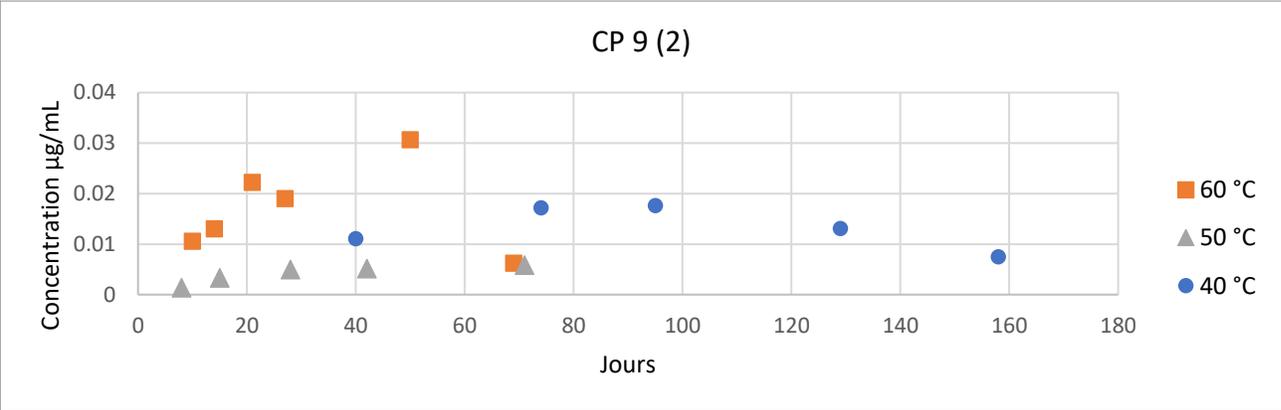
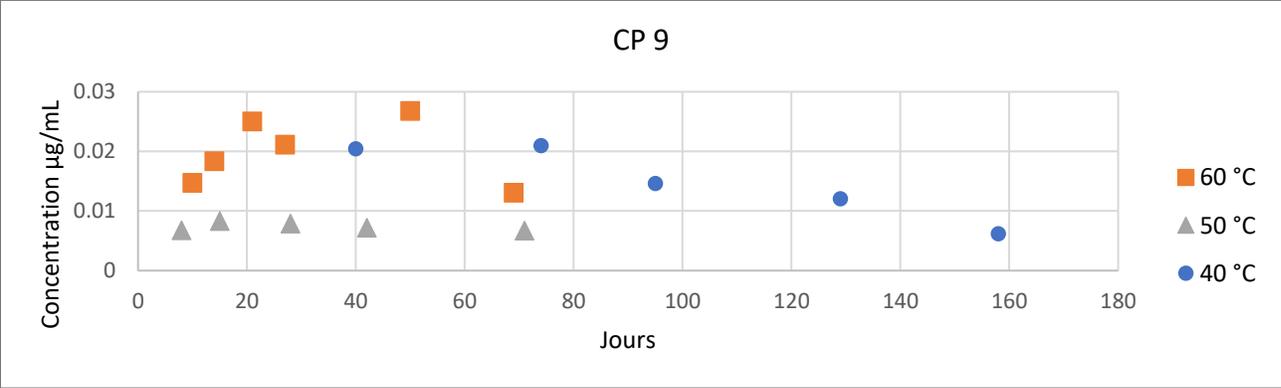
Composé	Mode d'ionisation	Milieu d'extraction	CCS	Formule chimique	Identification partielle
CP1	Négatif	NaOH	HDPE	C11 H15 N3 O3	N/A
CP2	Négatif	NaOH	HDPE	C13 H22 O2	4-tert-butylcyclohexyl acrylate
CP3	Négatif	EtOH	HDPE	C15 H22 O2	2-ethylhexyl benzoate
CP3 (2)	Négatif	NaOH	HDPE	C15 H22 O2	2-ethylhexyl benzoate
CP4	Négatif	EtOH	HDPE	C17 H26 O3	NPE / 4-nonylphenoxyacetic acid
CP4 (2)	Négatif	HCl	HDPE	C17 H26 O3	NPE / 4-nonylphenoxyacetic acid
CP5	Négatif	EtOH	HDPE	C19 H30 O3	N/A
CP6	Négatif	EtOH	HDPE	C39 H60 O8	Diester analog of irganox 1010
CP7	Positif	EtOH	HDPE	C10 H10 O2	1,4-Diacetylbenzene (p-diacetylbenzene)
CP8	Positif	EtOH	PET	C11 H14 O3	Butyl 4-hydroxybenzoate (Butylparaben)
CP8 (2)	Positif	EtOH	HDPE	C11 H14 O3	Butyl 4-hydroxybenzoate (Butylparaben)
CP9	Positif	EtOH	HDPE	C13 H20 O2	Isobornyl acrylate
CP9 (2)	Positif	NaOH	HDPE	C13 H20 O3	Isobornyl acrylate
CP10	Positif	EtOH	HDPE	C15 H24 O2	3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl alcohol
CP11	Positif	EtOH	HDPE	C15 H26 O	N/A
CP12	Positif	EtOH	HDPE	C16 H28 O	N/A
CP13	Positif	EtOH	HDPE	C17 H24 O3	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,6)deca-6,9-diene-2,8-dione
CP14	Positif	EtOH	HDPE	C17 H26 O3	NPE / 4-nonylphenoxyacetic acid
CP14 (2)	Positif	HCl	HDPE	C17 H26 O4	NPE / 4-nonylphenoxyacetic acid
CP15	Positif	NaOH	HDPE	C17 H26 O4	N/A
CP16	Positif	EtOH	HDPE	C17 H26 O5	N/A
CP16 (2)	Positif	HCl	HDPE	C17 H26 O6	N/A
CP17	Positif	EtOH	HDPE	C17 H28 O	N/A
CP18	Positif	EtOH	HDPE	C17 H30 O	N/A
CP19	Positif	EtOH	PET	C18 H11 N O3	N/A
CP20	Positif	EtOH	HDPE	C19 H30 O5	Dodecyl 3,4,5-trihydroxybenzoate
CP21	Positif	EtOH	HDPE	C31 H44 O8	N/A
CP22	Positif	EtOH	HDPE	C56 H84 O10	Triester analog of irganox 1010

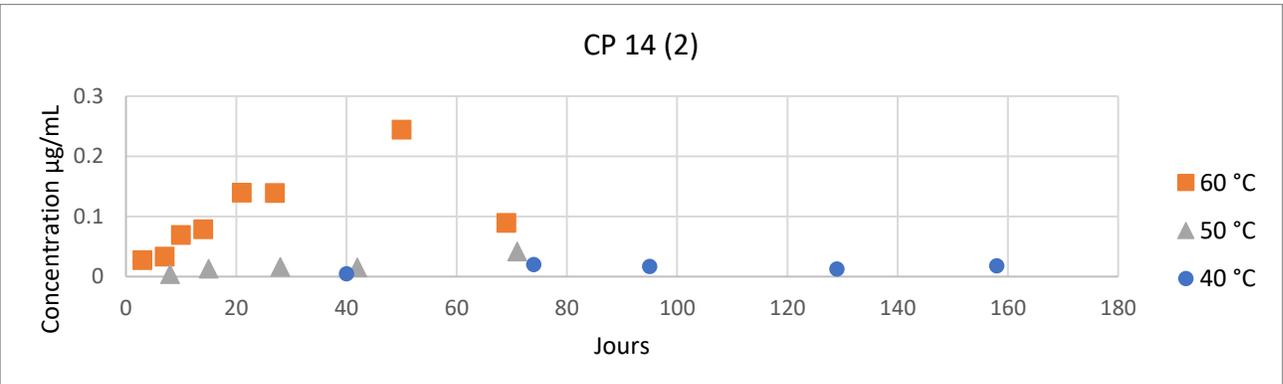
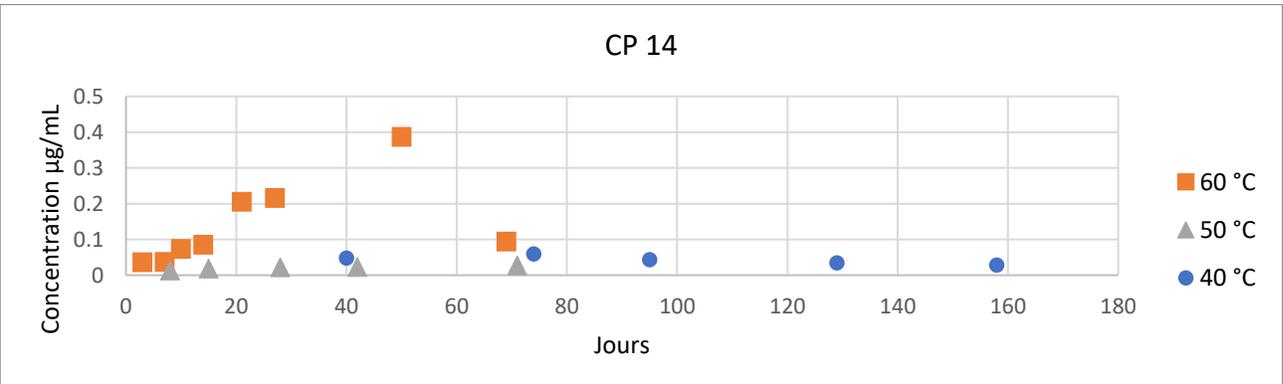
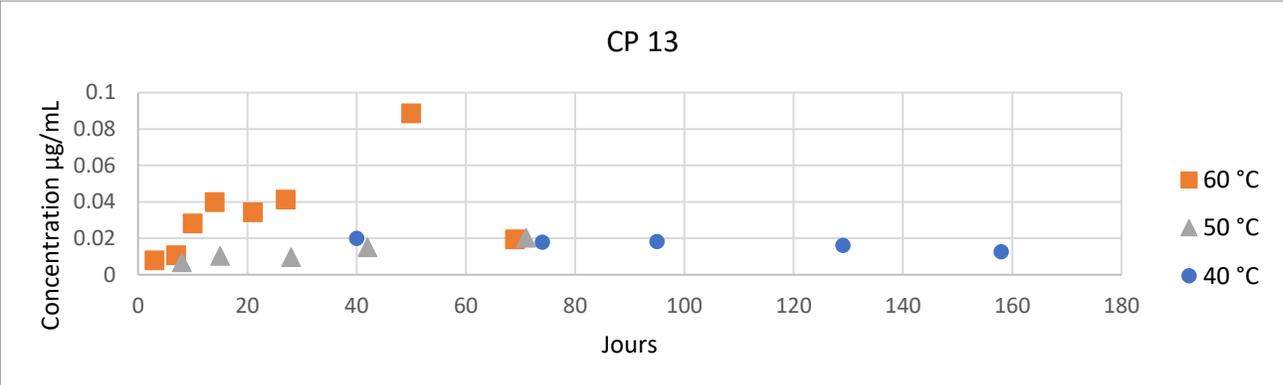
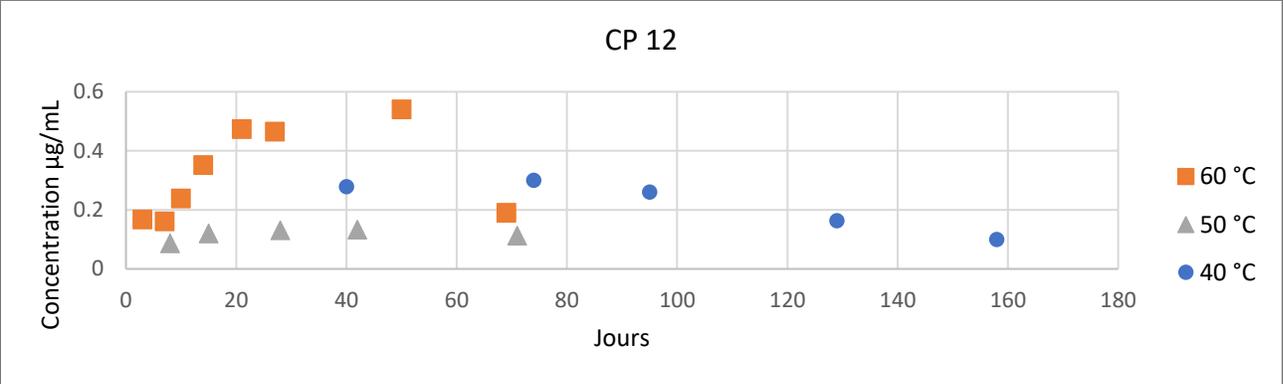
Annexe B.2 – Figures des profils cinétique d'extraction de chaque composé retenu dans l'étude Slimstats

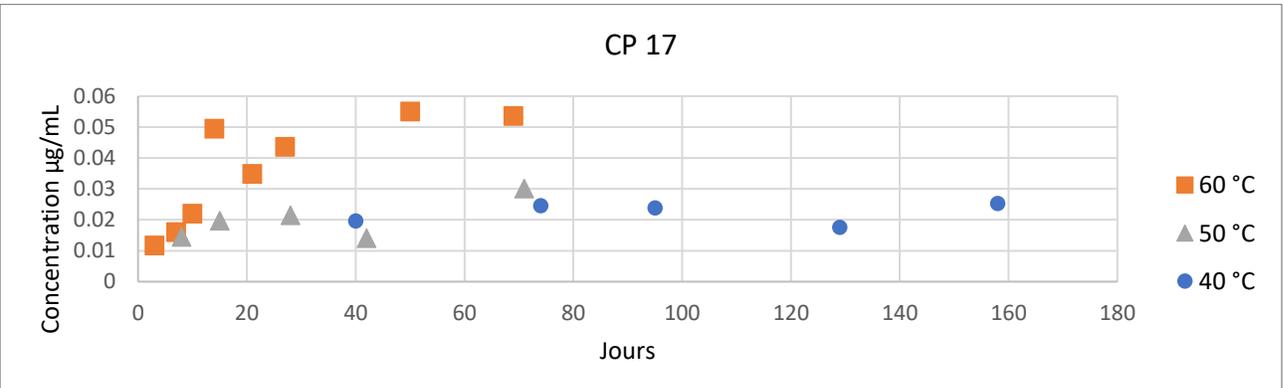
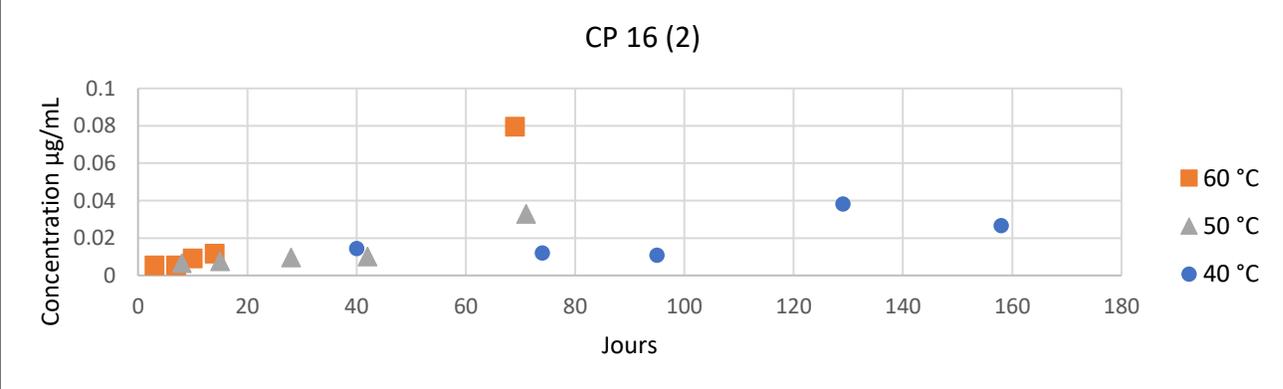
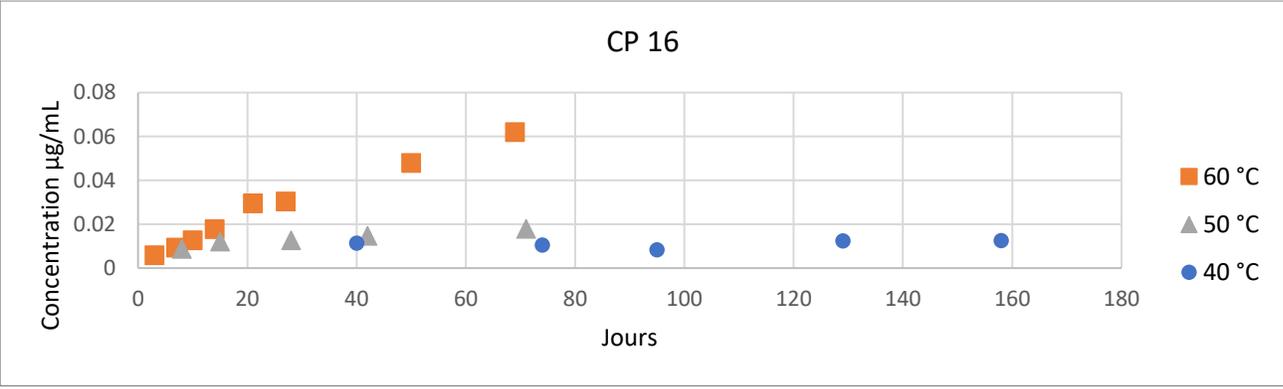
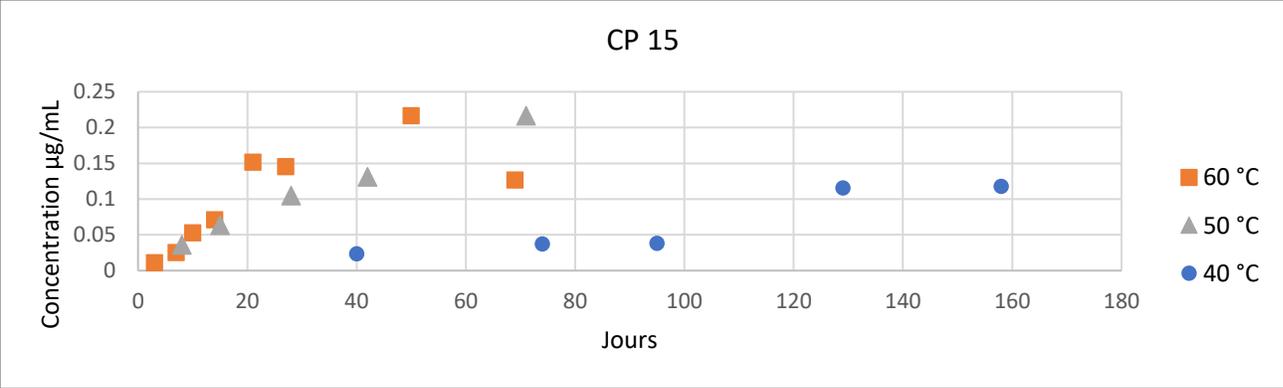


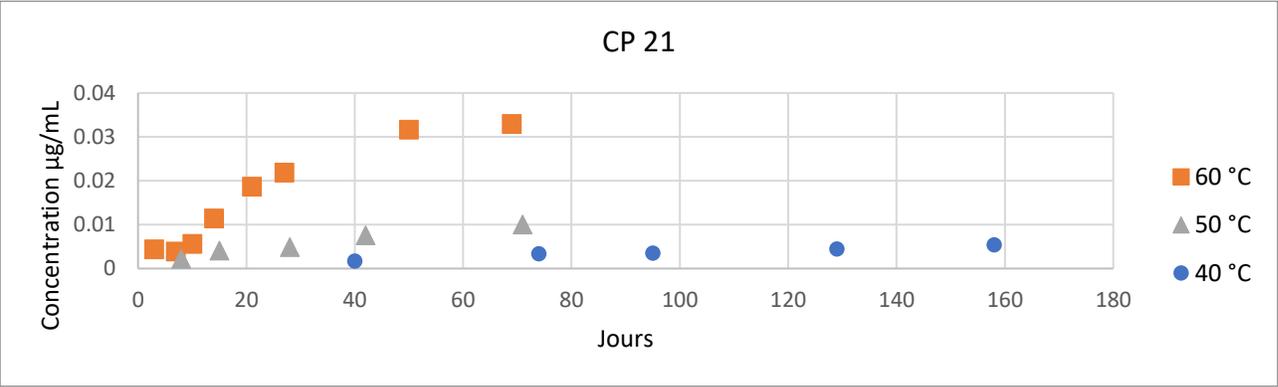
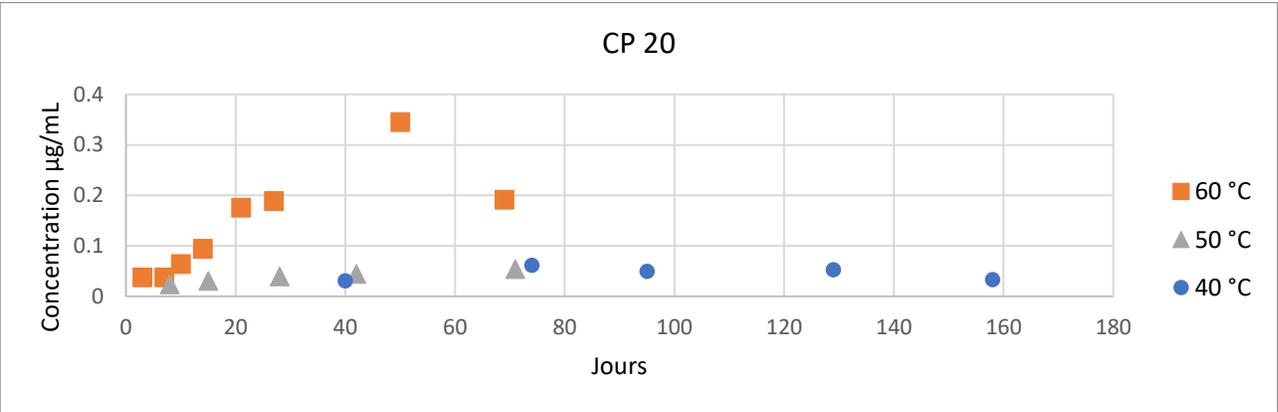
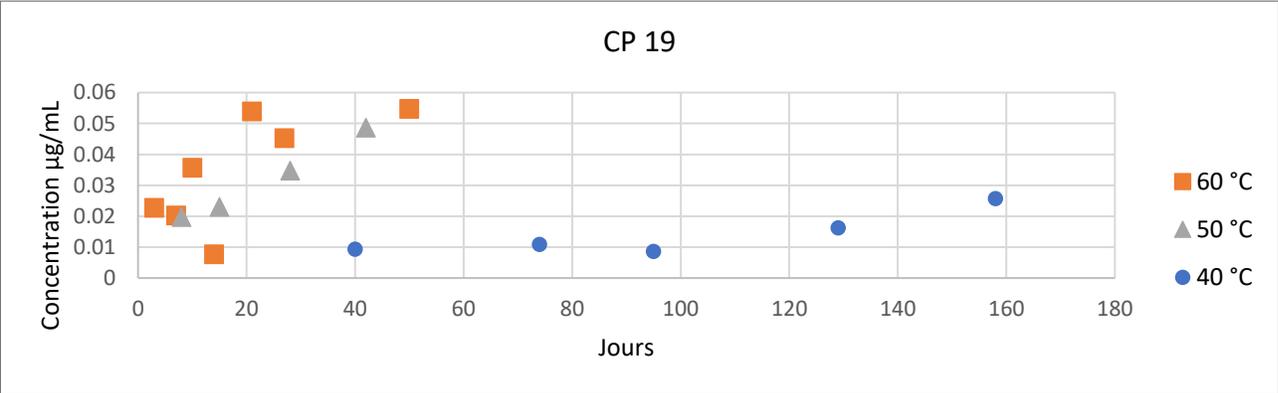
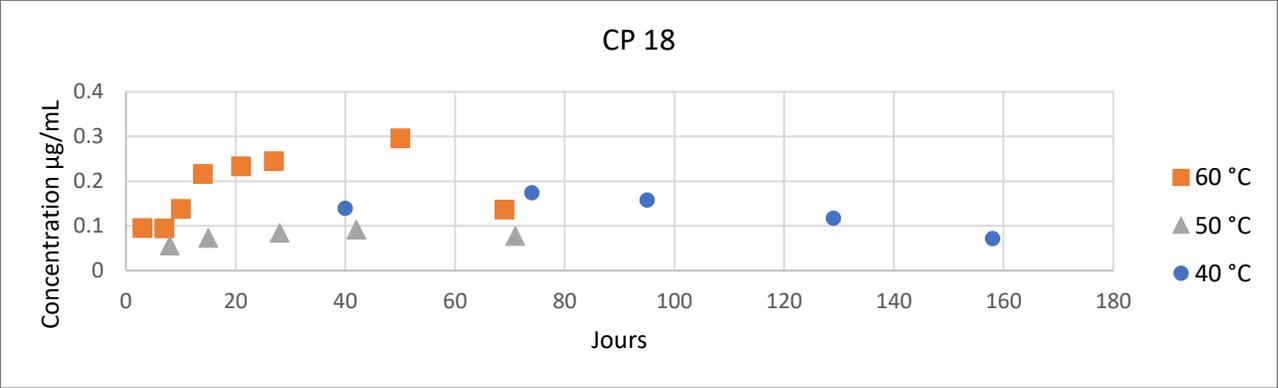


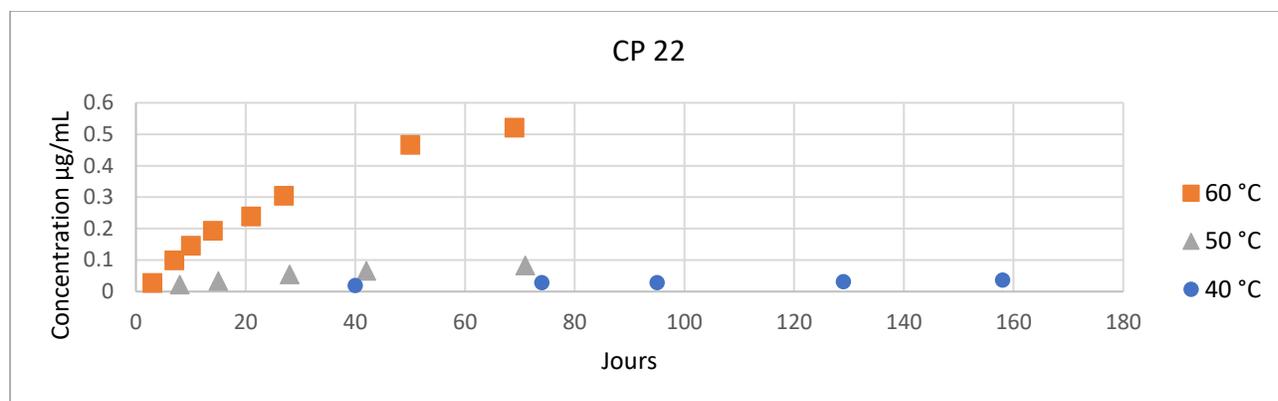












Annexe B.3 – Tableau répertoriant les valeurs de Slimstats soit l'énergie d'activation, le facteur de collision et le coefficient de corrélation.

Composé	Facteur de collision, A	Énergie d'activation, E _a (J/mol)	Coefficient de corrélation, R ²
CP1	1.08192x10 ²¹	129032.636	94.18665
CP2	1.27001x10 ³³	211292.390	89.94331
CP3 (2)	1.13435x10 ¹⁷	102061.539	90.09870
CP3	7.40440x10 ⁸	52123.990	87.75178
CP4 (2)	6.78152x10 ³⁰	192865.746	90.05441
CP4	1.46481x10 ²⁶	163815.444	92.15262
CP5	2.96554x10 ²⁶	167095.494	99.84687
CP6	9.88098x10 ²⁹	188185.098	91.68920
CP7	2.75153x10 ²⁵	162276.798	91.26198
CP9 (2)	8.02310x10 ²³	149825.864	97.79732
CP14 (2)	1.58522x10 ³⁵	222128.671	98.65804
CP14	5.84452x10 ³³	213557.716	98.78584
CP15	1.08088x10 ⁴	23583.291	97.73905
CP16	1.86660x10 ¹¹	70047.637	97.19785
CP17	1.48069x10 ¹⁰	61218.918	91.88755
CP20	9.06035x10 ¹⁹	125546.599	99.37248
CP21	1.22610x10 ¹⁹	119609.306	98.01171
CP22	3.19814x10 ²⁶	166848.611	99.09440