

III .1 Optimisation les conditions opératoires :

- Choix de la longueur d'onde par UV-PDA:

Les spectres d'absorption en UV-PDA des deux standards de référence (principe actif et le conservateur) sont illustrés dans les figures 4 et 5.

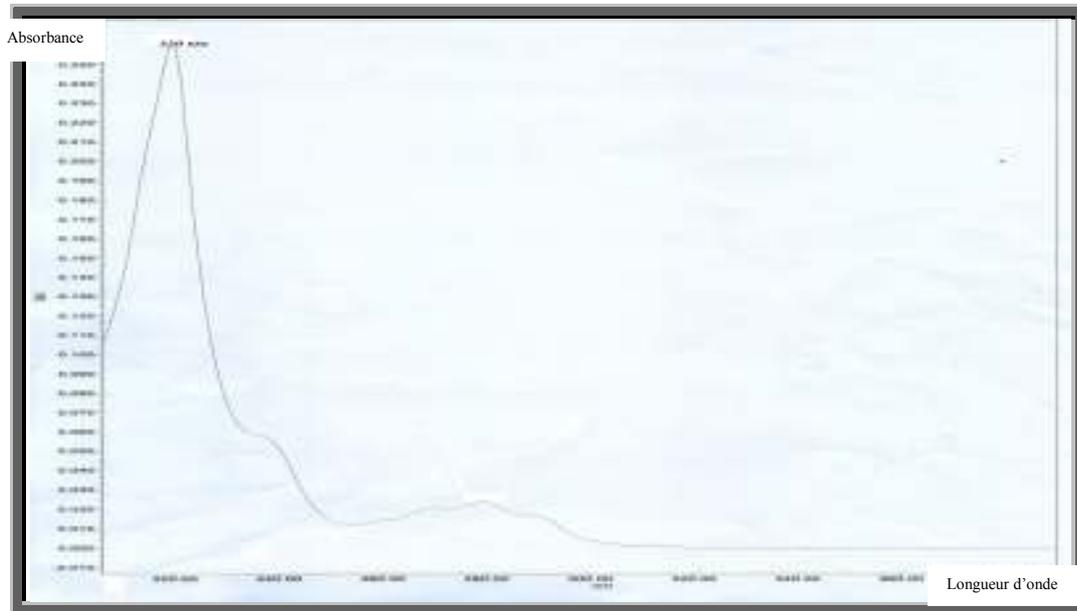


Figure 4 : Spectre d'adsorption U.V-PDA visible du principe actif

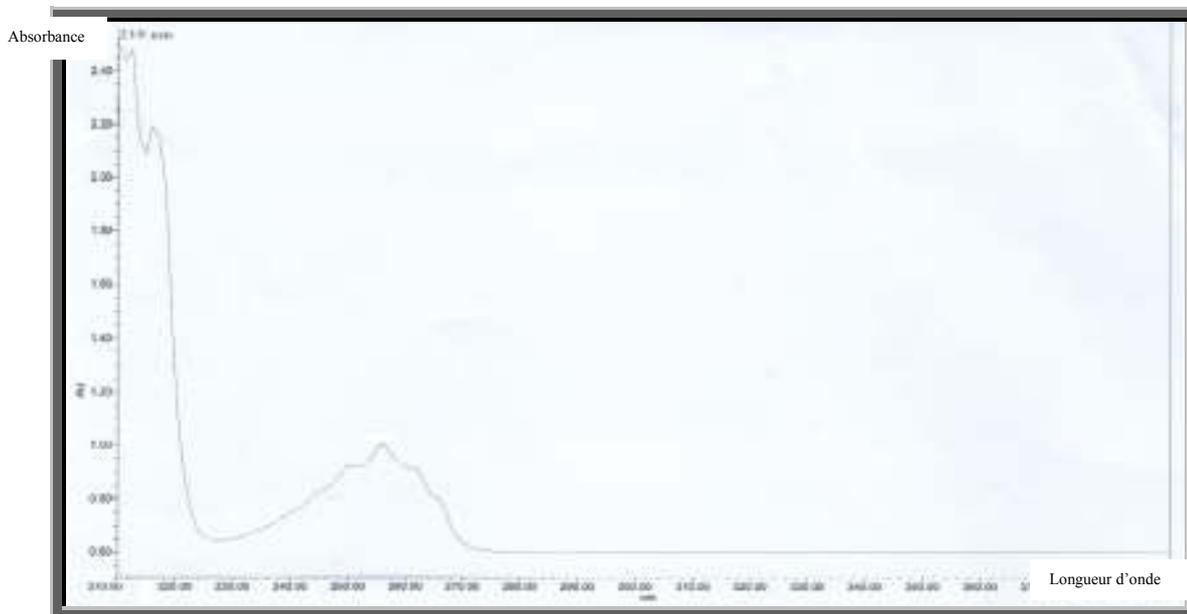
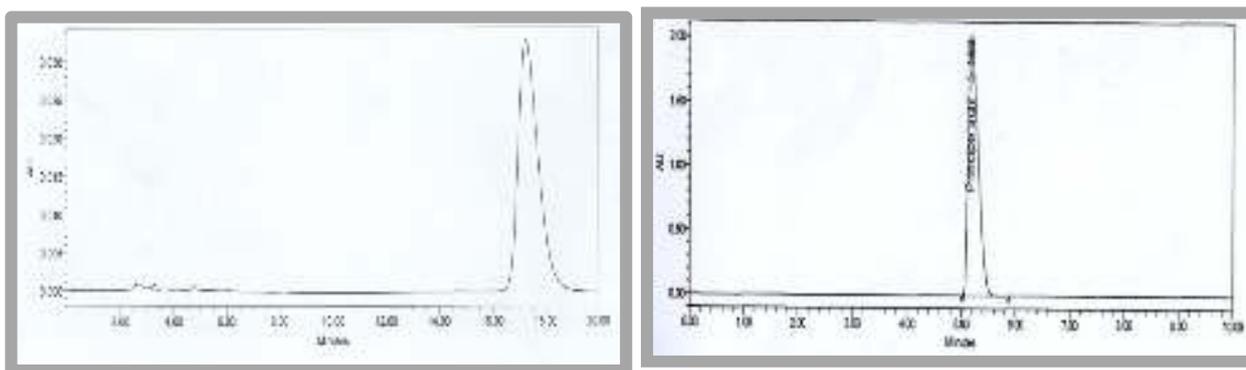


Figure 5 : Spectre d'adsorption U.V-PDA du conservateur

D'après les deux figures, nous remarquons que le principe actif absorbe à une longueur d'onde maximale de 220nm, alors que le conservateur à une longueur d'onde maximale de 210nm.

- choix de débit:

Les résultats obtenus des deux débits sont illustrés dans les figures a et b



a- Débit 0.4 ml/min

b- Débit 1 ml/min

Figure 06 : Chromatogrammes à débit 1 et 0.4 ml/min

D'après les deux figures ci-dessus nous remarquons que travailler à un débit de 0.4 ml/min le pic apparaît à un temps de rétention 18 min alors qu'avec un débit de 1 ml/min le temps de rétention est réduit à 6 min, donc à un débit de 1 ml/min nous enregistrons un gain de temps appréciable qui permet de réduire le temps d'analyse.

III .2 Validation analytique de la méthode de dosage simultané du principe actif et du conservateur:

La validation d'une méthode de dosage se fait par l'intermédiaire de critères de validation qui sont dans l'ordre suivant: la spécificité, la linéarité, la fidélité, l'exactitude, robustesse, stabilité des solutions, l'étude de la performance de ces critères se fait sur la base d'un support permettant à tout analyste une réflexion sur les méthodes statistiques. **(rapport d'une commission SFSTP, 1992)**

Un traitement statistique est réalisé à l'aide d'une feuille de calcul développée et validée par Biopharm permettant d'effectuer des tests statistiques pour calculer: la linéarité, la fidélité, l'exactitude, la stabilité des solutions et la robustesse.

III.2.1. Evaluation de la conformité du système:

La conformité du système renseigne sur l'aptitude du système à effectuer l'analyse suivant des critères préétablis.

Elle est démontrée en analysant 06 fois la solution standard.

Elle est évaluée par les paramètres suivants :

- Écart type relatif du signal pour les 06 injections de la solution standard (Relatif standard déviation : RSD), moyenne et écart type.
 - Le nombre de plateaux théoriques.
 - Le facteur de similarité.
- **Calcul du facteur de similarité:**

Après injections des deux standards afin de calculer le facteur de similarité pour vérifier que nos préparations ou les analyses ont été faites de la même manière avec les mêmes conditions d'application donc elles doivent donner des résultats dont l'intervalle de norme de facteur de similarité soit entre 98 % et 102 %

$$\text{Facteur de similarité de PA} = \frac{1272511}{1272505} \times \frac{99.83}{100} \times 100 = 100 \%$$

$$\text{Facteur de similarité de Conservateur} = \frac{391477}{390342} \times \frac{98.00}{98.81} \times 100 = 99 \%$$

Les facteurs de similarité de principe actif et de conservateur sont compris entre 98 % et 102 %, ce qu'il indique que la manipulation durant l'analyse était bien faite.

➤ **Résultat de répétabilité des injections:**

Après avoir injecté 6 fois la solution standard, nous avons obtenu les résultats et les chromatogrammes représentés sur les tableaux (XII, XIII) ci-après.

a) *Principe actif:*

Les aires de pic et RSD % des injections du standard à 220 nm sont représentés dans le tableau XII :

Tableau XII : Résultats sur la Répétabilité des Aires du principe actif

Injection	Solution témoin	Aires du pic du principe actif
1	Standard	1270666
2	Standard	1272698
3	Standard	1272290
4	Standard	1272680
5	Standard	1273111
6	Standard	1273584
Moyenne		1272505
RSD %		0,1
Norme		≤ 2,0 %

b) Le conservateur:

Les aires de pic et RSD % des injections du standard à 210 nm sont représentés dans le tableau XIII:

Tableau XIII: Résultats sur la répétabilité des aires du conservateur

Injection	Solution témoin	Aires du pic du conservateur
1	Standard	399359
2	Standard	401510
3	Standard	399970
4	Standard	399809
5	Standard	400211
6	Standard	399406
Moyenne		400044
RSD %		0,2
Norme		≤ 2,0 %

➤ **Résultats récapitulatifs de la répétabilité des injections:**

Les résultats obtenus de l'injection de principe actif et conservateur sont représentées dans le tableau XIV.

Tableau XIV: Résultats récapitulatifs de la répétabilité des injections

Paramètre de validation	Résultats	Critères d'acceptation
Conformité du système		
RSD des aires du standard		
Principe actif	0,1 %	Le % RSD des aires des 6 injections de la solution standard doit être ≤ 2,0 %
Conservateur	0,2 %	

Chapitre III : Résultats et discussion

Le standard de déviation relatif (RSD %) des aires des 6 injections de principe actif est de 0.1 % et de conservateur est de 0.2 % sachant qu'ils sont inférieurs à la limite d'acceptation, cela confirme l'aptitude du système à donner des résultats répétables pour le dosage du principe actif et du conservateur.

➤ **Résultat de vérification de la performance de la colonne:**

Les résultats de conformité de système sont obtenus et représentés dans la figure 07 et dans le tableau XV.

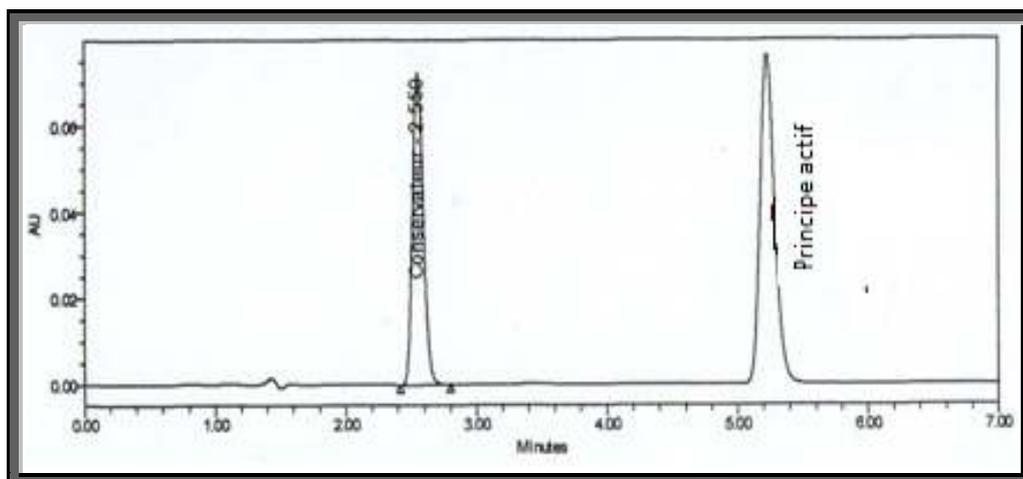


Figure 07 : Chromatogramme de la conformité de système

Tableau XV: Résultats récapitulatif des paramètres de performance de la colonne

Paramètre de validation	Résultats	Critères d'acceptation
Nombre de plateaux théoriques		
Principe actif	$1,2 \cdot 10^4$	En analyse de routine il est exigé que les valeurs pour ce paramètre doivent être $\geq 50\%$ de celle trouvée durant la validation analytique
Conservateur	$5,31 \cdot 10^3$	
Facteur de symétrie		
Principe actif	1,2	Le facteur de symétrie doit être compris entre 0,8 à 1,5
Conservateur	1,1	
La résolution		
Principe actif et Conservateur	2.85	$\geq 2\%$

Les résultats des trois critères étudiés à savoir le nombre de plateaux théorique, le facteur de symétrie et la résolution pour le principe actif et le conservateur sont indiqués au Tableau XVI

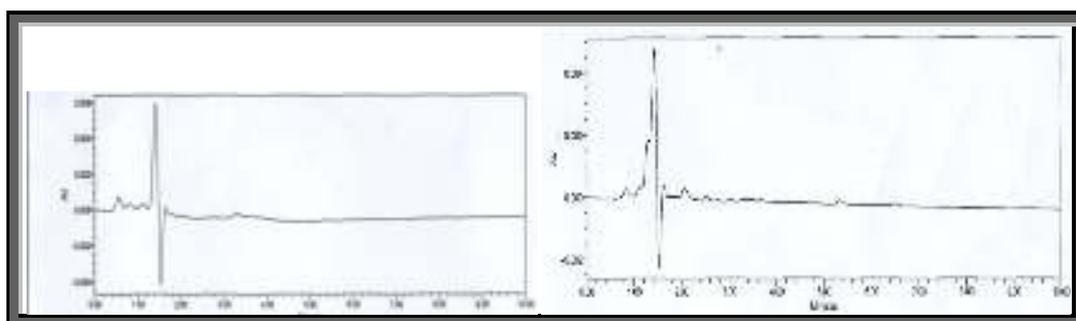
le facteur de symétrie est compris entre 0,8 à 1,5 et la résolution est \geq à 2 % .donc la colonne présente des performances satisfaisantes.

Les résultats obtenus répondent aux critères d'acceptation ce qui implique que le système est conforme, apte à effectuer les analyses.

III.2.2 Spécificité:

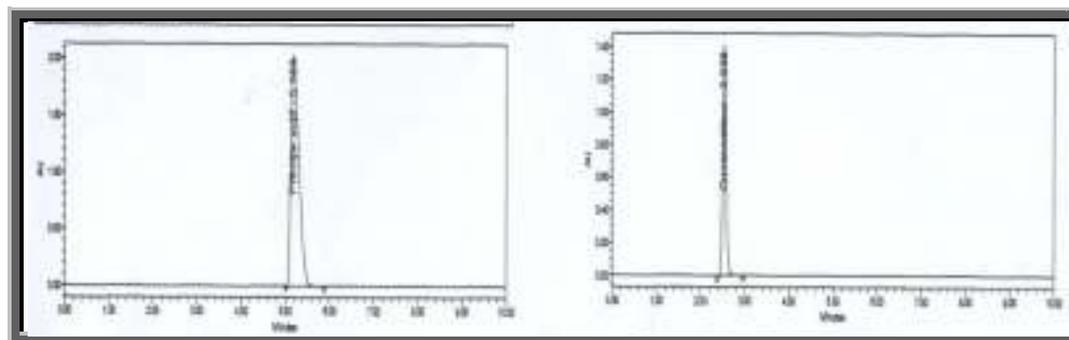
La spécificité de la méthode du dosage est mise en évidence par deux préparations de standards, l'une contenant le principe actif (PA) et l'autre le conservateur (excipient), d'un blanc (phase mobile) ainsi qu'un placebo contenant tous les excipients et ne contenant pas le principe actif et le conservateur, les résultats sont représentés ci-après dans les chromatogrammes de la figure 08.

Les résultats sont représentés ci-après dans les chromatogrammes de figure 8



A : Chromatogramme de Placébo

B : Chromatogramme de phase mobile



C : Chromatogramme de PA

D : Chromatogramme de conservateur

Figure 8 : Chromatogrammes pour l'étude la spécificité de la méthode

Les chromatogrammes des standards présentent un pic du conservateur dont le temps de rétention est de 2,536 min et un pic du principe actif à 5,183 min, nous observons qu'il n'y a aucun pic au temps de rétention (5,183 et 2,536) dans le placebo et le blanc , donc il n'y a

pas d'interférence aux temps de rétention des pics dues au principe actif et au conservateur ceci prouve que la méthode du dosage est spécifique au principe actif .

L'absence d'interférence du placebo, prouve la spécificité de la méthode de dosage de l'analyte étudié.

III.2.3 Linéarité et intervalle de mesure :

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité (dans l'intervalle étudié) d'obtenir les résultats d'essai qui sont directement proportionnels à la concentration (quantité) de l'analyte dans l'échantillon.

L'intervalle de mesure d'une procédure analytique est l'intervalle entre la concentration supérieure et inférieure de l'analyte dans l'échantillon pour lequel il a été démontré que la procédure analytique présente un niveau souhaitable de fidélité, d'exactitude et de linéarité.

Il est couvert par une série de cinq concentrations minimum, régulièrement espacées et positionnées autour de 100% (80%, 90%, 100%, 110%, 120% de la concentration théorique). (**Rapport de commission SFSTP, 1992**)

Dans notre méthode étudiée la linéarité se fait à deux niveaux « le Principe actif » et « le conservateur ».

Deux gammes d'étalonnage ont été réalisées, une gamme avec la forme pharmaceutique reconstituée (placébo chargé) et une gamme avec le standard.

Les tableaux (XVI, XVII, XVIII, XX) résument les résultats obtenus pour la gamme standard et la gamme de placebo chargé. Et à partir des données de ces tableaux, on trace pour chacune des deux gammes les droites de régressions linéaires D qui sont représentées par l'équation suivante: $y = a x + b$; soit a la pente des droite D et b leurs ordonnées à l'origine, les droites de régressions sont représentées dans les figures (9,10, 11, 12).

a) Linéarité principe actif:

Deux gammes d'étalonnage ont été réalisées une gamme avec la forme pharmaceutique reconstituée (placébo chargé) et une gamme avec le principe actif.

➤ *Linéarité du principe actif dans le standard :*

Les résultats de la linéarité de principe actif dans le standard sont représentés dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Données brutes de la linéarité de principe actif dans le standard

Niveau de linéarité	Concentration du PA(Xi réel) en %	Moyenne des aires de pic (Y')	moyenne de Biais (%)
80	79,89	1027441,500	99,98
90	90,66	1189419,500	
100	99,33	1270732,000	
110	109,71	1412619,500	
120	120,24	1558381,000	

Le tableau représente les concentrations du principe actif dans le standard de référence et les aires ou surfaces des pics obtenus par HPLC.

Les résultats du tableau, nous ont permis de tracer une droite de régression de la linéarité, en traçant la courbe représentative des surfaces des pics du principe actif dans le standard en fonction de sa concentration. La pente **a**, l'ordonnée à l'origine **b** de la droite ainsi que le coefficient de corrélation R sont calculés et l'équation de la droite de régression est établie (Figure 9).

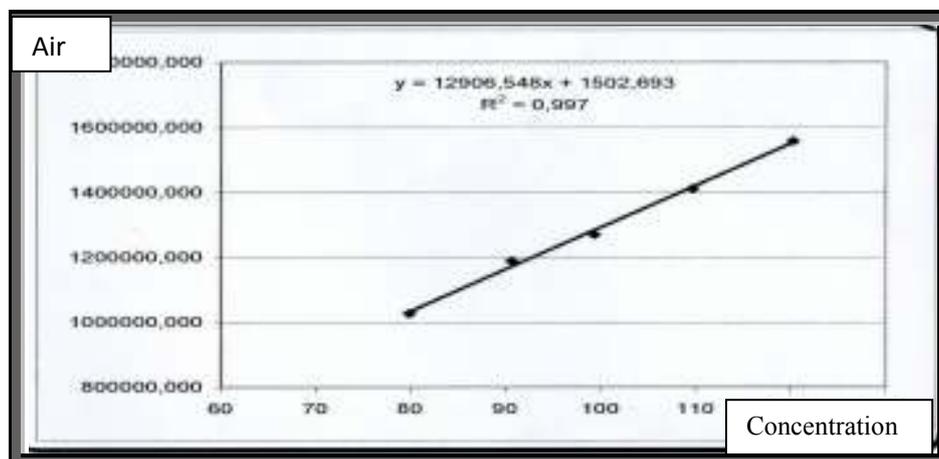


Figure 9: Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte. (Linéarité sur PA)

La courbe obtenue est linéaire et ne passe pas par l'origine $y=12906.548 x +1502.693$.

En utilisant les données de la droite de régression, nous avons calculé le coefficient de corrélation (R) et le coefficient de régression(R^2)

Chapitre III : Résultats et discussion

Le coefficient de corrélation (R) : $R=0.998$

Le coefficient de régression (R^2) : $R^2= 0.997$

➤ *Linéarité du principe actif dans le Placébo chargé:*

Les données de la linéarité du principe actif dans le placebo chargé sont représentées dans le tableau XVII.

Tableau XVII: Données brutes de la linéarité du principe actif dans le Placébo chargé

Niveau de linéarité	Concentration du PA (Xi réel) en %	Moyenne des aires de pic (Y')	moyenne de Biais (%)
80	80,65	1027830,667	98,32
90	91,3	1160120,333	
100	103,9	1323151,000	
110	109,95	1389510,000	
120	122,85	1558151,333	

Le tableau (XVII) présente les concentrations du principe actif dans le placebo chargé et les surface des pics obtenues par HPLC.

Les résultats du tableau (XVII), nous ont permis de tracer une droite de régression de la linéarité, en traçant la courbe représentative des surfaces des pics du principe actif dans le standard en fonction de sa concentration. La pente **a**, l'ordonnée à l'origine **b** de la droite ainsi que le coefficient de corrélation R sont calculés et l'équation de la droite de régression est établie (Figure 10).

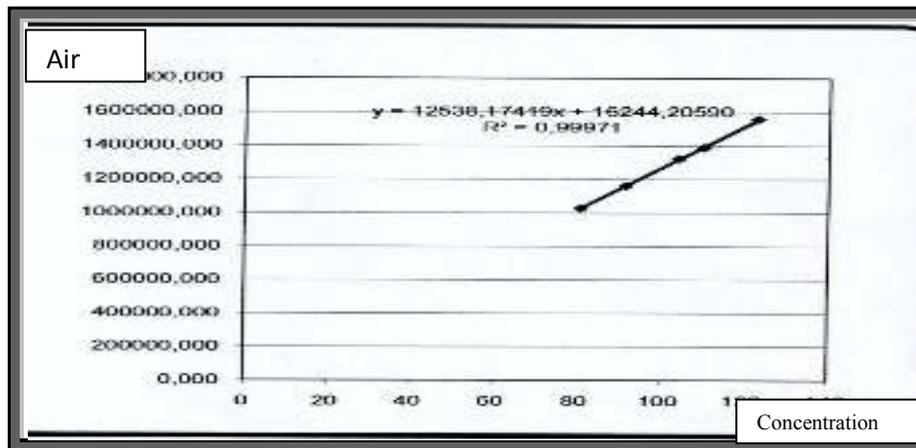


Figure 10 : Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte.
(Linéarité sur placebo chargé)

La courbe obtenue est linéaire et ne passe pas par l'origine, $y=12538,17419 x+16244,20590$.en utilisant les données de la droite de régression, nous avons calculé le coefficient de corrélation (R) et le coefficient de régression.

Le coefficient de corrélation (R): $R=0,999$

Le coefficient de régression (R^2): $R^2=0,999$

Tableau XVIII: Tableau récapitulatif des résultats des Paramètres des droites de régressions

Paramètres	PA	Placébo chargée
Pente	12906,548	12538 ,17419
L'ordonnée à l'origine	1502,693	16244,2059
Coefficient de corrélation (r)	0,998	0.999
Coefficient de régression (r^2)	0,997	0.999
Biais moyen (%)	99.98	98.32

Les courbes illustrées par les figures N° 9 et 10 montrent une linéarité des données, marquée par un bon ajustement des valeurs avec la droite, ceci est prouvé par les coefficients de corrélation de principe actif 0,998 et placebo chargé 0.999 qui sont proche de 1, ce qui permet de déduire que le modèle linéaire est acceptable.

Le biais moyen est compris entre 95,0 % et 105,0 % ; ce qui permet de dire que les paramètres sont satisfaisantes.

b) Linéarité sur le conservateur :

Deux gammes d'étalonnage ont été réalisées une gamme avec la forme pharmaceutique reconstituée (placébo chargé) et une gamme avec le conservateur.

➤ *Gamme de linéarité sur le Standard conservateur :*

Toutes les données de la linéarité du principe actif dans le standard sont regroupées dans le tableau XIX.

Tableau XIX: Données brutes de la linéarité du conservateur dans le standard

Niveau de linéarité	Concentration du PA (Xi réel) en %	Moyenne des aires de pic (Y')	moyenne de Biais (%)
20	19,24	79078,000	100,25
50	51,84	206137,000	
80	80,82	323109,000	
100	102,48	410893,000	
140	144,13	578445,500	

Le tableau (XIX) présente les concentrations du conservateur dans le standard de référence et les aires ou surfaces des pics obtenues par HPLC.

Les résultats du tableau (XIX), nous ont permis de tracer une droite de régression de la linéarité, en traçant la courbe représentative des surfaces des pics du principe actif dans le standard en fonction de sa concentration. La pente **a**, l'ordonnée à l'origine **b** de la droite ainsi que le coefficient de corrélation R sont calculés et l'équation de la droite de régression est établie. (figure 11).

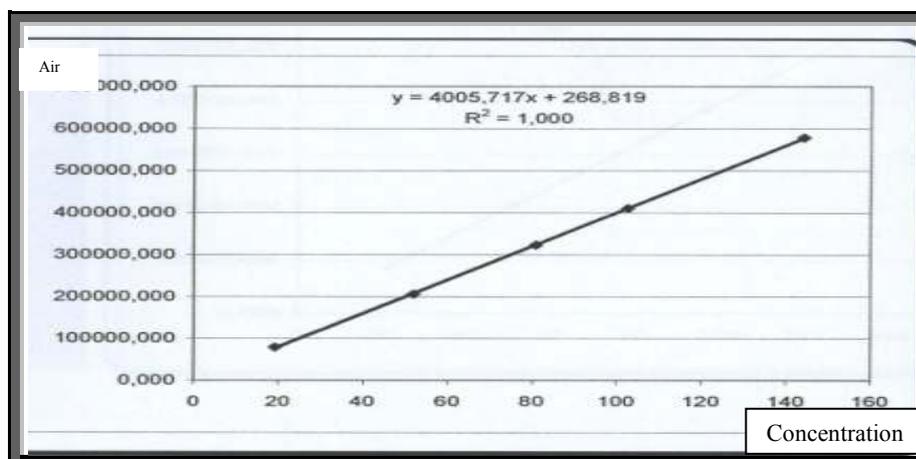


Figure N°11: Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte. (Linéarité sur conservateur)

Chapitre III : Résultats et discussion

La courbe obtenue est linéaire et ne passe pas par l'origine $y = 3967.717x + 268$. En utilisant les données de la droite de régression, nous avons calculé le coefficient de corrélation (R) et le coefficient de régression.

Le coefficient de corrélation (R): $R = 1.00$

Le coefficient de régression (R^2): $R^2 = 1.0$

➤ *Gamme de linéarité sur le Placébo chargé:*

Les données de la linéarité du conservateur dans le placebo chargé sont représentées dans le tableau XX.

Tableau XX: Données brutes de la linéarité du conservateur dans le placebo chargé

Niveau de linéarité	Concentration du PA (Xi réel) en %	Moyenne des aires de pic (Y')	moyenne de Biais (%)
20	21,45	87488,500	100,02
50	50,55	203077,500	
80	81,9	326706,500	
100	96	383205,500	
140	140,9	561491,000	

Le tableau (XX) présente les concentrations du conservateur dans le placebo chargé et les surface des pics obtenues par HPLC.

Les résultats du tableau (XX), nous ont permis de tracer une droite de régression de la linéarité, en traçant la courbe représentative des surfaces des pics du principe actif dans le standard en fonction de sa concentration. La pente **a**, l'ordonnée à l'origine **b** de la droite ainsi que le coefficient de corrélation R sont calculé et l'équation de la droite de régression est établie (Figure 12).

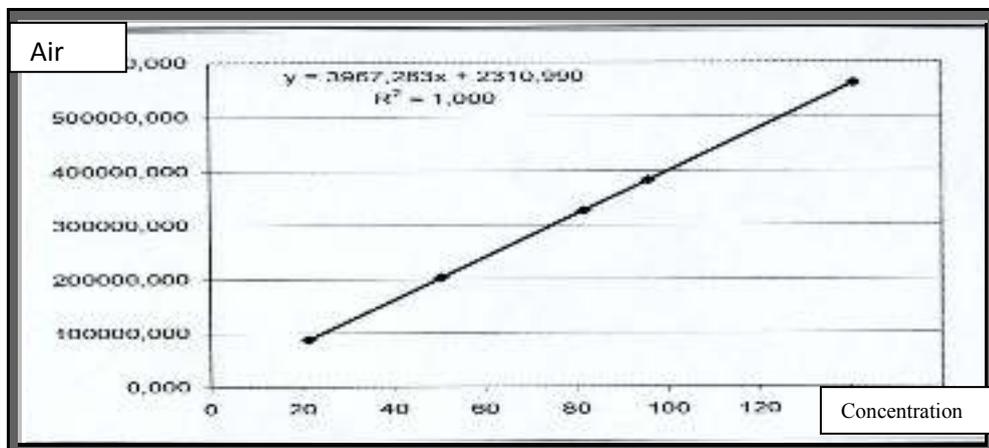


Figure 12: Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte. (Linéarité sur placebo chargé)

Chapitre III : Résultats et discussion

La courbe obtenue est linéaire et ne passe pas par l'origine $y=3967.283 x +2310.990$.En utilisant les données de la droite de régression ; nous avons calculé le coefficient de corrélation (R) et le coefficient de régressions.

Le coefficient de corrélation (R): $R=1$

Le coefficient de régression (R^2): $R^2=1$

Les résultats de la linéarité sur le principe actif et placebo chargé sont présentés dans le tableau XXI.

Tableau XXI: Tableau récapitulatif des résultats des Paramètres des droites de régressions

Paramètres	Conservateur	Placébo chargée
Pente	4005.717	3967.283
L'ordonnée à l'origine(b)	268.819	2310.990
Coefficient de corrélation (r)	1.00	1.00
Coefficient de régression (r^2)	1.00	1.00
Biais moyen (%)	100.25	100.02

Les courbes illustrées par les figures 11 et 12 montrent une linéarité des données marquée par un bon ajustement des valeurs avec la droite, ceci est prouvé par les coefficients de corrélation de conservateur 1 et placebo chargé 1, ce qui permet de déduire que le modèle linéaire est acceptable.

Le biais moyen est compris entre 95,0 % et 105,0 %, ce qui considère que les paramètres sont satisfaisants.

Donc les résultats obtenus lors de la linéarité sur principe actif et le conservateur se trouvent en accord avec les spécifications établies, par conséquent la méthode dans l'intervalle étudié est linéaire.

III.2.4. Fidélité

L'étude de la fidélité est réalisée sur le placebo chargé contenant 100 %de la quantité des principes actifs et du conservateur .la fidélité s'exprime par la mesure de la répétabilité et fidélité intermédiaire.

➤ Répétabilité:

L'étude de répétabilité est réalisée par un même opérateur le même jour, la préparation et l'analyse de la solution du placebo chargé à 100% sont répétées 06 fois.

Sur les résultats obtenus on détermine l'écart type relatif, RSD des facteurs de recouvrement.

Calcul :

$$\text{Facteur de recouvrement(\%)} = \frac{\text{Concentration calculée de l'analyte dans le placebo chargé}}{\text{Concentration introduite de l'analyte dans le placebo chargé}} \times 100$$

Concentration calculée : C'est la concentration de l'analyte dans les solutions placebo chargé à 100%, elle est déterminée à partir du signal de l'analyte dans les solutions standard et placebo chargé à 100% et la concentration de l'analyte dans la solution standard.

Concentration introduite : C'est la concentration théorique de l'analyte dans les solutions placebo chargé à 100%.

Les résultats bruts sont résumés dans les tableaux

a) Principe actif:

Les résultats de la fidélité sur principe actif dans le placebo sont représentés dans le tableau XXII.

Tableau XXII: Données brutes de la fidélité sur principe actif dans le placebo chargé

Echantillon	Prises d'essais (mg)	Aires de standard	Aires échantillon	C _{calculée} (mg/ml)	C _{introduite} (mg/ml)	Facteur de recouvrement (%)
1	20,91	1287698	1325925	0,0052	0,0053	98,2
2	19,69	1287698	1255478	0,0049	0,0050	98,8
3	19,96	1287698	12536553	0,0049	0,0050	97,3
4	19,92	1287698	1261868	0,0049	0,0050	98,1
5	21,17	1287698	1339320	0,0052	0,0053	98,0
6	20,53	1287698	1307642	0,0051	0,0052	98,7
Moyenne						98,2
SD						0,5
RSD %						0,5

Le calcul de recouvrement est effectué à l'aide de la feuille de calcul par l'introduction des données concernant les prises d'essais, du dosage de 100 % du principe actif et les aires des

Chapitre III : Résultats et discussion

pics obtenues par l'injection des échantillon de la forme pharmaceutique reconstituée contenant 100 % du principe actif

A l'aide des données du tableau (XXII), nous avons calculé le coefficient de répétabilité du principe actif dans placebo chargé, RSD est 0.5%.

b) Conservateur:

Les résultats de la fidélité sur principe actif dans le placebo sont représentés dans le tableau XXIII

Tableau XXIII: Données brutes de la fidélité sur conservateur dans le placebo chargé

Echantillon	Prises d'essais (mg)	Aires de standard	Aires échantillon	C _{calculée} (mg/ml)	C _{introduite} (mg/ml)	Facteur de recouvrement (%)
1	20.17	400044	398326	0,0050	0,0050	100,1
2	20.57	400044	406705	0,0052	0,0051	100,3
3	20.64	400044	404170	0,0051	0,0052	99,3
4	19.75	400044	391342	0,0050	0,0049	100,5
5	19.95	400044	395190	0,0050	0,0050	100,4
6	20.2	400044	398936	0,0051	0,0051	100,1
Moyenne						100,1
SD						0,4
RSD%						0,4

Le calcul de recouvrement est effectué à l'aide de la feuille de calcul par l'introduction des données concernant les prises d'essais, du dosage de 100 % du conservateur ainsi et les aires des pics obtenues par l'injection des échantillons de la forme pharmaceutique reconstituée contenant conservateur.

A l'aide des données du tableau (XXIII), nous avons calculé le coefficient de répétabilité du conservateur dans placebo chargé :

Coefficient de répétabilité RSD 0.4%

Le pourcentage de RSD des facteurs de recouvrement pour les 6 préparations de la solution placebo chargé à 100 % est inférieur à 2.0 % donc le RSD % est conforme à la spécification , cela indique que la méthode est répétable.

➤ La fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire de la méthode analytique exprime des variations dans le laboratoire : différents jours, différents analystes, cette étude s'étale sur 02 jours avec la participation de 02 manipulateurs. Les résultats obtenus dans le même jour constituent une série, on obtient 02 séries de 08 résultats chacune

Chaque manipulateur prépare d'une série de 04 solutions du placebo chargée à 100% par jour.

Les résultats de la fidélité intermédiaire sont représentés sur les tableaux (XXIV, XXV)

a) Principe actif:

Tableau XXIV: Résultats de la fidélité intermédiaire du principe actif

	Yi1 % (y)	Yi2 % (y)	Yi3 % (y)	Yi4 % (y)	Yi % (y)	Si(y)	RSD _{intra} (y)	RSD _{inter} (y)	RSD _{total} (y)
Série1 M1	98,2	98,8	97,3	98,1	98,10	0,62	1,61	0,66	1,47
Série 2 M1	100,9	96,0	98,5	96,6	99,2	2,21			
Série 1 M2	99,5	99,3	101,3	98,8	99,73	1,09			
Série 2 M2	99,2	100,1	98,1	100,5	99,48	1,07			

b) Conservateur:

Tableau XXV: Résultats brutes de la fidélité intermédiaire du conservateur

	Yi1 % (y)	Yi2 % (y)	Yi3 % (y)	Yi4 % (y)	Yi % (y)	Si(y)	RSD _{intra} (y)	RSD _{inter} (y)	RSD _{total} (y)
Série1 M1	100,1	100,3	99,3	100,5	100,5	0,53	1,14	0,54	1,01
Série 2 M1	97,1	98,5	99,8	101,2	99,2	1,76			
Série 1 M2	100,3	99,4	100,3	99,3	99,83	0,55			
Série 2 M2	99,4	99,1	99,4	100,2	99,53	0,47			

L'exploitation des résultats consiste à calculer le **RSD intra**, le **RSD inter** et le **RSD total** :

RSD_{intra} : exprime la variation à l'intérieur des groupes.

RSD_{inter} : exprime la variation entre les groupes.

RSD_{tot} : exprime la variation totale.

Les résultats obtenus de fidélité intermédiaire de principe active et conservateur sont résumés au tableau XXVI.

Tableau XXVI: Tableau récapitulatif des Paramètres de fidélité

Fidélité intermédiaire			
	%RSD Fidélité intragroupe	%RSD Fidélité intergroupe	%RSD Fidélité total
Principe actif	1,61	0,66	1,47
Conservateur	1,14	0,54	1,01

Le % de RSD_{intra} , RSD_{inter} et RSD_{total} sont $\leq 2,0$ % conforme à la spécification.

Les résultats obtenus satisfont aux normes, RSD intra, inter et total sont inférieurs à 2,0 %, la fidélité intermédiaire est donc démontrée. Donc à partir des résultats de la répétabilité et de fidélité intermédiaire la méthode est jugée fidèle.

III.2.5. Exactitude

C'est une suite de la démarche statistique initiée lors de l'étude de la fidélité intermédiaire. Elle est vérifiée par le calcul de l'erreur relative ou le recouvrement entre les concentrations introduites et les concentrations calculées en tenant compte d'un système de référence.

Ce % de recouvrement doit être compris entre la limite inférieure et supérieure.

$$\text{Exactitude} = 100 - \text{pourcentage de recouvrement (PR\%)}$$

$$\text{Pourcentage de recouvrement (PR\%)} = Y_0 / \text{la valeur de référence} \times 100$$

Les tableaux (XXVII, XXVIII) regroupent les résultats de l'exactitude de principe actif et conservateur :

a) Principe actif:

Tableau XXVII : Résultats de l'étude statistique faite sur les résultats expérimentaux de la fidélité intermédiaire.

	Valeur référence % (y)	Yi1 % (y)	Yi2 % (y)	Yi3 % (y)	Yi4 % (y)	Yi % (y)	Si (y)	Si ² (y)	PR (y)%
Série1 M1	100	98,2	98,8	97,3	98,1	98,10	0,62	98,2	98,83
Série 2 M1	100	100,9	96,0	98,5	96,6	99,2	2,21	100,9	
Série 1 M 2	100	99,5	99,3	101,3	98,8	99,73	1,09	99,5	
Série 2 M 2	100	99,2	100,1	98,1	100,5	99,48	1,07	99,2	

Yi : concentration en composant par série

Si : écart type par série

PR (y)% : pourcentage de recouvrement

b) Conservateur

Tableau XXVIII : Résultats de l'étude statistiques faite sur les résultats expérimentaux de la fidélité intermédiaires

	Valeur référence % (y)	Yi1 % (y)	Yi2 % (y)	Yi3 % (y)	Yi4 % (y)	Yi % (y)	Si (y)	Si ² (y)	PR (y)%
Série1 M 1	100	100,1	100,3	99,3	100,5	100,5	0,53	0,28	99,64
Série 2 M1	100	97,1	98,5	99,8	101,2	99,2	1,76	3,08	
Série 1 M2	100	100,3	99,4	100,3	99,3	99,83	0,55	0,30	
Série 2 M 2	100	99,4	99,1	99,4	100,2	99,53	0,47	0,22	

Yi : concentration en composant par série

Si : écart type par série

PR (y)% : pourcentage de recouvrement

Chapitre III : Résultats et discussion

Le calcul du recouvrement est effectué à l'aide de la feuille de calcul par introduction des données concernant les prises d'essais des principes actifs et les aires que nous avons calculé précédemment dans l'étude de la linéarité.

A l'aide des tableaux (XXVII, XXVIII), nous avons calculé le recouvrement moyen de l'étude de l'exactitude pour le principe actif, ainsi que le conservateur dans le produit fini.

Le calcul de l'exactitude à partir des données de fidélité donne des résultats résumés dans le tableau XXIX

Tableau XXIX : Tableau récapitulatif des résultats de l'exactitude

	Recouvrement moyen	Intervalle de confiance		L'exactitude
Principe actif	98,83	98,11	99,54	1,18
Conservateur	99,64	99,33	99,95	0,36

L'exactitude de principe actif et conservateur est inférieure à 2.5 % et les pourcentages de recouvrement moyen sont compris entre la limite inférieure et supérieure donc : la méthode est jugée comme exacte.

Les résultats de la fidélité intermédiaire, de la répétabilité et de l'exactitude satisfont aux normes : donc que la méthode est jugée fidèle et exacte.

III.2.6. Robustesse

La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquences de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation.

Les paramètres opératoires à considérer pour la présente étude sont :

- Teneur en PA, notée paramètre A.
- Longueur d'onde, notée paramètre B.
- Débit de la phase mobile, noté paramètre C.

Les solutions à préparer :

Solutions échantillons (placebo chargé) :

- ✓ Échantillon 01 : Placebo chargé en principe actif/conservateur à 95 %
- ✓ Échantillon 02 : Placebo chargé en principe actif/conservateur à 105 %
- ✓ Une solution standard 100% pour la quantification des échantillons.

Les échantillons 01 et 02 ont été analysés pour chacune des longueurs d'onde à deux débits.

Le nombre d'essais HPLC à réaliser est de 8 suivant les différentes combinaisons comme suit tableaux Annexe 15.

Pour chaque essai, on a injecté la solution standard 100% et on a calculé la concentration du PA/conservateur dans la solution échantillon, puis le facteur de recouvrement.

Tous les résultats de la robustesse sont résumés dans les tableaux (XXX, XXXI, XXXII, XXXIII).

a) Principe actif

Les calculs de la concentration du principe actif dans les solutions échantillons et les pourcentages de facteur de recouvrement de chaque solutions ainsi que l'écart type sont résumés dans le tableau XXX.

Tableau XXX: calcul de la concentration du PA dans la solution échantillon et du facteur de recouvrement

Nombre échantillon	Echantillon	Pe d'essais éch (mg)	Aires standard	Aires éch	$C_{calculée}$ (mg/ml)	$C_{introduite}$ (mg/m)	Facteur de R(%)
1	Éch 95%	18,84	1849637	1795450	0,0049	0,0047	104,2
2	Éch 105%	22,16	1849637	1992453	0,0054	0,0055	98,3
3	Éch 95%	18,84	1584757	1537659	0,0049	0,0047	104,1
4	Éch 105%	22,16	1584757	1707000	0,0054	0,0055	98,3
5	Éch 95%	18,84	1236377	1199736	0,0049	0,0047	104,1
6	Éch 105%	22,16	1236377	1330444	0,0054	0,0055	98,2
7	Éch 95%	18,84	1059140	1028194	0,0049	0,0047	104,2
8	Éch 105%	22,16	1059140	1339682	0,0064	0,0055	115,4
Écart type							5.7

Chapitre III : Résultats et discussion

Les résultats de la robustesse sur le principe actif sont représentés dans le tableau XXXI

Tableau XXXI : calcul des effets de la robustesse sur le principe actif

Paramètre/interaction	T _{student}	Les effets	Intervalle de confiance		Résultats de l'effet	Conclusion
B	3,1824	2,9	-4,5	10,3	Non significatif	Robuste
C		2,8	-4,5	10,2	Non significatif	Robuste
AB		2,9	-4,5	10,3	Non significatif	Robuste
AC		2,8	-4,5	10,2	Non significatif	Robuste
BC		2,9	-4,5	10,3	Non significatif	Robuste
ABC		2,9	-4,5	10,2	Non significatif	Robuste

c) le conservateur:

Les calculs de la concentration du conservateur dans les solutions échantillons et les pourcentages de facteur de recouvrement de chaque solutions ainsi que l'écart type sont résumés dans XXXII.

Tableau XXXII : calcul de la concentration du conservateur dans la solution échantillon et du facteur de recouvrement

Nombre éch	Echantillon	Pe d'essais éch (mg)	Aires standard	Aires éch	C _{calculée} (mg/ml)	C _{introduite} (mg/m)	Facteur de R (%)
1	Èch 95%	19,9	395718	381841	0,0049	0,0049	99,0
2	Èch 105%	23,66	395718	457005	0,0058	0,0059	99,7
3	Èch 95%	19,9	509928	493014	0,0049	0,0049	99,2
4	Èch 105%	23,66	509928	588356	0,0058	0,0058	99,6
5	Èch 95%	19,9	262556	253635	0,0049	0,0049	99,1
6	Èch 105%	23,66	262556	303146	0,0058	0,0058	99,7
7	Èch 95%	19,9	338849	326581	0,0049	0,0049	98,9
8	Èch 105%	23,66	338849	390049	0,0058	0,0058	99,4
						Écart type	0.3

Facteur de R (%) est le facteur de recouvrement

Les résultats de la robustesse sur le conservateur sont représentés dans le tableau XXXIII

Tableau XXXIII : calcul des effets de la robustesse sur le conservateur

Paramètre/interaction	T _{student}	Les effets	Intervalle de confiance		Résultats de l'effet	Conclusion
B	3,1824	-0,1	-0,5	0,3	Non significatif	Robuste
C		-0,1	-0,5	0,3	Non significatif	Robuste
AB		-0,1	-0,4	0,3	Non significatif	Robuste
AC		0,0	-0,4	0,4	Non significatif	Robuste
BC		-0,1	-0,5	0,3	Non significatif	Robuste
ABC		0,0	-0,4	0,4	Non significatif	Robuste

L'étude de la robustesse a montré que la méthode est robuste pour le changement des paramètres étudiés (teneur en principe actif, débit et longueur d'onde).

On constate que les résultats de la validation obtenus sont inclus dans les limites d'acceptation retenues, donc la méthode est spécifique, fidèle, exacte, linéaire et robuste et le dosage de l'antifongique étudié dans la forme crème peut être effectué.

III.2.7. Stabilité des solutions

La stabilité des solutions a été étudiée pour une durée de 48 h et dans les conditions suivantes :

- ✓ Stabilité dans le carrousel de la chaîne HPLC.
- ✓ Stabilité à température ambiante.
- ✓ Stabilité au réfrigérateur (2°C – 8 °C)

Pour vérifier l'évaporation de la solution dans la vial 1 après injection, cette dernière doit être injectée à 2h, 4h, 6h et 8h (sachant que la vial 1 reste perforée après l'injection).

Les vials contenant les solutions à analyser doivent être fermées hermétiquement et conservées à l'abri de la lumière (pour ne pas tenir compte de la photo-dégradation du principe actif ou conservateur).

L'étude de stabilité des solutions se fait à deux niveaux « le principe actif » et « le conservateur », à chaque niveau on injecte trois solutions standards et placebo chargé.

Chapitre III : Résultats et discussion

La stabilité des solutions étudié comme indiquer dans les tableaux ci-dessous à 2h, 4h, 6h à température ambiante dans palliasse et carrousel, à 24h ,48h conservées au réfrigérateur

- **Calcul du pourcentage de dégradation D_t** : par la formule suivante

$$D_t = \frac{|C_0 - C_t|}{C_0} \times 100$$

Avec :

C_0 : Concentration de l'analyte au temps initial en mg/ml.

C_t : Concentration de l'analyte au temps t en mg/ml. Elle est calculée à partir du signal de l'analyte au temps t, les concentrations et les aires de l'analyte dans les solutions standards fraîchement préparées.

$$C_t = \frac{A_t}{2} \left(\frac{C_{STD1}}{A_{STD1}} + \frac{C_{STD2}}{A_{STD2}} \right)$$

C_{STD1} et C_{STD2} : Concentration de l'analyte dans les solutions standard 1 et 2.

A_{STD1} et A_{STD2} : signal de l'analyte dans les solutions standard 1 et 2.

A_t : signal du pic de l'analyte dans la solution analysée à un temps t.

C_t : Concentration de l'analyte dans la solution analysée à un temps t (moyenne calculée à partir de 02 standards).

L'étude de stabilité des solutions se fait à deux niveaux, « le principe actif » et « conservateur », à chaque niveau on injecte trois solutions standards et placebo chargé.

La stabilité des solutions étudié comme indiquer dans les tableaux ci-dessous à 2h, 4h, 6h à température ambiante dans palliasse et carrousel, à 24h ,48h conservées au réfrigérateur.

a) Principe actif:

-Les résultats de stabilité des solutions de principe actif à température ambiante de carrousel sont représentés au tableau XXXIV.

Tableau XXXIV : Stabilité des solutions de principe actif à T° ambiante (carroussel)

	Stabilité des solutions à température ambiante (Aire/temps)					Stabilité des solutions à température ambiante (% de dégradation/temps)			
	Temps	t=0h	t=2h	t=4h	t=6h	2h	4h	6h	
Carroussel	STD	solution 1	1278053	1281541	1283402	1285970	0,273	0,419	0,619
		solution 2	1287698	1292587	1293979	1298385	0,380	0,488	0,830
		solution 3	1300593	1334149	1343711	1356167	2,580	3,315	4,273
		Moyenne	1288781	1302759	1307031	1313507	1,078	1,407	1,907
	Placebo chargé	solution 1	1325925	1327458	1328191	1329768	0,116	0,171	0,290
		solution 2	1255478	1262219	1266922	1276446	0,537	0,912	1,670
		solution 3	1253653	1254109	1255433	1261152	0,036	0,142	0,598
		Moyenne	1278352	1281262	1283515	1289122	0,230	0,408	0,853

-Les résultats de stabilité des solutions de principe actif à température ambiante de paille sont représentés au tableau XXXV.

Tableau XXXV: Stabilité des solutions de principe actif à T° ambiante (paille)

	Stabilité des solutions à température ambiante (Aire/temps)					Stabilité des solutions à température ambiante (% de dégradation/temps)			
	Temps	t=0h	t=2h	t=4h	t=6h	2h	4h	6h	
Paille	STD	solution 1	1278053	1270696	1275927	1278087	0,576	0,166	0,003
		solution 2	1287698	1295611	1293153	1293197	0,615	0,424	0,427
		solution 3	1300593	1293627	1292981	1295078	0,536	0,585	0,424
		Moyenne	1288781	1286644,67	1287354	1288787	0,575	0,392	0,285
	Placebo chargé	solution 1	1325925	1326628	1313596	1322781	0,053	0,930	0,237
		solution 2	1255478	1273940	1254543	1253946	1,471	0,074	0,122
		solution 3	1253653	1252684	1246168	1253008	0,077	0,597	0,051
		Moyenne	1278352	1284417,33	1271436	1276578	0,534	0,534	0,137

D'après les résultats dans les tableaux (XXXIV, XXXV) nous remarquons que les solutions standards et échantillons sont stables pendant 6heurs à température ambiante sur la paille et dans le carrousel de l'HPLC.

-Les résultats de stabilité des solutions de principe actif au Réfrigérateur pendant 24h et 48h sont représentés au tableau XXXVI.

Tableau XXXVI : Stabilité des Solutions de Principe actif au Réfrigérateur pendant 24h et 48h

	Stabilité des solutions au réfrigérateur (Aire/temps)			Stabilité des solutions au réfrigérateur (% de dégradation/temps)	
	Temps	t=24h		t=24 h	t=48 h
Réfrigérateur	STD	1263397	1264034	1,3	2,0
		1276229	1279570	0,9	1,3
		1284164	1285110	0,3	0,3
		1274596,667	1276238	0,8	1,2
	Placebo chargé	1311371	1322524	2,3	2,1
		1241701	1246949	1,7	2,0
		1249412	1249961	2,4	3,1
		1267494,667	1273144,667	2,1	2,4

D'après le tableau (XXXVI) la stabilité des solutions au réfrigérateur a été étudiée à 24 et 48h et les résultats ont montré que les solutions standards «principe actif » sont stables par contre les solutions «placébo chargé » ne sont pas stables aux temps cités.

b) le conservateur :

-Les résultats de stabilité des solutions de conservateur à température ambiante de carroussel sont représentés au tableau XXXVII.

Tableau XXXVII: Stabilité des solutions de conservateur à T° ambiante (carroussel)

	Stabilité des solutions à température ambiante (Aire/temps)					Stabilité des solutions à température ambiante (% de dégradation/temps)			
	Temps	t=0h	t=2h	t=4h	t=6h	2h	4h	6h	
Carroussel	STD	solution 1	395708	397313	397789	398489	0,406	0,526	0,703
		solution 2	400044	402147	402402	403810	0,526	0,589	0,941
		solution 3	394077	396362	396621	397717	0,580	0,646	0,924
		Moyenne	396610	398607,333	398937	400005	0,504	0,587	0,856
	Placebo chargé	solution 1	398326	398968	398969	399042	0,161	0,161	0,180
		solution 2	406705	405518	408090	407869	0,292	0,341	0,286
		solution 3	404170	404060	404672	406675	0,027	0,124	0,620
		Moyenne	403067	402848,667	403910	404529	0,160	0,209	0,362

-Les résultats de stabilité des solutions de conservateur à température ambiante de paille sont représentés au tableau XXXVIII.

Tableau XXXVIII: Stabilité des solutions de conservateur à T° ambiante (paillasse)

		Stabilité des solutions à température ambiante (Aire/temps)				Stabilité des solutions à température ambiante (% de dégradation/temps)			
		Temps	t=0h	t=2h	t=4h	t=6h	2h	4h	6h
Paillasse	STD	solution 1	395708	394675	395980	396055	0,261	0,069	0,088
		solution 2	400044	394787	401318	400229	1,314	0,318	0,046
		solution 3	394077	396230	396573	396662	0,546	0,633	0,656
		Moyenne	396610	395230,667	397957	397649	0,707	0,340	0,263
	Placebo chargé	solution 1	398326	398113	395066	397536	0,053	0,818	0,198
		solution 2	406705	407187	407483	406517	0,119	0,191	0,046
		solution 3	404170	403865	402089	403837	0,075	0,515	0,082
		Moyenne	403067	403055	401546	402630	0,082	0,508	0,109

D'après les résultats dans les tableaux (XXXVII, XXXVIII) nous remarquons que les solutions standards et échantillons sont stables pendant 6heurs à température ambiante (sur la paillasse et dans le carrousel de l'HPLC).

-Les résultats de stabilité des solutions de conservateur au Réfrigérateur pendant 24h et 48h sont représentés au tableau XXXIX.

Tableau XXXIX : Stabilité des Solutions de conservateur au Réfrigérateur pendant 24h et 48h

		Stabilité des solutions au réfrigérateur (Aire/temps)		Stabilité des solutions au réfrigérateur (% de dégradation/temps)	
Conservateur	Temps	t=24h	t=48h	t=24 h	t=48h
Stabilité des solutions au réfrigérateur (Aire/temps)	STD	399533	394105	0,4	0,9
		398433	398232	2,4	1,6
		397849	394629	0,2	0,2
		398605	395655,3333	1,0	0,9
	Placebo chargé	396235	397870	2,4	1,2
		404895	405493	2,2	1,2
		403158	403177	2,9	2,1
		401429,3333	402180	0,4	0,9

D'après le tableau XXXIX la stabilité des solutions au réfrigérateur a été étudiée à 24 et 48h et les résultats ont montré que la solution standard et placebo chargé de conservateur sont stables pendant 24h, 48h dans le réfrigérateur car le taux de dégradation est inférieur à 2.0% comme indiquer dans le tableau.

Critères d'acceptation :

Les valeurs Dt doit être : inférieure ou égal à 2,0%.

-D'après les résultats de la stabilité des solutions standards et échantillons, les résultats ont montré que toutes les solutions standards et placebo chargé de principe actif et de conservateur sont stables à 2h, 4h, 6h à température ambiante et ces derniers sont stables aussi au réfrigérateur pendant 24h, 48h à l'exception les solutions « placebo chargé » de principe actif qui ne sont pas stables aux temps cités.

III .3. La validation analytique de la méthode de recherche des substances apparentées sur le principe actif

III.3.1.La conformité de système :

Après avoir injecté 6 fois la solution standard, nous avons obtenu les résultats et les chromatogrammes représentés sur les tableaux ci-après.

➤ Résultat de répétabilité des injections :

Tableau XL: Les aires de pic et RSD % des injections du standard à 220nm

	Solution PA	Injection	Aires de pic
1	Solution PA 1.0µg /ml	1ère	40518
2	Solution PA 1.0µg /ml	2eme	40796
3	Solution PA 1.0µg /ml	3eme	41103
4	Solution PA 1.0µg /ml	4eme	41372
5	Solution PA 1.0µg /ml	5eme	41628
6	Solution PA 1.0µg /ml	6eme	41837
Moyenne			41209
RSD %			0,2
Norme			≤ 2,0 %

Le standard de déviation relatif (RSD%) de 6 injections est inférieur à limite d'acceptation qui est de 2.0%, cela confirme le bon fonctionnement du système.

➤ Résultat de vérification de la performance de la colonne :

Le résultat de l'injection du standard est représenté sur les figures :

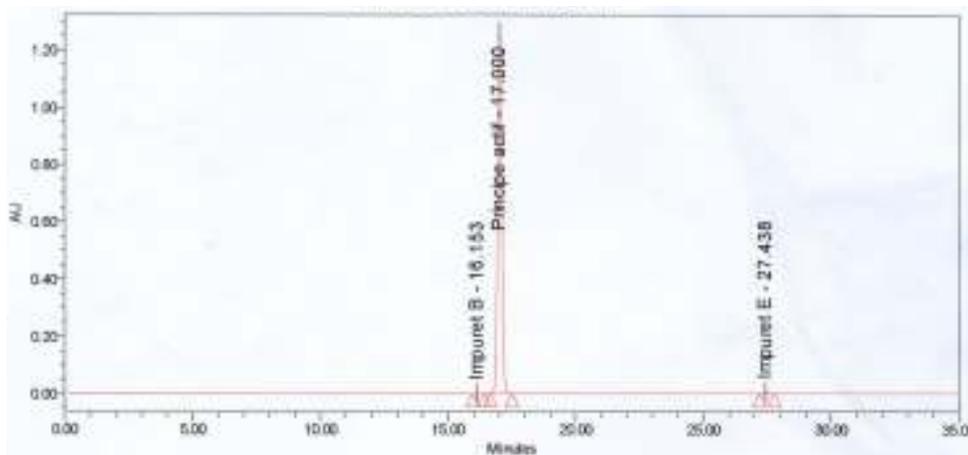


Figure13 : Chromatogramme de conformité de système

- Le Nombre de plateaux théoriques : $4,85 \cdot 10^4$.
- Le facteur de symétrie : 1.00.
- La résolution entre le pic de l'Impureté B et le pic de principe actif est 2.9

Les résultats des trois critères étudiés le nombre de plateaux théorique, le facteur de symétrie et la résolution indiquées au figure13 qu'ils sont conformes aux normes telle que Le nombre de plateaux théoriques est fixé durant la validation analytique, le facteur de symétrie est compris entre 0,8 à 1,5 et la résolution est \geq à 2 % .donc la colonne présente des performances satisfaisantes.

Les résultats obtenus répondent aux critères d'acceptation ce qui implique que le système est conforme, apte à effectuer les analyses.

III.3.2. Spécificité :

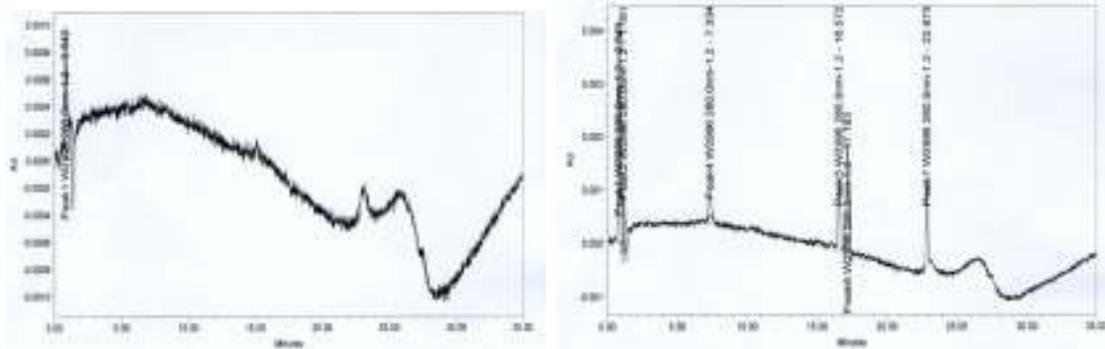
La spécificité de cette méthode analytique est démontrée en étudiant l'interférence du placebo.

L'interférence du placebo est réalisée en préparant et analysant les différentes solutions suivantes :

- 1- Diluant.
- 2- Phase mobile avec le conservateur.
- 3- Les deux phases mobiles A et B.
- 4- chromatogramme Placébo crème.
- 5- Standard à 100%.
- 6- Chromatogramme de placébo sans conservateur.

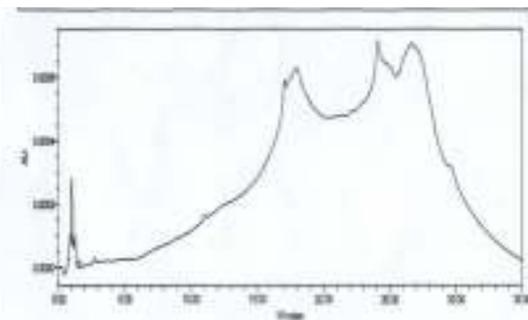
Chapitre III : Résultats et discussion

Les résultats sont représentés ci-après dans les chromatogrammes de figure 14.

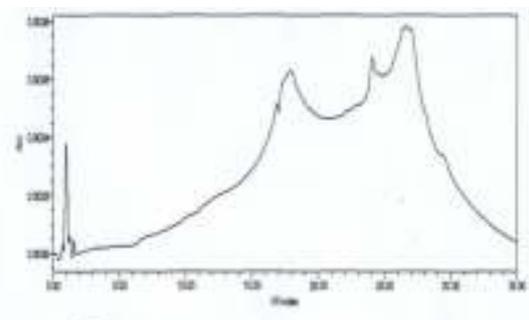


A : Chromatogramme de diluant

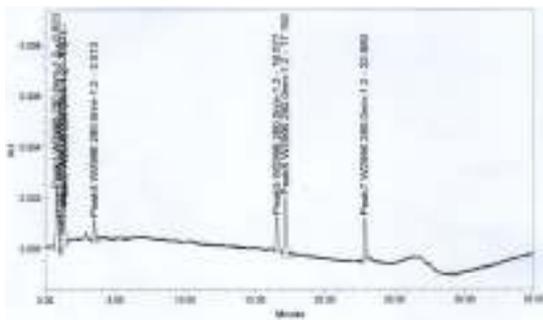
B : chromatogramme de Placébo+conservateur



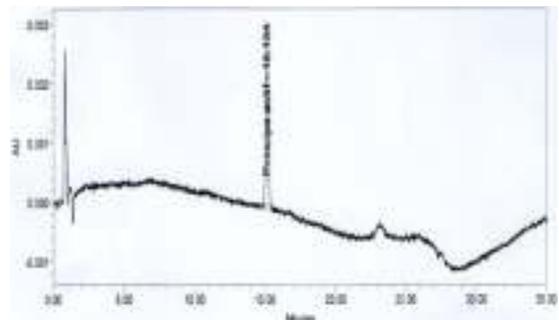
C :Phase mobile A



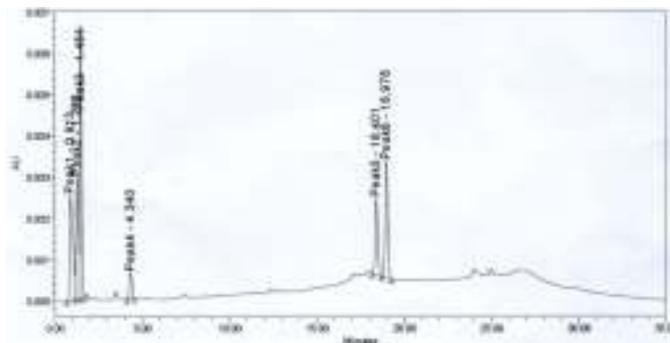
D : Phase mobile B



E : Chromatogramme Placébo crème



F : Chromatogramme principe actif



E : Chromatogramme de placebo sans conservateur

Figure 14 : Chromatogrammes pour l'étude la spécificité de la méthode de recherche des substances apparentées

Aucun pic n'apparaît en même temps de rétention que celui de l'impureté B, l'impureté E mais des pics à environ 17min ,18min et 23 min apparaissent dans le chromatogramme du placebo.

D'après les résultats obtenus nous remarquons que la méthode est spécifique pour la recherche des substances apparentées du principe actif dans notre produit analysé.

III.3.3. Calcule de la limite de détection :

Les résultats de seuil de détection : on trace la courbe les aires en fonction des concentrations

La courbe (**Annexe 10**):

$LOD = 3.3 a/b$ (b: la pente, a: l'erreur d'ordonnée à l'origine)

$LOD = 3.3(67.62033)/3200.55469$

$LOD = 0.0697 \mu\text{g} / \text{ml}$

La recherche des substances apparentées permet de déterminer le seuil de détection les impuretés de principe actif au placebo, elle est de $0.0697 \mu\text{g} / \text{ml}$.

A partir des résultats obtenus nous remarquons que la limite de détection est inférieure à la limite d'acceptation ($\leq 0,2\%$.) ce qu'on peut considérer que le résultat est conforme.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Mémoire de fin d'études

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER
EN BIOLOGIE

Option: Génie Biologique

Thème:

**Mise au point et validation des méthodes
de contrôle de qualité d'un médicament
synthétique antifongique sous forme d'une
crème**

Présenté par:

- *TOUILÈB Hakîma*

Soutenue publiquement le 26/06/2014 devant le jury:

-M ^{me}	SAIDI F.	Professeur	UNIVERSITE BLIDA 1	Président
- M ^{me}	CHELGHOUH H.	M.A.A	UNIVERSITE BLIDA 1	Promotrice
-- M ^f	BOUTTMEUR I	Pharmacien	BIOPHARM	Copromoteur
- M	OUSSADOU L.	M.A.A	UNIVERSITE BLIDA 1	Examinateur
-- M ^{me}	KEBBAS S.	M.A.A	UNIVERSITE BLIDA 1	Examinatrice

Promotion 2013/2014

Dédicaces

À Dieu tout puissant qui m'a toujours soutenu et me donner la patience, la volonté et le courage de sourire malgré toutes les difficultés.

À Mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, je vous aime.

À Mes frères et sœurs.

À Tous mes collègues de Biopharm surtout HOURLIA, FATIHA, MALIKA, NASSIMA, MONIA, SALMA, JAMILA, SARA, AMINA, SONIA, SAFIA, SARA KS, LYNDA, JANINA, HIBA, KARIMA, IRFEN, AMINE, HANAN, FATEEN, HADJER LOUNESqui ont su me redonner de la force quand il le fallait et croire en moi juste parce que c'était moi,

À Tout le groupe MASTER II promotion 2013/2014 dont je garde de merveilleux souvenir.

À Ma très chère DJAHIDA, RADIA, ZAKIA, SAMIA DE ROUIBA, KARIMA, LAMIA

À toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail Que ce mémoire soit le témoignage de mon profond amour, gratitude et mon éternelle reconnaissance.

À Tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

«TOUILEB HAKIMA »

Remerciements

Au terme de ce travail, Je remercie « Dieu le tout puissant » de m'avoir accordé la santé, la force, la volonté et la patience.

Il m'est agréable de présenter mes plus vifs remerciements à :

Mme CHELROUM H., Maitre Assistante classe A à l'Université Blida 1, qui a suivi ce travail avec beaucoup d'intérêt. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect pour ses précieux conseils, son aide et sa disponibilité.

Je tiens à remercier Mme SAIDI F., Professeur à l'Université Blida 1, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Mes remerciements vont également à Mr OUSSADOU L. et KEBBAS S., maîtres assistants classe A à l'Université Blida 1, qui ont accepté de juger ce travail.

Ma profonde gratitude et mes sincères remerciements s'adressent à Madame BENCHHEIKH T, directrice générale du site Biopharm qui m'a accepté d'effectuer mon stage de fin études au sein de l'entreprise. A Mr TABET le responsable de laboratoire de contrôle de qualité ainsi le responsable de laboratoire de développement et de recherche GOPAL GIRICH, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, je tiens aussi à exprimer mes vifs remerciements à mon encadreur BOUUTMEUR IDIR responsable de laboratoire de développement des nouveaux produits, pour m'encadrer et pour sa proposition du sujet.

Mes profonds remerciements vont aussi à NAKIB SALMA et SADOUDI BECHAR pour leur disponibilité, et pour m'avoir fait profiter de leurs expériences et fait partager leur Connaissances. Je remercie sincèrement, toute l'équipe de laboratoire de développement NABIL, FATAH, SOFIANE, SAMIR, MOAHAMED, SAKINA, AMINE, BILEL pour leurs soutient.

Que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, trouvent l'expression de ma haute considération.

Introduction

L'industrie pharmaceutique est le secteur économique stratégique qui regroupe les activités de recherche, de fabrication et de commercialisation des médicaments pour la médecine humaine ou vétérinaire. C'est l'une des industries les plus rentables et importantes économiquement dans le monde.

Cette activité est exercée par les laboratoires pharmaceutiques et les sociétés de biotechnologie et reste un secteur clé et un important moteur de croissance de l'économie mondiale

Le médicament est parmi les produits de consommation les plus encadrés. Depuis sa mise au point en recherche, à sa fabrication et à sa mise au marché et à l'information qui en donne, de nombreuses réglementations encadrent toutes les étapes de sa vie

La principale caractéristique qui distingue les médicaments des autres produits de consommation en matière de sécurité est l'exigence d'une autorisation de mise sur le marché et d'un enregistrement préalable.

L'industrie pharmaceutique a pour principal objectif la mise en œuvre des méthodes les plus performantes de fabrication et de contrôle en vue de promouvoir un meilleur accès à un traitement sûr et efficace « bonnes pratiques de fabrication et bonnes pratiques de laboratoire» (OMS, 1996).

Dans l'industrie pharmaceutique, les méthodes analytiques sont le principal outil d'évaluation d'un médicament, et sa validation constitue une étape obligatoire de son cycle de vie.

Dans le cadre de la réalisation de notre projet de fin étude effectué au laboratoire de développement et recherche de l'industrie pharmaceutiques **BIOPHARM**, « **Oued smar** », nous a été proposé de valider deux méthodes : une de dosage simultanée de principe actif et du conservateur et autre méthode de recherche des substances apparentées du principe actif dans une crème antifongique par chromatographie liquide à haute performance.

Introduction

Pour mener à bien notre projet, nous avons structuré notre travail expérimental en deux parties :

- la première partie est consacré à la validation du produit pharmaceutique antifongique sous forme de crème qui est mise au point au sein du laboratoire de recherche et développement de la boîte pharmaceutique Biopharm,
- La deuxième partie consiste à interpréter les résultats obtenus après une évaluation statistiques pour assurer la fiabilité et la reproductibilité, et déterminer le seuil de détection des impuretés de principe actif dans le placebo .

LA LISTE DES ABREVIATIONS

USP :Pharmacopée américaine

AMM : Autorisation Mise au Marché

CLHP ou HPLC : chromatographie liquide à haute performance

CL : chromatographie liquide

UV : Ultra- Violet

AFNOR : Agence Française de Normalisation

BPF: bonne pratiques de fabrication

OMS : Organisation mondiale de la santé

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

ICH: international Conference on Harmonization

ISO: Organisation internationale de normalisation

USP: United States Pharmacopeia

RSD : standard de déviation relatif

ODS : Octadecylsilane

pH : potentielle d'hydrogène

PA : principe actif

STD : standard

SD : écart type à l'intérieur des groupes de mesures

Si : écart type inter-groupe

Si² : variance inter- groupe

PR (y)% : recouvrement moyen

M 1 : manipulateur 1

M1 : manipulateur 2

D : droite

LA LISTE DES ABREVIATIONS

LA LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Représentation des pics.	09
Figure 02 : Représentation des paramètres d'un pic pour calculer le facteur de symétrie.....	11
Figure 03 : Représentation de l'exactitude.	17
Figure 04 : Spectre d'adsorption U.V-PDA visible du principe actif.....	37
Figure 05 : Spectre d'adsorption U.V-PDA du conservateur.....	37
Figure 06 : chromatogrammes à débit 1 et 0.4 min/ml.....	38
Figure 07 : Chromatogramme de la conformité de système.....	41
Figure 08 : Chromatogrammes pour l'étude de la spécificité de la méthode.....	42
Figure 09 : Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte. (Linéarité sur PA).....	44
Figure 10 Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte. (Linéarité sur placebo chargé).....	46
Figure 11 : Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte. (Linéarité sur conservateur).....	47
Figure 12 Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte. (Linéarité sur placebo chargé).....	48
Figure 13 : Chromatogramme de conformité de système.....	64
Figure 14 : Chromatogrammes pour l'étude de la spécificité de la méthode de recherche des substances apparentées.....	65
Figure 15 :Droite d'étalonnage de principe actif de méthode de recherche des substances apparenté.....	Annexe10

LA LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Principales formes pharmaceutiques utilisables selon les différentes voies d'administration.....	04
Tableau II	: Programme de la validation analytique.....	25
Tableau III	: Changement des paramètres de la robustesse.....	27
Tableau IV	: Linéarité sur le standard.	28
Tableau V	: Linéarité sur le placebo chargé.....	28
Tableau VI	: Linéarité sur le standard.....	29
Tableau VII	: Linéarité sur le placebo chargé.....	29
Tableau VIII	: Paramètres à valider et critères d'acceptation.....	30
Tableau IX	: Composition du Gradient.....	32
Tableau X	: programme de la validation analytique.....	34
Tableau XI	: les Paramètres à valider et critères d'acceptation.....	36
Tableau XII	: Résultats sur la Répétabilité des Aires du principe actif.....	40
Tableau XIII	: Résultats sur la répétabilité des aires du conservateur.....	40
Tableau XIV	: Résultats récapitulatifs de la répétabilité des injections.	40
Tableau XV	: Résultats récapitulatif des paramètres de performance de la colonne.....	41
Tableau XVI	: données brutes de la linéarité principe actif dans le standard.	44
Tableau XVII	: Données brutes de la linéarité du principe actif dans Placébo chargé.....	45
Tableau XVIII	: Tableau récapitulatif des résultats des Paramètres des droites de régressions.	46
Tableau XIX	: Données brutes de la linéarité du conservateur dans le standard.....	47
Tableau XX	: données brutes de la linéarité du conservateur dans le placebo chargé.....	48
Tableau XXI	: Tableau récapitulatif des résultats des Paramètres des droites de régressions.	49
Tableau XXII	: Données brutes de la fidélité sur principe actif dans le placebo chargé.....	50
Tableau XXIII	: Données brutes de la fidélité sur conservateur dans le placebo chargé.....	51
Tableau XXIV	: Résultats de la fidélité intermédiaire du principe actif.	52
Tableau XXV	: Données brutes de la fidélité intermédiaire du conservateur.	52
Tableau XXVI	: Tableau récapitulatif des Paramètres de fidélité.....	53
Tableau XXVII	: Résultats de l'étude statistiques faite sur les résultats expérimentaux de la fidélité intermédiaires.	54
Tableau XXVIII	: Résultats de l'étude statistiques faite sur les résultats expérimentaux de la fidélité intermédiaires.....	54

LA LISTE DES TABLEAUX

Tableau XXIX	: Tableau récapitulatif des résultats de l'exactitude.....	55
Tableau XXX	: Calcul de la concentration du PA dans la solution échantillon et du facteur de recouvrement.....	56
Tableau XXXI	: Calcul des effets de la robustesse sur le principe actif.....	57
Tableau XXXII	: Calcul de la concentration du conservateur dans la solution échantillon et du facteur de recouvrement.....	57
Tableau XXXIII	: Calcul des effets de la robustesse sur le conservateur.....	58
Tableau XXXIV	: Stabilité des Solutions du Principe actif à T° ambiante (carroussel).....	60
Tableau XXX	: Stabilité des Solutions du Principe actif à T° ambiante (paillasse).....	60
Tableau XXXVI	: Stabilité des Solutions du Principe actif Réfrigérateur 24h et 48h	61
Tableau XXXVII	: Stabilité des Solutions de Conservateur à T° ambiante 2h, 4h et 6h de (carroussel).....	61
Tableau XXXVII	: Stabilité des Solutions de Conservateur à T° ambiante 2h, 4h et 6h (paillasse).....	62
Tableau XXXIX	: Stabilité des Solutions de Conservateur au Réfrigérateur 24h et 48h	62
Tableau XL	: Les aires de pic et RSD % des injections du standard à 220nm.....	63
Tableau XLI	: Tableau Représente le nombre d'essais à réaliser par les différentes combinaisons. Annexe 01	

Résumé

L'étude que nous avons effectuée au niveau de laboratoire de recherche et développement de Biopharm consiste à une validation des deux méthodes analytiques : la méthode de dosage simultanée de principe actif et conservateur et la méthode de recherche des substances apparentées de principe actif par HPLC avec détecteur UV-PDA

En sélectionnant les conditions chromatographiques optimales, on a déterminé la longueur d'onde maximal de principe actif et conservateur (220nm et 210nm respectivement), ainsi optimisé le débit à 1ml/min à fin de réduire le temps d'analyse.

Les paramètres étudiés lors de la validation permettent de vérifier dans l'ordre suivant : la spécificité, la linéarité, d'exactitude, la fidélité, stabilité des solutions, la robustesse et ainsi la limite de détection.

D'après les résultats de ses caractéristiques de validation, il a été montré que ces deux méthodes sont correctes et appropriées pour le dosage simultané du principe actif et conservateur ainsi que nous ont permis de déterminer le seuil de détection par la méthode analytique de la recherche des substances apparentées du principe actif.

Mots clefs :

Méthode d'analyse- validation- HPLC- dosage- substances apparentées

Résumé

Summary:

The objective of this experimental work is to study the validation of two analytical methods: the simultaneous determination of active and conservative principle and the method of research related substances active ingredient by HPLC with UV detector

By selecting the optimal chromatographic conditions. Both methods have been developed and validated statistically evaluating results and interpreted. The parameters studied during validation to check the specificity and linearity; accuracy; fidelity, stability of solutions; strength and thus to the detection limit of the method related substances

Keywords:

Analytical method-development-HPLC-assay-validation-related substances

المخلص

الدراسة التي أجريناها في مختبر أبحاث وتطوير في مؤسسة لصناعة الادوية بيوفارم تهدف الى المصادقة على المنتج مضاد للفطريات شكل كريم: وذلك عن طريق تجارب مخبرية التجربة الاولى لقياس في وقت واحد العنصر الفعال و كذلك المادة المحافظة التجربة الثانية للبحث على المواد تتعلق بالمادة الفعالة الدراسة اجريت بفضل جهاز كروموغرافي عالية الاداء

اولا قمنا بتحديد الظروف المثلى الكروماتوغرافية يتم اختيار سرعة التدفق المثلى 1د/ثا، وتحديد الحد الأقصى لطول موجة العنصر الفعال و المادة المحافظة (220 نانومت و 210 نانومتر على التوالي)

اثناء الدراسة قمنا بالتحقق من الخصائص التالية: التحديد، الاستقامة ، ، والدقة، والاستقرار من الحلول، ومتانة، وتعيين الحد الاقصى منالكشف.

استنادا إلى نتائج من خصائص استطننا التحقق من الصحة التحاليل المخبرية لهذا المنتج ، فقد تبين أن كلا الطريقتين صحيحتين ومناسبتين الاولى لمعايرة كمية للمادة النشطة و المادة المحافظة في المنتج مضاد للفطريات شكل كريم والثانية سمحت لنا للكشف عن المواد تتعلق بالمادة الفعالة.

الكلمات الرئيسية:

طريقة التحليل, المصادقة, كروماتوغرافيا السوائل عالية الاداء, جرعة, المواد العالقة.

The study we conducted in laboratory research and development of Biopharm is a validation of two analytical methods: the simultaneous determination of active and conservative principle and the method of research related substances active ingredient by HPLC with detector UV-PDA.

By selecting the optimal chromatographic conditions were determined maximum wave length of active and conservative principle (220nm and 210 nm respectively), and optimized the flow 1ml/min end to reduce the analysis time. The parameters studied during validation to verify in the following order: specificity, linearity, accuracy, precision, and stability of solutions, robustness and thus the detection limit.

Based on the results of its validation characteristics, it has been shown that these two methods are correct and suitable for the simultaneous determination of the active principle and conservative and that allowed us to determine the detection limit of the analytical method of research related substances active ingredient.

Keywords:

Related analysis method-validation-HPLC-assay-substances

Summary

Table des tableaux	
Liste des figures.....	
Liste des abréviations	
Glossaire.....	

Partie théorique

Introduction générale	
-----------------------------	--

Chapitre 1 : Rappels bibliographiques

I. Généralités :	01
I.1 Généralités sur le médicament	01
I.1.1 Définition.....	01
I.1.2 Origine et composition.....	02
I.1.3 Conditionnement.....	04
I.1.4 Les voies d'administration et les formes galéniques des médicaments.....	04
I.1.5 Développement de nouveaux médicaments.....	05
I.1.6 Réglementation des médicaments.....	06
I.2 Chromatographie liquide haute performance.....	06
I.2.1.Principe.....	07
I.2.2 Appareillage.....	07
I.2.3 Applications de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse... ..	09
I.3. Qualité et validation.....	12
I.3.1 Qualité.....	12
I.3.1.2 Assurance Qualité	12
I.3 .2. Validation.....	14
I.3.2.1 Les différents types de validation	14
I.3.2.2 Validation d'une méthode analytique.....	16
I.3.2.3.Critères de la validation.....	17
I.4 La documentation.....	19
I.5 Aspect réglementaire et normatif : Documents de référence.....	19

Partie pratique

Chapitre 2 : Matériel et méthode

II. Matériel et méthodes.....	21
II.1. Matériel.....	21
II. 2. Méthodes.....	22
II.2.1. Mise au point les conditions opératoires	22
II.2.2. Description de la méthode de dosage simultané du Principe actif et du Conservateur dans le produit antifongique Crème à 1%.....	24
II.2.3. Description de la méthode de recherche des substances apparentées de Principe actif dans le produit antifongique Crème à 1%.....	31

Chapitre 3 Résultats et discussion

III .1. Optimisation les conditions opératoires.....	37
III .2. Validation analytique de la méthode de dosage simultané du principe actif et du conservateur.....	38
III.2.1. Evaluation de la conformité de système.....	39
III.2.2. Spécificité.....	42
III.2.3. Linéarité et intervalle de mesure	43
III.2.4. Fidélité.....	49
-Répétabilité	50
-Fidélité interlidiare.....	52
III.2.5. Exactitude.....	53
III.2.6. Robustesse.....	55
III.2.7. Stabilité des solutions	58
III .3. Validation analytique de la méthode de recherche des substances apparentées sur le principe actif	63
III.3.1. La conformité de système.....	63
III.3.2. Spécificité	64
III.3.3. Calcule de la limite de détection	66

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Sommaire

II. Matériel et méthodes

II.1 Présentation le lieu de stage :

Durant les 4 mois j'ai effectué le stage de fin d'étude au sein de l'entreprise Biopharm située à la zone industrielle oued Samar, notre étude réalisé au niveau du laboratoire de développement et recherche à Biopharm spa ,c'est un laboratoire pharmaceutique Algérien, fondé en 1992, depuis 2005 BIOPHARM est passé à la production locale des produits issus de sa propre Recherche et Développement, lesquels sont des médicaments génériques de qualité (Annexe 01).

II.2. Matériel

II.2.1. Appareillages: Annexe I

II.2.2. Réactifs: Annexe I

II.2.3. les produits

II.2.3.1. Description de produit fini

Le produit fini est une crème blanche à base de matière première synthétique conçu comme un antifongique local pour être commercialisé en tube en aluminium.

❖ Effets thérapeutique

C'est une crème antifongique à large spectre, appartenant à la classe des allylamines. Elle est active sur les affections fongiques cutanées dues à des dermatophytes tels que trichophyton (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*), *Microsporum canis* et *Epidermophyton floccosum*.

II.2.3.2. Description du principe actif

Le principe actif est une poudre blanche ou pâle, Pratiquement insoluble dans le toluène et l'acétate d'éthyle, facilement soluble dans l'éthanol, d'éthanol 96%, le méthanol et le chloroforme et légèrement soluble dans l'eau, de l'acétone. La substance active est décrite dans la Pharmacopée européen 2014.

II.2.3.3. Description de conservateur (excipient)

Le conservateur est un liquide huileux clair avec une forte odeur aromatique (**Raymond et al., 2009**).

C'est un excipient a une activité bactériostatique, utilisé comme conservateur antimicrobien contre les bactéries Gram-positifs, moisissures, les champignons et les levures, mais il ne

possède qu'une modeste propriété bactéricides. Activité optimale se produit à un pH inférieur à 5; peu d'activité est affichée au-dessus de pH8. L'activité antimicrobienne est réduite en présence de tensioactifs non ioniques, tels que polysorbate 80. Cependant, la réduction de l'activité est inférieure dans le cas soit avec des estershydroxybenzoate ou quaternaire des composés d'ammonium. L'activité de conservateur peut également être réduite par des incompatibilités avec certains matériaux d'emballage, notamment polyéthylène.

II.3. Méthodes

But: ce travail a pour but la sélection des conditions chromatographiques optimales de deux méthodes analytiques:

- la méthode du dosage simultané du principe actif et du conservateur par HPLC
- la méthode de recherche des substances apparentées du principe actif

Il consiste à faire une mise au point des deux méthodes étudiées ensuite à une validation analytique par une évaluation statistique des critères de l'interprétation des résultats.

II.3.1. Mise au point des conditions opératoires

II.3.1.1.Optimisation de la méthode par HPLC

❖ Méthode de dosage

Cette méthode de contrôle de qualité de crème antifongique est inspirée de la méthode de dosage du même principe actif d'un produit sous forme de suspension décrite dans La Pharmacopée *américaine* (ou USP) en vigueur.

❖ Méthode des substances apparentées

Cette méthode de contrôle de qualité de crème antifongique est inspirée de la méthode des substances apparentées de la matière première (principe actif) décrite dans la Pharmacopée Européenne, 2014.

II.3.1.2. Optimisation des conditions opératoires

✓ **Choix du diluant:**

Le choix de diluant a pour but de trouver le meilleur diluant pour faire dissoudre la crème, on a fait des essais sur la phase mobile «acétonitrile».

✓ **Choix de la phase mobile:**

En HPLC, c'est principalement l'acétonitrile qui a été utilisé.

✓ **Choix de la colonne (phase stationnaire):**

- ❖ **Méthode de dosage:** le type de la colonne choisie selon USP Zorbax SB-C₁₈ (150mm X 4.6mm) ,3.5µm .ou équivalente.
- ❖ **Méthode de substances apparentées:** la colonne est choisie selon Pharmacopée Européenne, 2014.
C₁₈ (150mm X 3,0mm) ,5µm qui donne une bonne séparation des pics.

✓ **Choix du débit:**

Une augmentation du débit n'influe pas beaucoup sur la résolution, par contre un gain de temps appréciable est enregistré. À fin d'optimiser notre débit, on dissout 100mg de standard (principe actif) dans 100ml de méthanol puis on fait une dilution de 1/200 avec la phase mobile, après on réalise deux injections une avec un débit de 0.4 ml/min et un deuxième avec un débit de 1 ml/min.

- débit 0.4 ml/min d'après méthode décrit dans l'USP.
- Le débit 1 ml/min choisi pour notre méthode de validation.

✓ **Détermination de la longueur d'onde d'absorption du principe actif et du conservateur:**

Mode opératoire:

• **Etape 1:**

Préparation blanc (la phase mobile), le blanc est composé d'acétonitrile /triéthylamine/acide phosphorique:400/5/3.

- **Etape 2:** Préparations des solutions standards

-Préparation de la solution standard « principe actif »: 50 mg standard principe actif sont dissous dans 50ml de méthanol (solution A), puis diluée à 1/200 avec la phase mobile.

-Préparation de la solution standard «conservateur» : on prépare 1 g de conservateur dans 100 ml de phase mobile.

L'ordinateur devrait afficher un tracé de l'absorbance par rapport à la longueur d'onde entre 200-400 nm.

II.3.2. Description de la méthode de dosage simultané du Principe actif et du conservateur dans le produit antifongique Crème à 1%

II.3.2.1. Vérification de la conformité du système du dosage (suitabilité) :

➤ **Conditions chromatographique:**

Colonne : Zorbax SB-C₁₈ (150 mm x 4,6 mm), 3,5 µm. Ou équivalente.

Température de la colonne: Ambiante.

Débit : 1,0 ml/min.

Longueur d'onde:

-Principe actif: 220 nm.

-Conservateur: 210 nm.

Volume d'injection: 20 µl.

➤ **Préparation des solutions:**

▪ **Phase mobile:**

Un mélange de 400 ml d'acétonitrile, 600 ml d'eau purifiée, 5 ml de triéthylamine et 3 ml d'acide phosphorique sont agités et filtrés sur un filtre de membrane 0,45 µm HPLV ou équivalent. A la fin la phase a été dégazée.

- **Solution standard :** 100 mg du standard Principe actif et 100 mg du standard conservateur sont dissouts dans 100 ml de méthanol. Le mélange est agité et dilué à 1/200 avec la phase mobile.

▪ **Solution échantillon:**

10mg de Principe actif (environ 1g de la crème) sont dissouts dans environ 80 ml de méthanol, le mélange a subi une ultrasonification pendant 10min puis laissé refroidir à température ambiante, on complète le volume à 100 ml avec le méthanol puis on fait une dilution de 5/100 avec la phase mobile. à la fin on filtre la solution avec des filtre de 0.45 µm.

Séquence d'injection:

- Solution standard: 06 fois.
- Solution échantillon: 01 fois.

Conformité du système:

Normes:

- Le %RSD des aires du pic de Principe actif pour les 06 injections de la solution standard doit être $\leq 2,0$ %.
- Le % RSD des aires du pic de conservateur pour les 06 injections de la solution standard doit être $\leq 2,0$ %.
- Le nombre de plateaux théoriques doit être supérieur ou égal à 50 % de celle trouvées durant la validation analytique
- le facteur de symétrie doit être compris entre 0,8 et 1,5.

II.3.2.2. Méthodologie de la validation

a) Programme de validation analytique:

Le programme de validation pour étudier les critères de validation est représenté dans le tableau II.

Tableau II: Programme de la validation analytique

Jour	Paramètre	Solutions à préparer	Nombre des préparations
1	- Conformité du système - Spécificité - Stabilité des solutions (T ambiante) - Fidélité :Répétabilité et Fidélité intermédiaire série 1	Blanc(phase mobile)	1
		Solution placebo	1
		Solution standard à 100 %	3
		Solution placebo chargé à 100 % Manipulateur 1	6
		Solution placebo chargé à 100 % Manipulateur 2	4

Chapitre II Matériel et méthode

2	-Linéarité : • Principe actif (standard et placebo chargé). • Conservateur (standard et placebo chargé). -Stabilité des solutions 24heures	Solution standard Principe actif à 80 %	1
		Solution standard Principe actif à 90 %	1
		Solution standard Principe actif à 100 %	2
		Solution standard Principe actif à 110 %	1
		Solution standard Principe actif à 120 %	1
		Solution placebo chargé Principe actif à 80 %	1
		Solution placebo chargé Principe actif à 90 %	1
		Solution placebo chargé Principe actif à 100 %	1
		Solution placebo chargé Principe actif à 110 %	1
		Solution placebo chargé Principe actif à 120 %	1
		Solution standard Conservateur à 20 %	1
		Solution standard Conservateur à 50 %	1
		Solution standard Conservateur à 80 %	1
		Solution standard Conservateur à 100 %	2
		Solution standard Conservateur à 140 %	1
		Solution placebo chargé conservateur à 20 %	1
		Solution placebo chargé Conservateur à 50 %	1
Solution placebo chargé Conservateur à 80 %	1		
Solution placebo chargé Conservateur à 100 %	1		
Solution placebo chargé Conservateur à 140 %	1		
3	-Fidélité intermédiaire série 2 -Stabilité des solutions 48H	Solution standard 100 %	2
		Solution placebo chargé à 100 % Manipulateur 1	4
		Solution placebo chargé à 100 % Manipulateur 2	4
4	-Robustesse * -Stabilité des solutions 72H	Solution placebo chargé à 100 %	1
		Solution standard à 100 %	2
		Solution placebo chargé à 95%	1
		Solution placebo chargé à 105%	1

* Paramètres opératoires pour l'étude de la robustesse:

Les paramètres opératoires à considérer pour la présente étude sont:

- Teneur en principe actif et en conservateur, notée paramètre A.
- Longueur d'onde, note paramètre B.
- Débit de la phase mobile, noté paramètre C.

La valeur nominale ainsi que les changements à apporter pour chaque paramètre sont expliqués dans le tableau III.

Tableau III: Changement des paramètres de la robustesse

	Teneur en Conservateur (mg)	Teneur en Principe actif (mg)	Longueur d'onde pour le conservateur (nm)	Longueur d'onde pour le Principe actif (nm)	Débit de la phase mobile (ml/min)
Valeur nominale	100	100	210	220	1,0
Variation	± 2	± 2	± 2	± 2	± 0,2

b) Préparation des solutions

▪ **Blanc:**

Phase mobile.

▪ **Solution placebo :**

On ajoute, à 1960 mg de placebo, environ 160 ml de méthanol. Le mélange a subit une ultrasonification pendant 10min puis laissé refroidir à température ambiante, on complète le volume à 200 ml avec le méthanol puis on fait une dilution de 5/100 avec la phase mobile. À la fin on agite et on filtre la solution avec des filtres de 0.45 µm.

▪ **Solution standard:**

On dissout 100mg de standard «Principe actif» et 100mg de standard «Conservateur» dans 100ml de méthanol. Puis on dilue 1ml de cette solution dans 200ml de la phase mobile.

▪ **Solution placebo chargé à 100%:**

On ajoute, à 1960 mg de placebo, 20 mg de standard «Principe actif» et 20 mg de standard «Conservateur» environ 160 ml de méthanol. Le mélange a subit une ultrasonification pendant 10min puis laissé refroidir à température ambiante, on complète le volume à 200 ml avec le méthanol puis on fait une dilution de 5/100 avec la phase mobile. À la fin on agite et on filtre la solution avec des filtres de 0.45 µm ou équivalent.

➤ Linéarité du Principe actif:

▪ Gamme de linéarité sur le standard:

On rajoute aux différentes prises d'essai de standard «Principe actif» qui varient en fonction du niveau de la linéarité (80 % à 120 %) (Voir tableau IV), 100 mg de standard du conservateur avec 100 ml de méthanol. On prépare une dilution de 1/200 avec la phase mobile qu'on agite et qu'on filtre sur un filtre de 0,45 µm ou équivalent.

Tableau IV : Linéarité sur le standard

Niveau de Linéarité	Prise d'essai de Principe actif (mg)	Concentration de Principe actif (µg/ml)
80 %	80,0	4,0
90 %	90,0	4,5
100 %	100,0	5,0
110 %	110,0	5,5
120 %	120,0	6,0

▪ Gamme de linéarité sur le placebo chargé:

On introduit une prise d'essai selon le niveau de la linéarité de 80 % à 120 % (voir tableau V) 1980 mg de placebo dans environ 160 ml de méthanol. Le mélange a subi une ultrasonification pendant 10min puis laissé refroidir à température ambiante; on complète le volume à 200 ml avec le méthanol puis on fait une dilution de 5/200 avec la phase mobile. À la fin on agite et on filtre la solution avec des filtres 0.45 µm.

Tableau V: Linéarité sur le placebo chargé

Niveau de Linéarité	Prise d'essai de Principe actif (mg)	Concentration en Principe actif (µg/ml)
80 %	16,0	4,0
90 %	18,0	4,5
100 %	20,0	5,0
110 %	22,0	5,5
120 %	24,0	6,0

➤ Linéarité de conservateur:

▪ Gamme de linéarité sur le standard:

On rajoute aux différentes prises d'essai de standard du conservateur qui varient en fonction du niveau de la linéarité (20 % à 140 %) (voir tableau VI), 100 mg de standard Principe actif avec 100 ml de méthanol. On prépare une dilution de 1/200 avec la phase mobile qu'on agite et qu'on filtre sur un filtre de 0,45 µm.

Tableau VI : Linéarité sur le standard

Niveau de Linéarité	Prise d'essai de Conservateur (mg)	Concentration en Conservateur (µg/ml)
20 %	20,0	1,0
50 %	50,0	2,5
80 %	80,0	4,0
100 %	100,0	5,0
140 %	140,0	7,0

▪ Gamme de linéarité sur le placebo chargé:

On introduit une prise d'essai selon le niveau de la linéarité de 20 % à 140 % (voir tableau VII) de standard conservateur, 20 mg de standard principe actif et 1960 mg de placebo environ 160 ml de méthanol. Le mélange a subi une ultrasonification pendant 10 min puis laissé refroidir à température ambiante, on complète le volume à 200 ml avec le méthanol puis on fait une dilution de 5/200 avec la phase mobile. À la fin on agite et on filtre la solution avec un filtre de 0.45 µm ou équivalent.

Tableau VII : Linéarité sur le placebo chargé

Niveau de Linéarité	Prise d'essai Conservateur (mg)	Concentration en Conservateur (µg/ml)
20 %	4,0	1,0
50 %	10,0	2,5
80 %	16,0	4,0
100 %	20,0	5,0
140 %	28,0	7,0

c) Paramètres à valider et critères d'acceptation

Les résultats obtenus des paramètres étudiés doivent être comparé aux critères d'acceptation présente dans le tableau VIII

Tableau VIII: Paramètres à valider et critères d'acceptation

N°	Paramètre de validation	Critère d'acceptation
1	Conformité du système	- Le % RSD des aires des 06 injections de la solution standard à 100% doit être $\leq 2,0 \%$ -Le nombre de plateaux théoriques sera fixé durant la validation analytique, en analyse de routine il sera exigé que les valeurs pour ce paramètre soient supérieures ou égales à 50% de celle trouvées durant la validation analytique - Le facteur de symétrie doit être compris entre 0,8 à 1,5
2	Spécificité	- Dans les résultats obtenus à partir de la phase mobile, et du placebo, il ne doit pas y avoir d'interférence par rapport au pic du principe actif et celui de conservateur obtenu à partir de la solution standard (interférence $\leq 2,0 \%$)
3	Linéarité et intervalle de mesure	-Le coefficient de corrélation R^2 doit être : $\geq 0,99$ -Le biais moyen doit être compris entre 95,0 % et 105,0 %
4	Fidélité	
4.1.	Répétabilité	- %RSD des facteurs de recouvrement pour les 06 préparations de la solution placebo chargé à 100 % doit être $\leq 2,0 \%$
4.2.	Fidélité intermédiaire	- Le % RSD intra, % RSD inter et % RSD total doivent être $\leq 2,0 \%$
5	Exactitude	- L'exactitude doit être $\leq 2,5\%$ - Le % de recouvrement doit être compris entre la limite supérieure et la limite inférieure
6	Stabilité des solutions *	Les valeurs de x et Dt doivent être inférieure ou égal à 2,0 % (à température ambiante et au réfrigérateur à 5°C)

7	Robustesse	Si la valeur 0 est comprise dans l'intervalle de confiance d'un paramètre, l'effet de ce paramètre pour les variations admises est non significatif sur la réponse obtenue
---	------------	--

* : La stabilité des solutions à température ambiante sera étudiée dans le carrousel de l'HPLC et sur la paillasse à 2h, 4h et 6h.

d) Conclusion:

Si les résultats obtenus des paramètres étudiés «Conformité du système, spécificité, linéarité, fidélité, exactitude, stabilité des solutions et robustesse» sont satisfaisants aux critères d'acceptations, il sera conclu que la méthode est validée pour le dosage simultané de Principe actif et du conservateur dans le produit fini antifongique Crème à 1%.

II.3.3. Description e la méthode de recherche des substances apparentées de Principe actif dans le produit antifongique Crème à 1%

II.3.3.1. Vérification de la conformité du système du dosage (suitabilité):

On effectue le test à l'abri de la lumière.

➤ **Conditions chromatographiques:**

Colonne : Inertsil ODS-2, C₁₈, (150 mm x 3,0 mm), 5 µm ou équivalente.

Température de la colonne: 40°C.

Longueur d'onde: 280 nm.

Débit: 0,8 ml/min.

Volume d'injection: 20µl.

Temps d'analyse: 30 min.

➤ **Préparation des solutions**

- **Blanc:** c'est le Diluant et phase mobiles

- **Diluant:**

Le diluant est un mélange d'acétonitrile HPLC et d'eau purifiée (50/50) (V/V).

- **Solution mélange de solvant:**

Cette solution est un mélange d'acétonitrile HPLC et de méthanol HPLC (40/60) (V/V).

▪ Tampon pH7.5:

2 ml de triéthylamine sont mélangés avec 950 ml de l'eau purifiée, après ajustement du pH à 7.5 avec un mélange d'acide acétique glacial et d'eau purifiée (5/95) (V/V), on complète le volume à 1000 ml avec de l'eau purifiée

▪ Phase mobile A:

La phase mobile A est formée d'un mélange du tampon pH7.5 et de la solution mélange de solvant (30/70) (V/V).

▪ Phase mobile B :

La phase mobile B est formée d'un mélange du tampon pH7.5 et de la solution mélange de solvant (5/95) (V/V).

Les phases mobiles sont dégazées après une filtration sur des filtres membranes de type HPLV 0,45µm ou équivalent.

Avec les deux phases mobiles A et B on réalise un gradient d'élution, La composition du gradient des deux phases mobiles est mentionnée dans le tableau IX

Tableau IX : Composition du Gradient

Temps (min)	Débit (ml/min)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	0,8	100	0
4	0,8	100	0
25	0,8	0	100
30	0,8	100	0
35	0,8	100	0

▪ Solution de conformité du système:

On dissout 5 mg de substance chimique de référence pour conformité du système (contenant les impuretés B et E) dans 10 ml de diluant

▪ Solution standard:

On dissout 25 mg de standard Principe actif dans 25 ml de diluant. Après agitation, on effectue une dilution de 1/100 avec le diluant suivie d'une deuxième dilution de 1/10 avec la phase mobile B.

▪ **Solution échantillon :**

50 mg de Principe actif (environ 5g de la crème) sont dissous dans environ 40 ml de méthanol, le mélange a subit une ultrasonification pendant 10 min puis laissé refroidir à température ambiante, on complète le volume à 50 ml avec le méthanol, puis on filtre la solution par PVDF0.45 μm ou équivalent. à la fin on fait une dilution de 5/10 avec la phase mobile B.

▪ **Solution placebo:**

On ajoute, à 4900 mg de placebo, environ 40 ml de méthanol. Le mélange a subit une ultrasonification pendant 15 min puis laissé refroidir à température ambiante, on complète le volume à 50 ml avec le méthanol puis on filtre la solution par PVDF0.45 μm ou équivalent, à la fin on fait une dilution de 5/10 avec la phase mobile B.

Séquence d'injection:

- Solution placebo: 01 fois.
- Solution de conformité du système: 01 fois
- Solution standard: 06 fois.
- Solution échantillon: 01 fois.

Remarque:

- Le temps de rétention du pic de la Principe actif est d'environ 15minutes.
- Les temps de rétention relatifs par rapport au temps de rétention du pic des imputées de principe actif :

Impureté B : environ 0,9.

Impureté E : environ 1,7.

- Facteur de correction de l'impureté E: on multiplie l'aire du pic de l'impureté E par 0,5.
- La limite d'exclusion est égale à 0,5 fois l'aire du pic de Principe actif obtenu avec la solution standard (0,05%).
- Eliminer les pics dus au placebo.

Conformité du système:

- La résolution entre le pic de l'impureté B et le pic de Principe actif doit être $\geq 2,0$.
- Le % RSD pour les six injections de la solution standard doit être $\leq 2,0\%$.
- Le nombre de plateaux théoriques soient supérieur ou égales à 50 % de celle trouvées durant la validation analytique.

-le facteur de symétrie doit être compris entre 0,8 à 1,5.

Norme:

- *Impureté B, Impureté E et Impuretés individuelles inconnues :*

L'aire du pic de l'impureté individuelle connue ou inconnue obtenu dans le chromatogramme de la solution échantillon doit être inférieure ou égale à l'aire du pic du Principe actif obtenu dans le chromatogramme de la solution standard ($\leq 0,2\%$).

- *Impuretés totales :*

La somme des aires de pics des impuretés connues et inconnues obtenus dans le chromatogramme de la solution échantillon doit être inférieure ou égale à 2,5 fois l'aire du pic du Principe actif obtenu dans le chromatogramme de la solution standard ($\leq 0,5\%$).

II.3.3.2. Méthodologie de la validation

a) Programme de la validation analytique:

Le programme de validation pour étudier les critères de validation est représenté dans le tableau X

Tableau X : programme de la validation analytique

Jour	Paramètre	Solutions à préparer	Nombre de solution à préparer
1	-Conformité du système - Spécificité - Limite de détection	Blanc (diluante, phase mobile)	1
		Solution placebo	1
		Solution de conformité du système	1
		Solution standard	1
		Solution de mère Principe actif à 10 µg/ml	1
		Solution de Principe actif à 1,2 µg/ml	1
		Solution de Principe actif à 1 µg/ml	1
		Solution de Principe actif à 0,8 µg/ml	1
		Solution de Principe actif à 0,5 µg/ml	1
		Solution de Principe actif à 0,005 µg/ml	1

b) Préparation des solutions

- **le blanc: le diluant et les phases mobiles**
- **Gamme de solution pour la détermination du LOD:**
 - **Solution mère Principe actif à 10 µg/ml:**

On dissout 20 mg de standard Principe actif dans 20ml de diluant, puis on effectue une dilution à 1/100 avec la phase mobile B.

- **Solution Principe actif à 1,2µg/ml:**

On dissout 24 mg de standard Principe actif dans 20 ml de diluant, puis on fait la dilution à 1/100 avec la phase mobile B et à partir de cette solution on fait deuxième dilution à 1/10 ml avec la phase mobile B.

- **Solution Principe actif à 1µg/ml: (Solution à 100%)**

À partir de la solution mère Principe actif à 10 µg/ml, on effectue une dilution à 1/10 de la phase mobile B.

- **Solution Principe actif à 0,8µg/ml:**

À partir de la solution mère Principe actif à 10 µg/ml on effectue une dilution à 2/25 de la phase mobile B.

- **Solution Principe actif à 0,5 µg /ml:**

A partir de la Solution mère à 100% on fait une dilution à 5/10 avec la phase mobile B.

- **Solution Principe actif à 0,005 µg/ml:**

A partir de la Solution mère à 100% on fait une dilution à 1/20 avec la phase mobile B.

c) Paramètres à valider et critères d'acceptation:

Les résultats obtenus des paramètres étudiés doivent être comparé aux critères d'acceptation présente dans le tableau XI.

Tableau XI: les Paramètres à valider et critères d'acceptation

N°	Paramètre de validation	Critère d'acceptation
1	Conformité du système	<ul style="list-style-type: none">- Le % RSD des aires des 06 injections de la solution standard 100 % doit être ≤ 2.0 %- Le nombre de plateaux théoriques sera fixé durant la validation analytique, en analyse de routine il sera exigé que les valeurs pour ce paramètre soient supérieures ou égales à 50% de celle trouvées durant la validation analytique- Le facteur de symétrie doit être compris 0,8 à 1,5- La résolution entre le pic de l'Impureté B et le pic de la Principe actif doit être $\geq 2,0$
2	Spécificité	<ul style="list-style-type: none">- Dans les résultats obtenus à partir de la phase mobile, du placebo et du diluant, il ne doit pas y avoir d'interférence par rapport aux pics de la solution de conformité du système
3	Limite de détection	<ul style="list-style-type: none">- La limite de détection doit être \leq à la limite d'acceptation

c) Conclusion:

Si les résultats obtenus des paramètres étudiés «Conformité du système, spécificité et LOD» satisfont aux critères d'acceptation, il sera conclu que la méthode est validée pour les substances apparentées de Principe actif dans le produit Fini antifongique Crème à 1 %.

Conclusion

Notre étude réalisée au niveau du laboratoire de recherche et développement à Biopharm dans le but de valider les deux méthodes analytiques de contrôle de qualité d'une crème antifongique : la méthode de dosage simultané de Principe actif et du conservateur et la méthode de recherche des substances apparentées de Principe actif, on a utilisé une méthode chromatographique par HPLC.

Une mise au point de la méthode chromatographique (HPLC) utilisée a permis d'optimiser le débit à 1ml/min pour un temps de rétention plus réduit et de déterminer la longueur d'onde à 210nm pour détecter le conservateur et à 220 nm pour détecter le Principe actif.

La conformité de système a été évaluée par le calcul des coefficients de variation et du facteur de similarité dont les valeurs ont été trouvées incluses dans les limites d'acceptation ce qui signifie que le système est conforme.

la validation de dosage simultané de principe actif et de conservateur dans une crème antifongique nous a permis à conclure que cette méthode d'analyse par HPLC est spécifique puisqu'elle fait apparaître les pics de principe actif et conservateur en gardant le même temps de rétention (t_r de principe actif : 5,183min, t_r de conservateur : 2,536 min) , linéaire répétable, fidèle et exacte , même robuste, ce qui nous a permis aussi de conclure que la méthode est appropriée pour le dosage simultané de principe actif et du conservateur et nous a permis de détecter des impuretés dans le placebo avec une seuil de détection de 0.0697 μ g /ml .

En perspective, cette étude pourrait être complétée, d'une part par l'étude de la stabilité du principe actif et du conservateur dans le produit fini dans le but de garantir sa stabilité dans le temps et sous l'effet de la température. D'autre part, on pourrait établir des protocoles permettant de bien maîtriser et gérer les conditions opératoires et de confirmer par vérification que les documents, les locaux, les équipements et les réactifs adoptés conduisent à des résultats fiables et répétables.

I. Généralités :

I. 1 Généralités sur le médicament

I.1.1 Définition

Le médicament est défini selon l'article 170 de la loi 85-05 du 16 février 1985, relative à la promotion et la protection de la santé comme étant toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, tous produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger, modifier ses fonctions organiques (**Journal officiel de la république algérienne n44, 2008**).

Cette définition regroupe divers types de médicaments :

I.1.1.1. Spécialités pharmaceutiques

Une spécialité pharmaceutique est définie comme « tout médicament préparé à l'avance sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spécial » la spécialité est préparée en milieu industriel dans un laboratoire pharmaceutique, sous le contrôle des pharmaciens d'industrie et des autorités compétentes qui délivre une Autorisation de Mise sur le Marché ou AMM pour cette spécialité (**Dorosz et al., 2011**).

I.1.1.2. Spécialités génériques

Le Spécialités générique est un médicament ayant la même composition qualitative et quantitative en principes actifs qu'une spécialité de référence. Lorsqu'un laboratoire pharmaceutique découvre un médicament, il le protège par un brevet qui lui assure l'exclusivité commerciale, et ce pendant 20 à 25 ans. Au-delà de cette période la licence de fabrication de ce médicament de référence tombe dans le domaine public. Un autre laboratoire peut alors commercialiser un générique comparable au médicament de référence dit « princeps ». Le générique est une copie conforme en qualité et en quantité de la spécialité d'origine, mais avec un prix inférieur correspondant à l'absence d'investissement de recherche. Les génériques sont destinés à se substituer un médicament original (**Denis, 2010**).

I.1.2 Origine et composition

I.1.2.1 Origine

➤ *Origine biologique*

Ce sont des substances extraites des êtres vivants, par exemple : des animaux, végétaux, microorganismes (Olivier et al., 2013)..

➤ *Origine végétale*

La phytothérapie est très ancienne. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent.

La partie d'un végétal récoltée à des fins d'utilisation thérapeutique est appelée drogue végétale, des molécules chimiques isolées d'une drogue et purifiées au maximum sont utilisées (Olivier et al., 2013)..

➤ *Origine animale*

L'utilisation d'organes, glandes, tissus humaines ou animaux en thérapeutique s'appelle l'opothérapie exemple les hormones, les facteurs de croissance d'origines homme sont obtenus par génie génétique (Olivier et al., 2013). .

➤ *Origine microbiologique*

Les principes actifs sont extraits de micro-organismes exemple les vaccins, Certains microorganismes cultivés sécrètent des substances utilisées en thérapeutique les antibiotiques . (Olivier et al., 2013).

➤ *Origine minéral*

L'utilisation des minéraux en thérapeutique est très ancienne, on distingue:

-Les produits naturels purifiés par exemple : le soufre, l'eau, l'argile, le talc.

-les produits obtenus par les réactions chimiques minérales (Olivier et al., 2013). .

➤ *Origine synthétique*

Ces médicaments sont obtenus par :

- *Biosynthèse* : principe actif d'origine biologique est reproduit par synthèse.

- *Hémi synthèse* : dans ce cas les substances naturelles existantes sont modifiées chimiquement par augmentation de leur activité et diminution leurs effets secondaire.

Exemple : antispasmodique de synthèse.

- *Synthèse totale* : exemple sulfamides (**Olivier et al., 2013**).

➤ *Origine biotechnologique* :

C'est une technique très élaborées, génétiques basées sur le génie, le but est d'isoler des cellules vivantes et leur faire produire des substances d'intérêt thérapeutique, les ordres sont donnés à la cellule productrice sous forme d'ADN recombiné et injecté par exemple, l'interféron, insuline humaine, les hormones de croissance (**Olivier et al., 2013**).

➤ *Utilisations*

Toutes ces matières premières doivent subir des transformations, doivent être mélangées à des excipients, adjuvants, doivent être conditionnées pour donner des médicaments utilisables pour le malade.

C'est à ce moment là que les opérations pharmaceutiques interviennent pour mettre ces substances en formes (**Olivier et al., 2013**).

I.1.2.2 Composition

Une usine de fabrication pharmaceutique peut être considérée schématiquement comme une enceinte dans laquelle il entre des matières premières: principes actifs, excipients et articles de conditionnement et d'où il sort des produits de qualité définie et des déchets (**Le Hir et al., 2013**).

➤ *Principe actif*

C'est la Substance active douée de propriété pharmacologique et à la base de l'effet thérapeutique du médicament (**Talbert et al., 2006**). Le principe actif peut être existé sous plusieurs formes cristallines ou sous la forme de dérivés tels que sels, hydrates, Le choix se fait en fonction du mode d'administration et de considérations de stabilité, de solubilité et de biodisponibilité (**Le Hir et al., 2013**).

➤ *Excipient*

C'est le support (ou le véhicule ou adjuvant) du principe actif. Il a un rôle non thérapeutique et inactif :

- ❖ Facilite l'administration, la conservation et la mise en forme.
- ❖ Permet d'exercer l'action thérapeutique dans les meilleures conditions et d'accélérer ou de ralentir la résorption du médicament.
- ❖ Masque le goût et protège contre l'acidité gastrique,

Contribuant ainsi à certaines propriétés du produit tel que la stabilité, le profil biopharmaceutiques, l'aspect et l'acceptation pour le patient, la facilité de fabrication .la formulation d'un médicament comprend généralement plusieurs excipients, L'une des qualités principales recherchées pour un excipient est son inertie vis-à-vis des principes actifs, des matériaux de conditionnement et de l'organisme (**Aiache et al., 2008**).

I.1.3 Conditionnement : il existe deux conditionnements

➤ **Conditionnement primaire** : indispensable pour le médicament; ayant un rôle de protection (isole et conserve le médicament), il a aussi un rôle fonctionnel (faciliter l'utilisation du médicament par le malade).

➤ **conditionnement secondaire** : permet la manipulation, le transport du médicament ainsi que son identification, et des informations pour le malade (assure la sécurité) (**Tandia, 2002**).

I.1.4 Les voies d'administration et les formes galéniques des médicaments

Le choix de La forme galénique découle de celui de la voie d'administration.

L'administration des médicaments est assurée par plusieurs voies présentées dans le tableau I.

Tableau I : Principales formes pharmaceutiques utilisables selon les différentes voies d'administration

<i>Voies</i>	<i>Formes pharmaceutiques</i>
<i>Orale</i>	<i>Solution, suspension, sirop, Poudre, granulé, comprimés, gélules,</i>
<i>Parentérale</i>	<i>Solution, suspension, sirop, Comprimé pour implantation</i>
<i>Cutanée</i>	<i>Solution, suspension Pommade, émulsion Dispositif transdermiques</i>
<i>Perlinguale</i>	<i>Solution « spray », pastille, comprimé buccal</i>
<i>Rectale</i>	<i>Solution, suspension, sirop, émulsion, lavement ; Pommade, mousse suppositoire, capsule, molle, micro et mini-granules</i>

Oculaire	<i>collyre, solution pour lavage Pommade</i>
Vaginale	<i>Mousse, gel, ovule comprimé</i>
Nasale et auriculaire	<i>solution pour pulvérisation et lavage Pommade Poudre</i>
Pulmonaire	<i>solution, suspension (aérosol) poudre pour inhalation</i>

(Hugues et al., 1994)

I.1.5 Développement de nouveaux médicaments

Le processus de développement de nouveaux médicaments se différencie de la majorité des processus de développement des produits des autres secteurs d'activités. Ces différences se situent notamment au niveau du cycle de développement des médicaments, au niveau des risques associés au développement de ces nouveaux produits, au niveau du cadre de la réglementation du secteur d'activités, aussi au niveau des coûts importants qu'exige ce secteur.

✓ Cycle de développement des médicaments

Le processus de développement d'un médicament est caractérisé par un cycle de développement plutôt long et complexe (Karet et Studt, 2001), pouvant varier de 12 à 15 ans. Le processus de développement et sa durée dépendent de la nature du médicament et de la technologie à utiliser.

Les principales étapes précédant celles de la recherche dite fondamentale et les expérimentations sont l'établissement de la stratégie de développement du produit, le choix des axes thérapeutiques et l'estimation des besoins du marché (Kennedy, 1998).

Cependant, la *première étape* du cycle de développement est celle dite de *recherche fondamentale*. Cette étape comprend l'identification de cibles médicales, la mise au point de produits candidats ainsi que l'évaluation de la brevetabilité des molécules composant le produit.

Deuxième étape du cycle de développement du produit : le *développement pré clinique* comprend les tests d'efficacité et de toxicité en laboratoire (in vitro), et par la suite, chez l'animal (in vivo). Des expériences de pharmacocinétique de métabolisation du produit ainsi que le choix de la forme galénique du produit sont effectués en parallèle, et ces étapes peuvent durer jusqu'à trois ans.

La *troisième étape* de développement du produit est *l'étape clinique*. C'est à ce stade que les produits sont testés chez les humains à plus grande échelle. L'étape de la recherche clinique se décompose en quatre phases :

- ❖ *la phase I* : à ce stade, la tolérance du produit est testée ainsi que son efficacité sur un petit échantillonnage de patients. La durée de la phase se situe entre 2 à 3 ans.
- ❖ *la phase II* : elle sert à mesurer l'efficacité et la tolérance du produit sur un plus grand échantillonnage de patients. La durée de la phase peut varier entre 2 à 3 ans.
- ❖ *La phase III* : à ce stade, les tests d'efficacité et de tolérance sont réalisés sur un plus grand nombre de patients que la phase II. Elle peut durer de 3 à 4 ans (Kennedy, 1998).
- ❖ *La phase IV* : elle permet de réaliser des études de pharmacovigilance qui permettent d'évaluer l'action physiologique du produit chez l'humain et d'en identifier des effets secondaires indésirables non envisagés dans les études précédentes. Cette phase se déroule parallèlement à la préparation de la commercialisation du médicament (**Tremblay, 2006**).

I.1.6 Réglementation des médicaments:

L'utilisation de médicaments inefficaces, de mauvaise qualité et nocifs peut entraîner des échecs thérapeutiques, une exacerbation de la maladie, une résistance aux médicaments et même dans certains cas provoquer la mort. De plus, elle peut créer un climat de suspicion et briser la confiance dans le système de santé, les professionnels de santé, les laboratoires pharmaceutique et les distributeurs. Pour cela les gouvernements doivent mettre en place de puissantes autorités nationales de réglementations pharmaceutique pour assurer que la fabrication, la commercialisation et l'utilisation des médicaments sont efficaces réglementés, dans le but de protéger et promouvoir la santé publique (**OMS, 2003**).

I.2 Chromatographie liquide haute performance:

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation. Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse des composés thermosensibles, des composés très polaires ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Son succès est dû également au grand choix de phases stationnaires disponibles, à l'excellente reproductibilité des analyses.

I.2.1.Principe

La chromatographie en phase liquide est une méthode physico-chimique basée sur des différences d'interactions.

La chromatographie liquide (CL) est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire.

La CL est principalement fondé sur les mécanismes d'adsorption, de distribution de masse, d'échange d'ions, d'exclusion ou d'interaction stéréochimique. **Pharmacopée Européenne, 2014**

Cependant pour ce qui est de l'HPLC, la phase mobile traverse la colonne sous des pressions qui peut atteindre 500psi ce qui diminue fortement la durée de l'analyse.les substances éluées sont détectées à la sortie de la colonne par l'absorption en UV, l'indice de réfraction ou la fluorescence .l'HPLC présente les avantages suivants :

- haute résolution qui permet la purification systématique de mélanges impossibles à analyser par d'autres techniques.
- Rapidité qui permet de réaliser en moins d'une heure la plupart des séparations.
- possibilité d'automatisation.
- forte sensibilité. **(Voet et Voet, 2005)**

I.2.2 Appareillage:

L'appareillage se compose d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur). La phase mobile, délivrée à partir d'un ou plusieurs réservoirs, circule à travers la colonne, généralement à débit constant, puis passe à travers le détecteur. **(Pharmacopée Européenne, 2014)**

❖ **La phase mobile:** Pour la chromatographie en phase normale, les solvants utilisés sont de faible polarité. Un strict contrôle de la présence d'eau dans la phase mobile est nécessaire pour obtenir des résultats reproductibles. Pour la CL en phase inversée, on utilise des phases mobiles aqueuses, avec ou sans modifiants organiques.

Chapitre I : Rappels bibliographiques

Les composants de la phase mobile sont généralement filtrés pour éliminer les particules de taille supérieure à 0,45 μ m. Les phases mobiles à plusieurs composants sont préparées par mesure des volumes requis (à moins que les proportions ne soient spécifiées en masse) pour chaque composant, puis mélange des différents composants

Les solvants sont normalement dégazés avant le pompage, par passage d'un courant d'hélium, sonication ou traitement en ligne par des modules membrane/vide, pour éviter la formation de bulles de gaz dans la cellule de détection.

Les solvants utilisés pour préparer la phase mobile sont normalement exempts d'agents stabilisants, et transparents à la longueur d'onde de détection si l'on utilise un détecteur UV.

❖ *La phase stationnaire :*

De nombreux types de phases stationnaires sont utilisés en CL, notamment :

- de la silice, de l'alumine ou du graphite poreux, utilisés en chromatographie en polarité de phase normale, où la séparation repose sur une adsorption différentielle et/ou une distribution de masse.
- des résines ou polymères à groupements acides ou basiques, utilisés en chromatographie à échange d'ions, où la séparation repose sur la compétition entre les ions à séparer et ceux de la phase mobile.
- de la silice ou des polymères poreux, utilisés en chromatographie d'exclusion, où la séparation repose sur les différences de volume entre molécules, ce qui correspond à une exclusion stérique.
- divers supports chimiquement modifiés, préparés à partir de polymères, de silice ou de graphite poreux, utilisés en CL en polarité de phase inversée, où la séparation repose principalement sur le partage des molécules entre la phase mobile et la phase stationnaire.

La plupart des séparations reposent sur des mécanismes de partage utilisant de la silice chimiquement modifiée comme phase stationnaire et des solvants polaires comme phase mobile.

Les colonnes utilisées en chromatographie analytique sont en acier inoxydable, sauf indication contraire dans la monographie, et sont de longueur et de diamètre intérieur (\emptyset) variables. (**Pharmacopée Européenne, 2014**)

I.2.3 Applications de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse:

I.2.3.1 Analyse des chromatogrammes:

➤ **Chromatogramme**

Représentation, graphique ou autre, de la réponse d'un détecteur, de la concentration d'un effluent ou d'une autre grandeur utilisée comme mesure de la concentration d'un effluent en fonction du temps ou du volume. Idéalement, un chromatogramme se présente comme une séquence de pics gaussiens au-dessus d'une ligne de base (Figure 1).

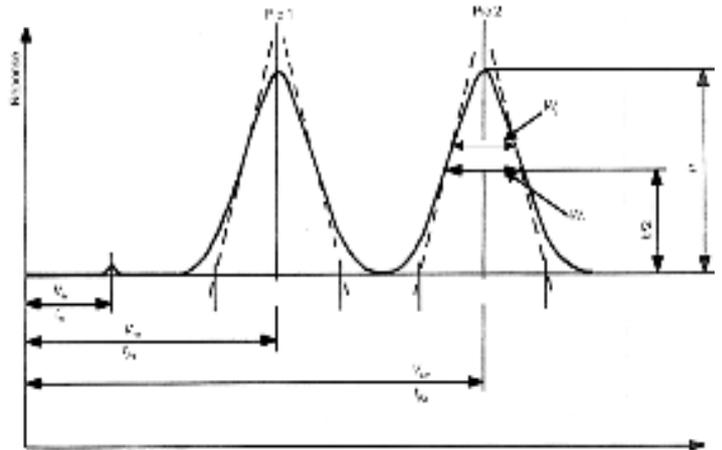


Figure N°1 : Représentation des pics (Pharmacopée Européenne, 2014)

➤ **Pic**

Partie d'un chromatogramme enregistrant la réponse du détecteur lorsqu'un composant (ou plusieurs composants non séparés) sort de la colonne.

Le pic peut être défini par sa surface, ou par sa hauteur h et sa largeur à mi-hauteur w_h , ou par sa hauteur h et sa largeur aux points d'inflexion w_i ; dans le cas d'un pic gaussien (figure 1), il existe une relation de la forme suivante : $w_h = 1.18 w_i$

Le chromatogramme comporte plusieurs pics de forme gaussienne, de caractéristiques différentes :

❖ **Temps de rétention t_R**

Temps requis pour l'élution d'un composant (figure 1)

❖ **Volume de rétention V_R**

Volume de phase mobile requis pour l'élution d'un composant. Il peut être calculé à partir du temps de rétention, et du débit F exprimé en millilitres par minute, à l'aide de l'équation suivante : $V_R = t_R \times F$

❖ Temps de rétention nulle (« hold-up time ») t_M

Temps requis pour l'élution d'un composant non retenu (figure1)

❖ Volume de rétention nulle (« hold-up volume ») V_M

Volume de phase mobile requis pour l'élution d'un composant non retenu. Il peut être calculé à partir du temps de rétention nulle, et du débit F exprimé en millilitres par minute, à l'aide de l'équation suivante : $V_M = t_M \times F$ (Pharmacopée Européenne, 2014)

I.3.3.2 Analyse qualitative:

➤ Le facteur de rétention K :

Le facteur de rétention (également appelé coefficient de distribution massique D_m ou facteur de capacité k') est défini comme :

$$K = \frac{\text{quantité de composant dans la phase stationnaire}}{\text{quantité de composant dans la phase mobile}}$$

$$K = K_c \frac{V_S}{V_M}$$

K_C = constante de distribution (ou coefficient de distribution à l'équilibre),

V_S = volume de la phase stationnaire,

V_M = volume de la phase mobile.

Le facteur de rétention d'un composant peut être déterminé à partir du chromatogramme, à l'aide de l'équation suivante :

$$K = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

➤ Nombre de plateaux théoriques N

La performance d'une colonne (efficacité apparente) peut être calculée à partir de données obtenues dans des conditions isothermes, isocratiques ou isodenses, selon la technique utilisée, en termes de nombre de plateaux (ou nombre apparent de plateaux théoriques) à l'aide de l'équation suivante, où t_R et w_h sont exprimés dans la même unité:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

t_R = temps de rétention du pic correspondant au composant considéré,

w_h = largeur du pic à mi-hauteur.

Le nombre de plateaux dépend du composant considéré ainsi que de la colonne, de la température de la colonne, de la phase mobile et du temps de rétention (**Pharmacopée Européenne, 2014**).

Plus N est grand plus la colonne est efficace, elle est traduite par la finesse des pics obtenus

➤ Facteur de symétrie A_s

Le facteur de symétrie d'un pic (figure 2) est calculé à l'aide de l'équation suivante :

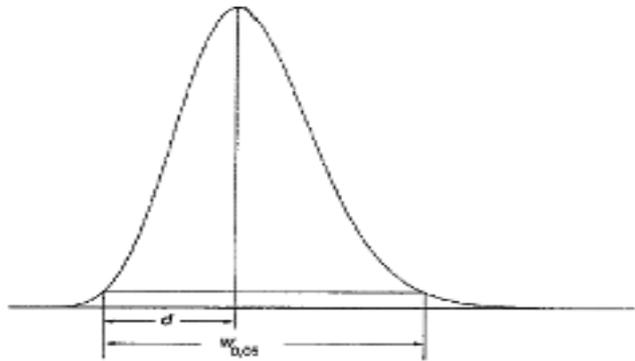


Figure N°2 : Représentation paramètres d'un pic pour calculer le facteur de symétrie

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ = largeur du pic au vingtième de sa hauteur,

d = distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur.

Une valeur A_s de 1,0 indique la symétrie. Si $A_s > 1,0$, le pic présente une $A_s < 1,0$, le pic présente un front diffus.

➤ Résolution R_s

La résolution entre les pics de 2 composants (figure 1) peut être calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$R_s = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$$t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R1}, t_{R2} = temps de rétention des pics,

w_{h1}, w_{h2} = largeur des pics à mi-hauteur (**Anonyme 02, 2014**).

I.2.3.3 Analyse quantitative:

Il existe une relation linéaire entre l'amplitude du signal et la concentration d'un soluté donné dans l'échantillon : on caractérise le signal soit par l'aire du pic soit par hauteur. Quand on veut contrôler avec précision le débit de la colonne, on préfère utiliser l'aire puisqu'elle est relativement indépendante de la composition de la phase mobile. La plupart des dispositifs de HPLC sont équipés de systèmes informatisés de traitement des données, de sorte que, si l'on trace des courbes d'étalonnage, à partir d'étalons, on peut obtenir automatiquement l'ensemble des résultats donnant la concentration de chaque constituant, avec en regard son temps de rétention (**Mendham, 2005**).

I.3. Qualité et validation

I.3.1 Qualité

I.3.1.1 Concept de qualité

La qualité est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confère l'aptitude à satisfaire les besoins exprimés ou implicites par utilisateur. Elle est définie par AFNOR comme étant « l'aptitude d'un produit ou d'un service à satisfaire les besoins des utilisateurs » (**Cleve, 2009**).

Donc, un médicament de qualité est celui dont les caractères et la nature doivent satisfaire les besoins des utilisateurs, c'est-à-dire ayant les critères essentiels suivants :

- ✓ efficacité : effet thérapeutique correct.
- ✓ sécurité : administration avec maximum de sécurité.
- ✓ innocuité : administration avec le minimum d'effets secondaires.
- ✓ qualité : bon aspect et conditionnement convenable, bonne conservation, emploi facile, etc...(OMS, 1995)

I.3.1.2 Assurance Qualité

L'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les médicaments aient la qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés (**Le Hir, 2001**), il est nécessaire de mettre en place un système d'assurance qualité qui est défini selon l'AFNOR comme étant:« la mise en œuvre d'un ensemble approprié de dispositions préétablies et systématiques destinées à donner confiance en l'obtention de la qualité requise ». Concrètement, l'assurance de la qualité est destinée à donner confiance au produit (**Cleve, 2009**).

L'assurance de la qualité des médicaments regroupe toutes les mesures prises pour garantir qu'un médicament est sûr, efficace, de bonne qualité et acceptable pour le patient depuis l'étape de sa mise au point jusqu'à son utilisation.

➤ **Les bonnes pratiques de fabrication : BPF**

L'élément de l'assurance de la qualité qui garantit que les médicaments sont fabriqués et contrôlés de façon cohérente et selon les normes de qualité adaptées à leur emploi.

Considérant que les principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication doivent porter principalement sur : (**Le Hir, 2001**)

❖ **Contrôle qualité**

Le contrôle qualité fait partie des bonnes pratiques de fabrication; il concerne l'échantillonnage, les spécifications, le contrôle, ainsi que les procédures d'organisation, de documentation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires appropriées ont été réellement effectuées et que les matières premières, les articles de conditionnement et les produits ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante (**Pharmacopée Européenne, 2011**).

C'est l'activité dont la mission est essentiellement d'accepter ou de refuser pour l'usage prévu l'objet que l'on vient de produire, c'est-à-dire contrôler que la production est conforme aux normes du produit (**Yannick, 1996**).

Les moyens de contrôle peuvent être internes, tels que le suivi des anomalies, des validations, les auto-inspections et les audits de qualité (**Biron, 1987**). Ou peuvent être basées sur des informations externes telles que le suivi des réclamations, des retours, et de la traçabilité.

❖ **L'auto-inspection** : elle correspond à un examen détaillé et périodique des conditions et des procédures de travail en usage, par une équipe du lieu de production en vue de vérifier l'application des bonnes pratiques de fabrication et proposer aux responsables d'éventuelles mesures de correction (**Pradeau, 1996**).

❖ **L'audit de qualité** : il s'agit d'une évaluation de tout ou d'une partie du système d'assurance qualité mis en place.

Il est réalisé par une spécialité ou une équipe désignée à cet effet. Il peut être effectué si besoin au près de fournisseurs et sous-traitants. L'audit peut être porté sur un produit, sur un "process", ou sur une procédure (**Pradeau, 1996**).

I.3.2. Validation

La validation dans son terme général est l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes des bonnes pratiques de fabrication, que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, la matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés (**Chemtob, 1995**). Dans le domaine pharmaceutique la validation est l'expression complète d'une séquence d'activité ayant pour but de démontrer et documenter qu'un médicament peut être fabriqué de façon fiable par des procédés déterminés, avec une qualité appropriée pour leur utilisation destinée donc la validation est une exigence réglementaire qui permet d'assurer et de prouver la qualité des médicaments.

I.3.2.1 Les différents types de validation

Selon le moment où elle se situe par rapport à la production, la validation peut être :

a-Validation prospective : est pratiquée au stade de développement grâce à une analyse des risques du procédé de production. Cette forme de validation à l'avance est essentielle pour

réduire le risque d'erreurs au cours de la production normal. il est exigé par exemple pour la préparation de produits injectables (**Pharmacopée Européenne, 2011**).

b-Validation rétrospective : Validation réalisée pour un produit déjà sur le marché et fondée sur une multitude de données recueillies sur plusieurs lots en fonction du temps. La validation rétrospective peut être utilisée pour d'anciens produits que le fabricant n'a pas validés lorsqu'ils ont été mis sur le marché, mais qui doivent maintenant être validés pour être conformes aux exigences du BPF (**Santé Canada, 2009**).

c-Validation concomitante (ou simultanée) : Processus où des lots de production courants sont utilisés pour contrôler les paramètres de traitement. Ce processus fournit une garantie pour le lot à l'étude, mais ne peut donner qu'une garantie limitée de l'uniformité de la qualité d'un lot à l'autre (**Santé Canada, 2009**).

d-Validation des procédés de nettoyage : Démonstration documentée que les méthodes de nettoyage de l'équipement utilisé dans la fabrication et l'emballage permettent de réduire à un niveau acceptable tous les résidus (produits et agents de nettoyage) et que le nettoyage et l'entreposage normaux de l'équipement ne donnent pas lieu à une prolifération microbienne (**Santé Canada, 2009**).

e-Validation du procédé Process Validation) : Établir, avec un niveau d'assurance élevé, une preuve documentée qu'un procédé particulier donnera constamment un produit conforme à ses spécifications et à des caractéristiques de qualité prédéterminées. La validation d'un procédé peut prendre la forme d'une validation prospective, concomitante ou rétrospective, ou d'une certification ou revalidation du procédé (**Santé Canada, 2009**).

f-Revalidation : La revalidation est nécessaire pour vérifier que les changements introduits, volontairement ou non, dans le procédé et /ou dans son environnement n'ont pas d'effets indésirables sur les caractéristiques du procédé et la qualité des produits. On peut distinguer deux catégories de revalidation :

- revalidation à la suite d'un changement pouvant avoir une incidence sur la qualité des produits, ces modifications peuvent être portées sur les matières premières, les articles de conditionnement, le procédé de fabrication, le matériel, les contrôles en cours de fabrications.
- revalidation périodique à un intervalle déterminé; il est bien connu qu'un procédé peut subir des modifications progressives, même si le personnel est expérimenté et travaille

correctement en respectant les modes opératoires établis .De même, l'usure de matériel peut entraîner des changements progressives. En conséquence, il est souhaitable de procéder à des revalidations périodique, même si aucun changement périodique n'a été introduit volontairement (**Pharmacopée Européenne, 2011**)

I .3.2.2 Validation d'une méthode analytique:

❖ Cycle de vie d'une méthode analytique:

Une méthode analytique est un moyen visant à exprimer concrètement un besoin bien exprimé, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné. Dans le domaine analytique, deux types de méthodes sont mentionnés, les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Par rapport à ces dernières, l'objectif d'une méthode analytique peut se résumer en sa capacité à quantifier chacune des quantités inconnues présentes dans un échantillon. La mise en œuvre d'une méthode de dosage peut se décomposer en quatre grandes phases généralement successives :

- ✓ une phase de **sélection** où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis.
- ✓ une phase de **développement**, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences.
- ✓ une phase de **validation** (Validation Interne/Externe) précédée, selon les cas, d'une phase de prévalidation.
- ✓ une phase **d'application en routine**, incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation.

Les quatre types les plus courants de procédures analytiques sont traités ici :

-Identification.

-Détermination quantitative de teneurs en impuretés.

-Essais limites pour le contrôle des impuretés.

-Détermination quantitative, dans un échantillon d'une substance pharmaceutique ou d'un médicament, de la teneur en principe actif ou autre(s) composant(s) sélectionné(s) du produit (**Pharmacopée Européenne, 2011**).

I.3.2.3. Critères de la validation

➤ La spécificité d'une procédure analytique

C'est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser, en présence des autres composants susceptibles de l'accompagner (**Pharmacopée Européenne, 2005**). C.-à-d. il est possible d'évaluer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon (par exemple, impuretés résultant de la fabrication ou de la dégradation du produit, ou constituants autres que l'analyte, que ces substances soient pharmacologiquement actives ou inertes)

➤ la linéarité

La linéarité d'une procédure analytique donnée est sa capacité (à l'intérieur d'un intervalle donné) à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) de substance présente dans l'échantillon (**Pharmacopée Européenne, 2011**).

➤ L'exactitude

L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée. Elle est parfois appelée justesse. voir figure 3 (**Pharmacopée Européenne, 2011**).

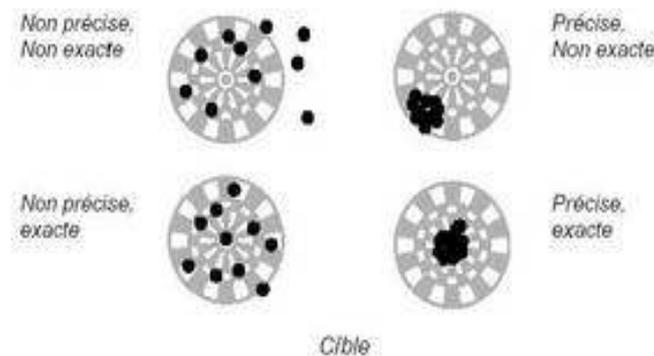


Figure 3 : Représentation de l'exactitude (**Pharmacopée Européenne, 2011**)

➤ La fidélité

La fidélité d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord (mesure de la dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs prises d'essai provenant

d'un même échantillon homogène, dans les conditions prescrites, qui sont la répétabilité et fidélité intermédiaire :

- a- **La répétabilité** : est la fidélité obtenue dans des conditions opératoires identiques et dans un court intervalle de temps. Elle est également appelée fidélité intra-essai.
- b- **La fidélité intermédiaire** : est l'expression de la variabilité intra-laboratoire (mesures effectuées à des jours différents, par des analystes différents, avec des équipements différents, etc.) **(Pharmacopée Européenne, 2011)**.

➤ **limite de détection**

La limite de détection d'une procédure analytique donnée est la plus petite quantité de la substance considérée qui peut être détectée dans un échantillon, sans forcément pouvoir être quantifiée de façon exacte **(Pharmacopée Européenne, 2011)**.

➤ **limite de quantification :**

La limite de quantification d'une procédure analytique donnée est la plus petite quantité de la substance considérée qui peut être quantifiée, dans un échantillon, avec une exactitude et une fidélité appropriées. La limite de quantification intervient dans l'analyse quantitative des substances présentes à faible concentration dans des matrices échantillons ; elle est notamment utilisée pour le dosage des impuretés et/ou des produits de dégradation **(Pharmacopée Européenne, 2011)**.

➤ **Robustesse :**

La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, délibérées, de facteurs associés à la procédure, elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application. **(Pharmacopée Européenne, 2011)**

➤ **Intervalle (de mesure)**

L'intervalle (de mesure) d'une procédure analytique est l'intervalle (limites inférieure et supérieure incluses) de concentration/quantité de substance à analyser (dans l'échantillon) sur lequel il a été démontré que la procédure possède une fidélité, une exactitude et une linéarité appropriées **(Pharmacopée Européenne, 2011)**.

➤ Stabilités des solutions

L'étude de la stabilité des solutions consiste à déterminer la durée d'utilisation des solutions ainsi que la température de conservation. Pour cela nous vérifions la concentration de ces solutions à des temps déterminés au préalable et à différentes températures. Dans cette étude il s'agit d'examiner la réponse fournie par l'appareille lors de l'analyse de ces solutions à l'état initial t_0 et au temps t puis comparer les résultats (ICH) (**Pharmacopée Européenne, 2011**)

I.4 La documentation

Un plan de validation peut être établi. Il s'agit d'un moyen pour établir les responsabilités et les activités, d'un guide pour ceux qui dirigent et accomplissent les opérations de validation, d'un document qui peut être présenté à l'inspection pour prouver le niveau de compréhension du programme de validation des responsables de la validation et leur engagement vis-à-vis des BPF

Le plan de validation montre le programme des validations, il établit les coûts prévisionnels et l'organisation. Il renvoie aussi aux protocoles de qualification des installations, aux procédures opératoires, aux formations du personnel. Il contient une définition du groupe de validation.

Le protocole de validation définit quels tests doivent être utilisés pour permettre de vérifier la maîtrise du procédé et quels résultats sont attendus. Il contient au moins le plan de l'unité de production, une description des caractéristiques de l'environnement, du matériel utilisé, des fluides ; ainsi que les instructions de production, le schéma de fabrication, les essais à conduire et les spécifications attendues. Le plan d'échantillonnage et de contrôle et les méthodes analytiques (**Chemtob, 1995**).

I.5 Aspect réglementaire et normatif : Documents de référence

Compte tenu de l'importance de la validation en termes de qualité du médicament, les tendances de l'inspection pour le futur s'articulent autour de la formation continue de ses agents, du renforcement de sa collaboration dans l'évaluation des dossiers d'AMM, en particulier lors du changement de site de fabrication, et de sa participation à l'évolution des textes afin que ceux-ci tiennent compte au mieux des réalités du terrain (**RAYNAUD, 2011**).

Bien que les exigences particulières de la validation varient en fonction de la nature du médicament et la complexité du procédé, les concepts exposés dans les directives suivantes

peuvent être appliqués et fournissent une structure acceptable pour construire une approche complète à la validation :

❖ SFSTP :

Ce guide a été élaboré dans le but d'aider les industriels pharmaceutiques à valider leurs Procédures d'analyse et de constituer un support permettant à tout analyste une réflexion sur les méthodes statistiques applicables à la validation analytique:

- « Guide de validation analytique –Rapport d'une commission SFSTP »
- « Méthodes chromatographique de dosage dans les milieux biologique: stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP»
- « Validation des procédures analytiques quantitatives » : Harmonisation des démarches. (guide de validation analytique, rapport d'une commission SFSTP) (**rapport d'une commission SFSTP, 1992**)

❖ ICH

L'ICH fournit des guides spécifiques, élaborés par des groupes de travail d'experts, ces guides sont destinés directement aux industries,

La vision principale de l'ICH est de développer un système de qualité pharmaceutique

harmonisé applicable tout au long du cycle de vie de produit, basé sur une approche intégrant la gestion du risque qualité et la science. Parmi les documents de référence élaborés par ICH pour des validations ont été :

➤ Q2 :« validation analytique »

- Q2A « Texte de validation des procédures analytiques » : Présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prise en compte au cours de la validation des méthodes analytiques.
- Q2B :«Methodologie » : son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre , le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement (**Santé Canada, 1998**)

Références bibliographiques

1-Journal officiel de la république algérienne N44 Aouel Chaâbane 1429 3 août 2008

2-Aiache .JM, Beyssac .E, Cardot.JM, Hoffart .V, Renoux. R., 2008. Initiation à la connaissance du médicament. Edition : 5 Elsevier Masson, P(413). p13

3-Biron .B, 1987. L'assurance de qualité dans l'industrie pharmaceutique conception, attributions, thèse diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Lyon 1 (Université Claude Bernard), P. (216)

4-Chemtob .C, 1995 .STP PHARMA PRATIQUE ISSN 1157-1497 « Principe généraux de la validation des procédés de fabrication », Editions de santé, Paris, vol. 5, n°3, [5 page(s) (article)].

5-Cohen. Pr.Y., Aiache. J-M ., Aiche. S., Renoux. R., 1995. Initiation à la connaissance du médicament, Edition : 2, Masson, P (280).

6-Cleve .M., 2009.Formalisation du système qualité de la pharmacie à usage intérieur d'un établissement gériatrique : mémoire du diplôme d'études spécialisées de pharmacie hospitalière et des collectivités, université Claude Bernard – Lyon, P (141).p (16 ,17)

7-Denis. S., 2010. « Pharmacologie BP 2010 » Edition : 4 Porphyre - Cahiers Du Préparateur En *Pharmacie* , P (361)

8-Dorosz .ph ., Vital Durand .D., Le jeune. C., 2011.Guide pratique des médicaments. Edition : 30 .Maloine, P (189)

9-Hugues .F.C., Le Jeune.CI., La Batide Alanore .S., 1994 thérapeutiques générale: du développement à la prescription des médicaments, Edition : 2 ; frison-roche, P (398). p(44)

10-Karet G., Studt T., 2001."Managing Biotech Requires Cross-Functional Coordination." *R & D*. Vol. 43, N° 3. p (12-17).

11-Kennedy. T.,1998. Pharmaceutical Project Management. *Drug and the Pharmaceutical Sciences*. Vol. 86, P (290).

12- Lechat. P; Lagier .G; Rouveix .B; Vincens .M; Weber.S., 1982. Pharmacologie Médical. Edition :4 ; Paris, Ébrégés Masson, P (305).

13-Le Hir. A., 2001. Pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments, Edition :8 ; Masson, P (402). p (6,7)

Références bibliographiques

- 14-Le Hir .A., Chaumeil .JC., Brossard .D., 2013** Pharmacie galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments, Edition :9, ELSEVIER / MASSON , vol.48, P (382).
- 15-Mendham .J ., denny., 2005** .Analyse chimique quantitative de Vogel, Edition :6 par jean toulle, et monique mottet, Vol 283, P (311).
- 16-Pradeau .D., 1992.** Analyse pratique du médicament Edition médicale international, P (1067). p48
- 17-Olivier .A., Pascale. B., Marie-Ange. D., 2013.** Pharmacie galénique BP .Edition :3 par Rueil-Malmaison, vol. P. (132). p (49.50)
- 18- Raynaud .M ., 2011** (validation des procédé de fabrication dans l'industrie pharmaceutique, appliquée aux formes solides orales) thèse diplôme d'état de docteur en pharmacie Faculté de médecine et de pharmacie. Pharmacie : Limoges, P (150).
- 19-Talbert M et Willoquet G et Gervais R., 2006** (guide pharmaco), Edition : 7 Editions du Vidal, P (3200). p (38)
- 20-Tandia .M., 2002**«contrôle de la qualité des formes galéniques solides destinées à la voie orale au Laboratoire National de Santé) . Pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat) thèse pharmacie, Bamako, faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto – stomatologie p (109).
- 21- Normand T., 2006,** Thèse « étude des pratiques de gestion de projet des entreprises de biotechnologies développant de nouveaux médicaments au QUÉBEC » mémoire présenté à université du québec à trois-rivières comme exigence partielle de la maîtrise en gestion de projet, université Trois-Rivières du Québec, P (180). p (111-123)
- 22-Piriou .Y ,1996** .assurance qualité de la centrale d'approvisionnement créée par pharmaciens sans frontières : application des normes ISO 9002 : thèse D Pharm. Université de Clermont I faculté de pharmacie thèse diplôme d'état de docteur en pharmacie, P (114).
- 23-Voet Donald, Voet Judith .G., 2005. Biochimie,** Edition : 2 de Boeck, P (1525). p 144
- 24-Raymond .R.C.,Paul S.J.,Marian .Q.E,** Edition : 6 Handbook of pharmaceutical excipients, 2009, P(888).
- 25-** perspective politique de l'OMS sur les médicaments -une réglementation efficace : assurer l'innocuité et la qualité des médicaments .Décembre 2003:OMS, Genève

Références bibliographiques

26- Pharmacopée Européenne 8eme édition Tome I 01/2014, chapitre méthode analytique : chromatographie liquide et chapitre méthode analytique : technique de séparation chromatographique, P (1568).

27- bonnes pratiques de fabrication d'un produit pharmaceutique : lignes directrice concernant la validation des procédés de fabrication annexe1, annexe 6 Organisation mondiale de la santé OMS série de rapport techniques N°863 ,1996.

28- Santé Canada / Inspectorat de la Direction générale des produits de santé et des aliments Directives sur la validation des formes posologiques pharmaceutiques (GUI-0029) /Le 1 décembre 2009.

29- Pharmacopée Européenne Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé, 6e Edition, 2011, technique pour le laboration des monographies © Conseil de l'Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France – 2011.

30- Pharmacopée Européenne Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé 4e Edition – 2005 © Conseil de l'Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France – 2005.

31- guide de validation analytique, rapport d'une commission SFSTP de J Caporal-Gautier - 1992.

32- Organisation mondiale de la santé OMS, bonnes pratiques de fabrication - 5e éditions - Juin 1995.

33-Programme des produits thérapeutiques Santé Canada, 1998. ICH : Conférence Internationale sur l'Harmonisation des exigences techniques relatives à l'homologation des produits pharmaceutiques à usage humain ; **q2a** : Texte concernant la validation des méthodes d'analyse et **q2b** :«Methodologie ».