

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : pharmacie industrielle

Intitulé du mémoire

Validation d'une méthode analytique par HPLC pour le dosage du Fluvacol 80 mg comprimé pelliculé à libération prolongée

Présenté par :

ZIAD Siham

Bouchène Lydia chabha

Encadré par :

Mme Ait Mesbah

Mr Yahiaoui Idrice

Année universitaire 2015/2016

Résumé

L'objectif de notre travail vise à valider une méthode analytique pour doser la Fluvastatin Sodique comme principe actif dans un comprimé (FLUVACOL 80 mg comprimés pelliculés à libération prolongée), en utilisant la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) comme méthode analytique, en vue d'apporter une contribution particulièrement importante pour répondre aux problèmes d'identification et de quantification de cette forme pharmaceutique.

Les résultats obtenus montrent que la méthode a une bonne linéarité avec la bonne exactitude et précision, ainsi, elle ne présente aucune interférence du placebo avec la Fluvastatin Sodique, ce qui mène à dire que cette méthode est valide pour doser la Fluvastatin Sodique dans la forme pharmaceutique de FLUVACOL 80 mg comprimés pelliculés à libération prolongée.

Abstract

The aim of our work is to validate an analytical method for assaying Fluvastatin Sodium as an active ingredient in one tablet (FLUVACOL 80 mg film-coated tablet extended release), using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) as analytical method to provide a particularly important contribution to meet the identification and quantization of this pharmaceutical form problems.

The results show that the method has good linearity with good accuracy and precision, and it shows no interference of placebo with Fluvastatin Sodium, leading to say that this method is valid for assaying Fluvastatin Sodium in the form pharmaceutical FLUVACOL 80 mg film-coated tablet with sustained release.

ملخص

والهدف من عملنا هو التحقق من صحة المنهج التحليلي لمعايرة فلوفاستاتين الصوديوم كعنصر فعال في قرص واحد (FLUVACOL 80 مغ قرص مغلف بمد الإفراج) وذلك باستخدام طريقة التلوين السائل العالي الاداء كطريقة تحليلية لتقديم مساهم هام بشكل خاص لتلبية تحديد وتقدير ا لحجم مشاكل هذا الشكل الصيدلاني. وأظهرت النتائج أن هذه الطريقة لديها خطية جيدة مع دقة جيدة ، وهذا لا يظهر اي تاثير للسواغات على فلوفاستاتين الصوديوم، مما يؤدي إلى القول بأن هذه الطريقة صالحة لمعايرة فلوفاستاتين الصوديوم في شكل قرص مغلف مع إطلاق متواصل.

Dédicace

Avec une énorme joie, je dédie ce mémoire à :

Mes parents :

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de part son soutien, ces conseils.

Mon père, qui peut être fier de trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit.

A ma grande sœur « Sihem » qui m'a toujours aidé et que j'aime beaucoup.

A mes petites princesses, mes petites sœurs mes adorables: Katia et Camélia.

A mes copines Djilali Khadidja, Gherrak Fouzia étudiantes en master 2 pharmacie industrielle qui m'ont aidé tout au long de cette période.

A tous mes camarades de la promotion pharmacie industrielle 2016.

Aux personnels du laboratoire El Kendi, qui nous ont aidé énormément durant tout le stage.

L'expression de ma plus profonde gratitude à vous tous.

Lydia.

Les résultats des paramètres de validation se présentent comme suit :

6.1. Spécificité :

6.1.1. Identification :

Concernant le test d'identification, les chromatogrammes obtenus avec les solutions standards (solution C) et placebo (solution D) (voir les figure 6.4, 6.3 Annexe A), montrent clairement un pic de fluvastatin à $t_R = 4,077$ minutes (bien élué) qui ne présente aucune interférence avec les pics obtenus dans le placebo (excipients) ni même avec la phase mobile et le diluant (voir les figures 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 Annexe A).

6.1.2. Dégradation forcée :

Celle-ci permet d'identifier des pics de dégradation éventuels dans le cas où la Fluvastatin sodique est soumise à des conditions de stress (température, milieu acide, milieu basique, milieu oxydant).

Le Tableau 6.1 (annexe A) regroupe les différentes valeurs des temps de rétention et des surfaces de Fluvastatin sodique avec le recouvrement entre les paramètres de l'échantillon à l'état initial et après une dégradation thermique, acide, basique et oxydative pendant 4 h.

Les chromatogrammes ci-dessous représentent l'influence de la dégradation thermique, acide, basique et oxydative pendant 4 h sur la Fluvastatin sodique.

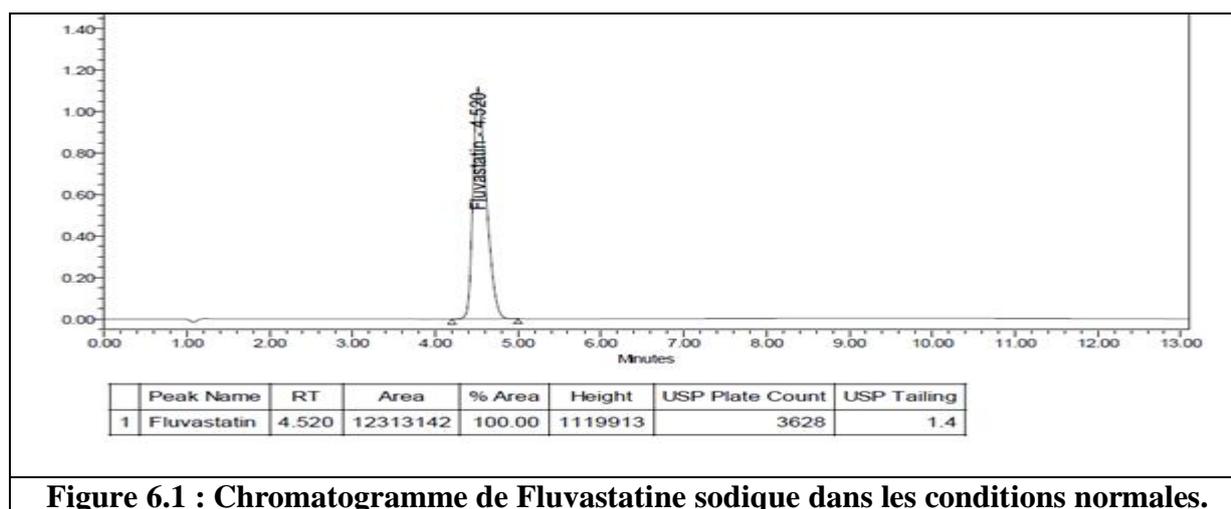


Figure 6.1 : Chromatogramme de Fluvastatine sodique dans les conditions normales.

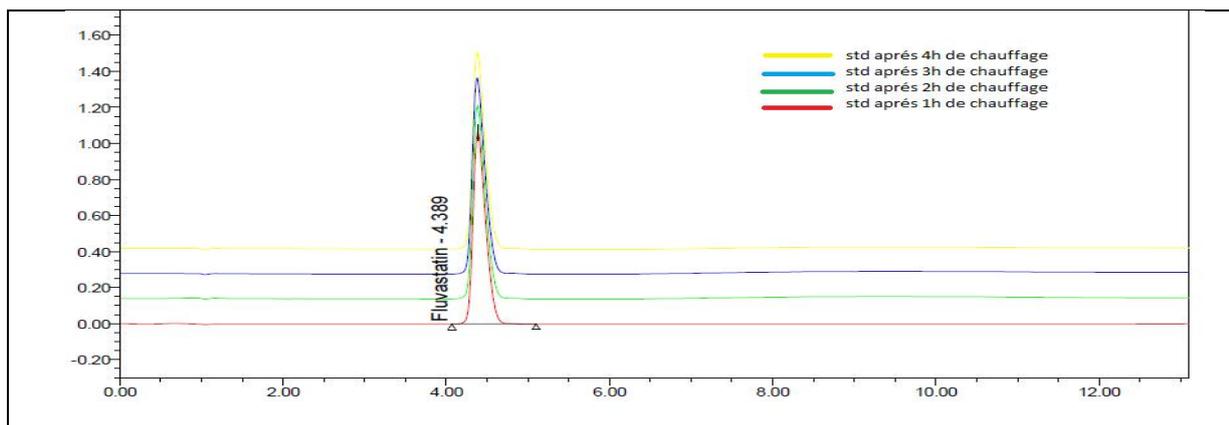


Figure 6.2 : L'influence de la chaleur sur la Fluvastatin sodique après 4h.

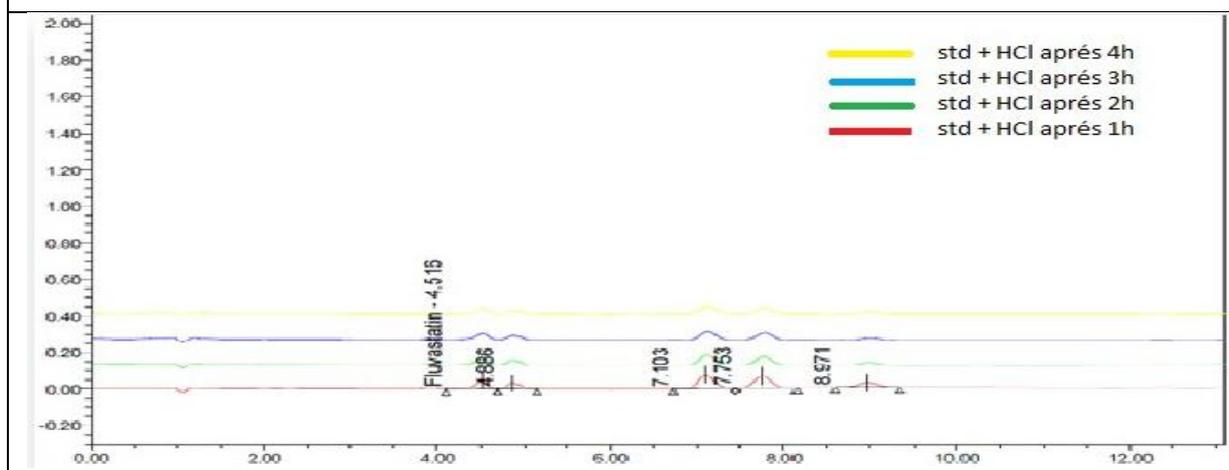


Figure 6.3 : L'influence de l'HCl sur la Fluvastatin sodique après 4h.

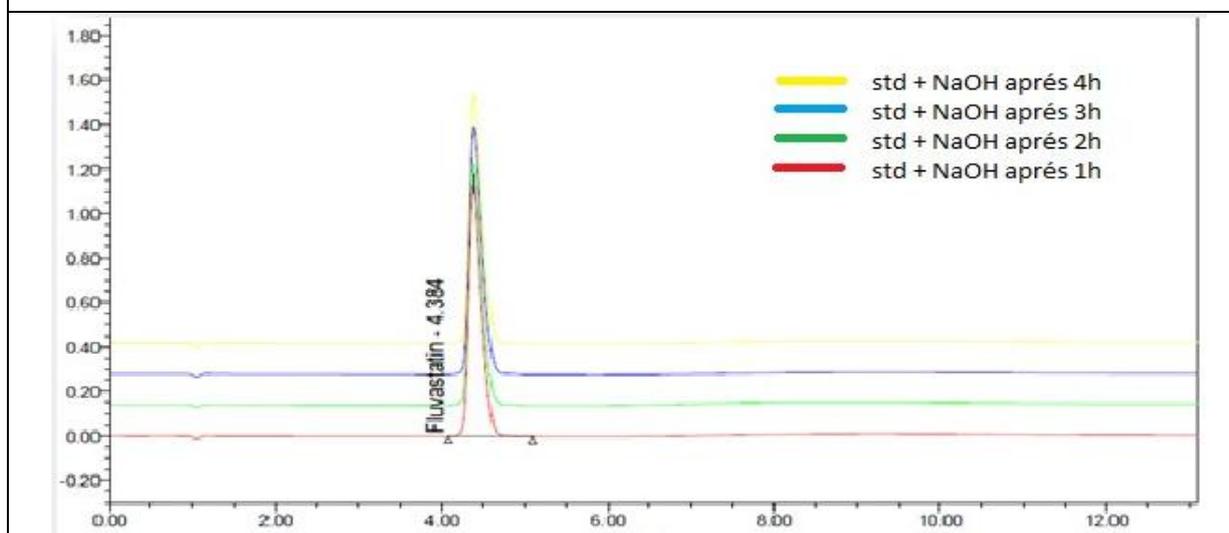


Figure 6.4 : L'influence du NaOH sur la Fluvastatin sodique après 4h.

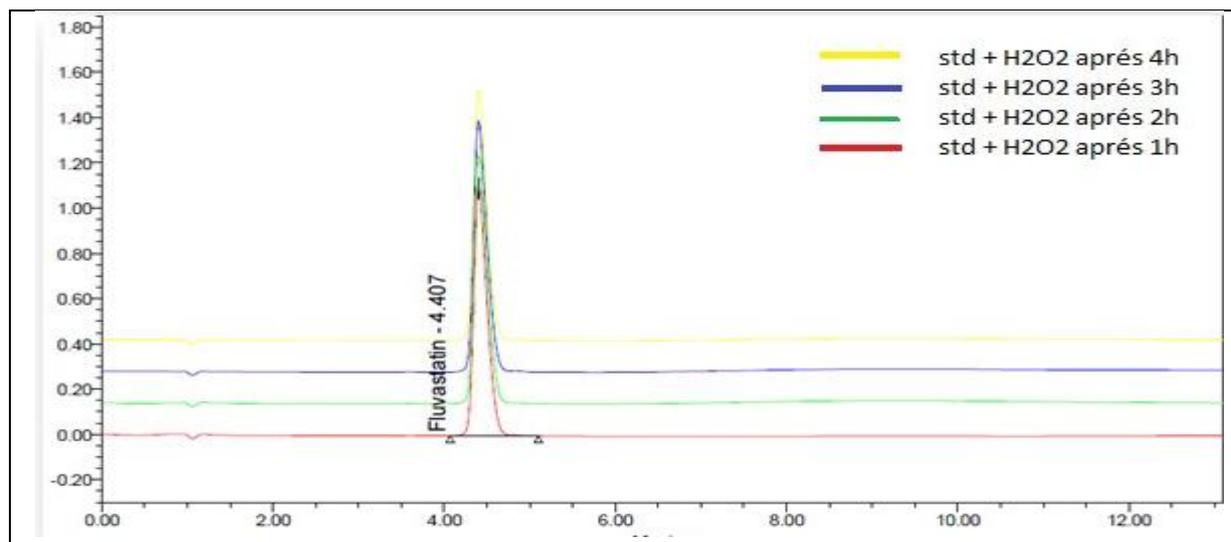


Figure 6.5 : L'influence de l'H₂O₂ sur la fluvastatin sodique après 4h.

Les résultats montrent que la température n'influence pas le temps de rétention et la surface des pics de Fluvastatin sodique. (voir le Tableau 6.1 (annexe A) , Figure 6.2)

De même, la dégradation dans le milieu basique (voir le Tableau 6.1 (annexe A) , Figure 6.4) et dans le milieu oxydant (voir le Tableau 6.1 (annexe A) , Figure 6.5) n'a pas influencé l'éluion de notre produit dans nos conditions chromatographiques, néanmoins dans le milieu acide aucun pic n'a été observé au temps de rétention de la Fluvastatin sodique (voir Le Tableau 6.1 (annexe A) , Figure 6.3) , ce qui montre une dégradation totale dans ce milieu et une apparition de plusieurs pics éventuellement liée au produit de dégradation et dont les temps de rétention sont distincts de celui du pic principal ce qui démontre la bonne spécificité de la méthode.

6.2. Linéarité :

Dans le tableau 6.3 présenté dans l'annexe B, on montre que le coefficient de variation de chaque niveau est inférieur à 2.0%, ce qui répond aux critères d'acceptation donnés par l'ICH. [15]

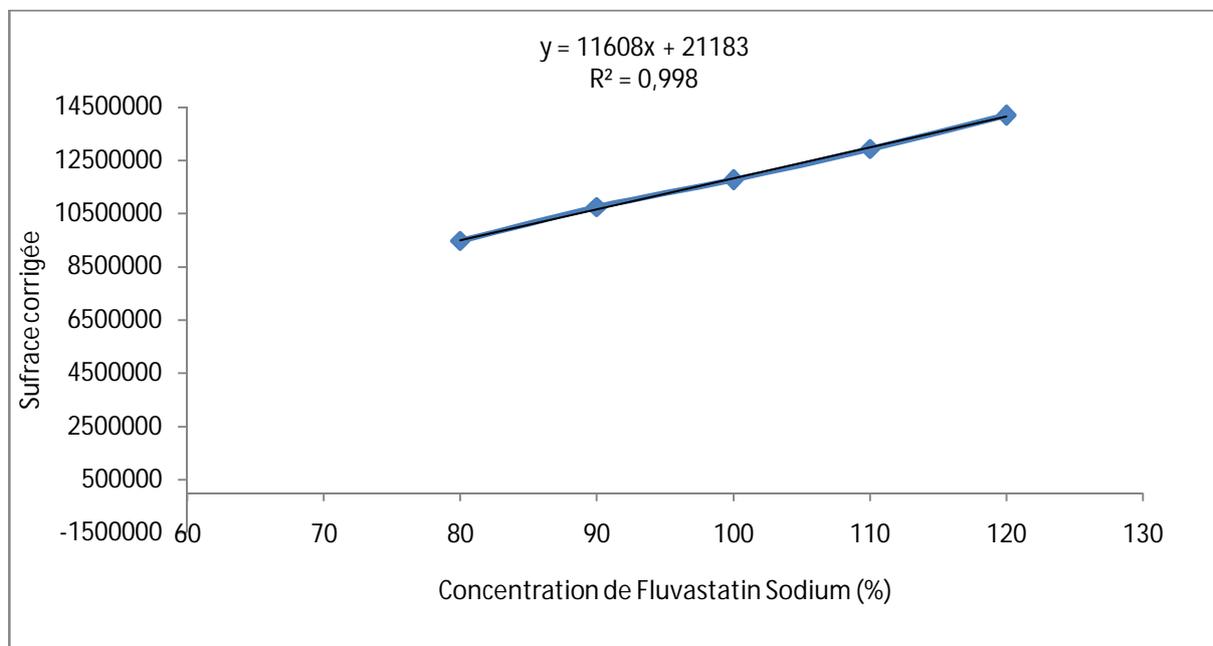


Figure 6.6 : La linéarité de la méthode

Les surfaces obtenues dans l'étude de la linéarité sont résumées dans le tableau 6.2 Annexe B le tracé des surfaces en fonction des concentrations représenté par la Figure 6.6 de la linéarité de la méthode montre une droite linéaire de coefficient de corrélation proche de 1 (0,999).Ce qui montre la bonne linéarité de la méthode.

6.3. Exactitude :

Les résultats du test de l'exactitude pour Fluvastatin Sodium (Tableau 6.4) montrent que les valeurs du coefficient de variation sont conformes à la norme exigée par l'ICH (CV < 2,0 %, et le recouvrement entre 98% et 102%). Ce qui nous mène à conclure que la méthode est exacte pour le Fluvastatin Sodium.

Tableau 6.4 : Les résultats du test de justesse (exactitude).

Préparation	Masse théorique de Fluvastatin Sodium (mg)	Surface moyenne	CV%	Recouvrement		
Standard	42,27	11900542	0,12240	100,1		
Niveau 1 (80%)	1	33,57	1,02450	100,1		
	2	33,57		94,4	S	1,04726
	3	33,63		96,4	Moyenne	100,62860
					CV%	1,04072
Niveau 2 (100%)	1	41,94	0,64248	100,1		
	2	41,91		99,1	S	0,71098
	3	41,95		98,7	Moyenne	99,30830
					CV%	0,71593
Niveau 3 (120%)	1	50,48	0,66240	100,0		
	2	50,47		98,6	S	0,72067
	3	50,47		99,1	Moyenne	99,24773
					CV%	0,72613
S : écart-type						
CV : coefficient de variation					S	0,99354
					Moyenne	99,72821
					CV %	0,99624

6.4. Précision :

6.4.1. Répétabilité :

Les résultats de l'étude de la répétabilité (Tableau 6.5) montrent que les valeurs des coefficients de variation sont inférieures à 2,0% et le recouvrement est dans l'intervalle exigé, ce qui prouve que la méthode est répétable pour ce principe actif.

Tableau 6.5 : Les résultats de la répétabilité.

injection	Surface	Temps de rétention
1	11743073	4.100
2	11757947	4.080
3	11752253	4.057
4	11762473	4.059
5	11783202	4.066
6	11766743	4 .064
7	11787840	4.061
8	11779324	4.061
9	11757936	4 .063
10	11755590	4.059
S	114521.02608	0.01327
X	11764638.1	4.067
Cv	012343	0.32620

6.4.2. Précision intermédiaire :

Les valeurs de l'étude de la précision intermédiaire sont regroupées dans le tableau 6.6.

Tableau 6.6 : Résultats de l'étude de la précision intermédiaire.

Analyste	Préparation	Dosage moyen %		
1	1	103.9106920		
	2	102.2905057		
	3	107.7915894		
	4	103.7456632	S	2.010609203
	5	106.1968139		104.9796519
	6	105.9426474	CV%	1.91524
2	1	103.5064912		
	2	103.758654		
	3	103.8355247		
	4	103.0226304	S	0.3494160022
	5	103.6355502		103.4705129
	6	103.0642268	CV%	0.33770
S		1.585608765		
X		104.2250824		
CV %		1.2133		

Les résultats montrent que les valeurs des coefficients de variation pour les deux analystes sont strictement inférieures à 2,0% et le recouvrement est dans l'intervalle exigé, ce qui prouve que la méthode a une précision intermédiaire correcte.

Vu que les études de la répétabilité et de la précision intermédiaire sont conformes, ce qui nous mène à conclure que cette méthode de dosage est précise.

6.5. Robustesse :

L'étude de la robustesse de la méthode a été réalisée en deux parties, la première partie concerne le changement des paramètres chromatographiques et la deuxième partie concerne l'étude de la stabilité des échantillons pendant 3 jours (72 h).

6.5.1. Changement des paramètres chromatographiques :

Concernant les changements des paramètres chromatographiques (à savoir pH, débit, longueur d'onde, phase mobile), les résultats des différents essais sont résumés dans les tableaux 6.7 ; 6.8 ; 6.9 ; 6.10 ; 6.11 Annexe B et représentés par les figures suivantes :

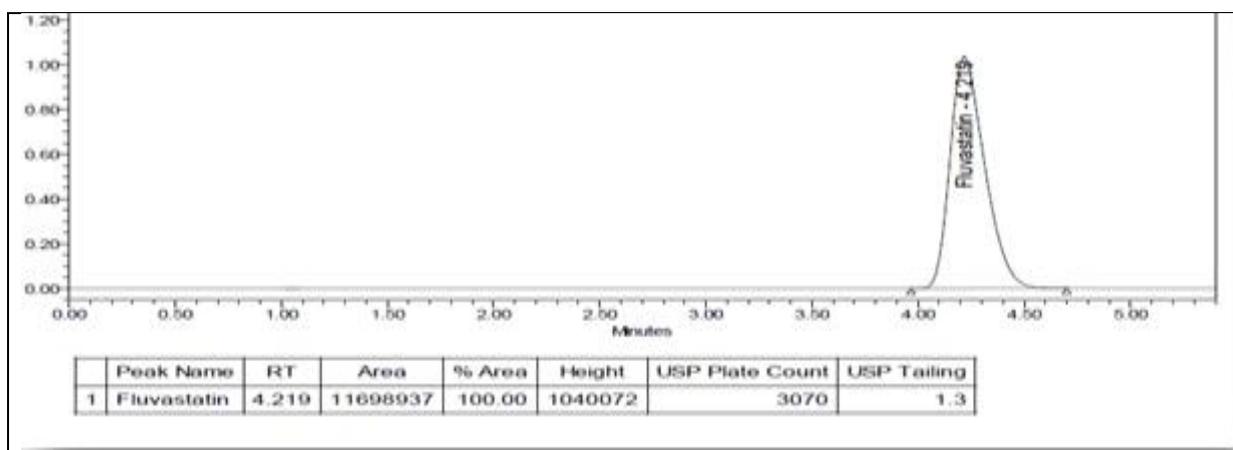


Figure 6.7 : Chromatogramme de Fluvastatin sodique dans les conditions normales.

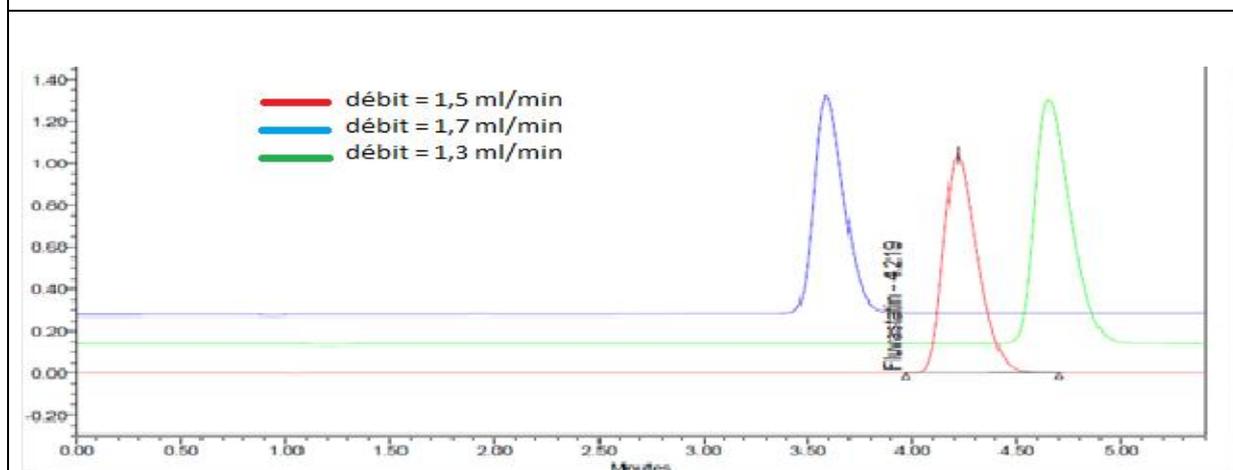


Figure 6.8 : Chromatogramme de comparaison de 3 débits.

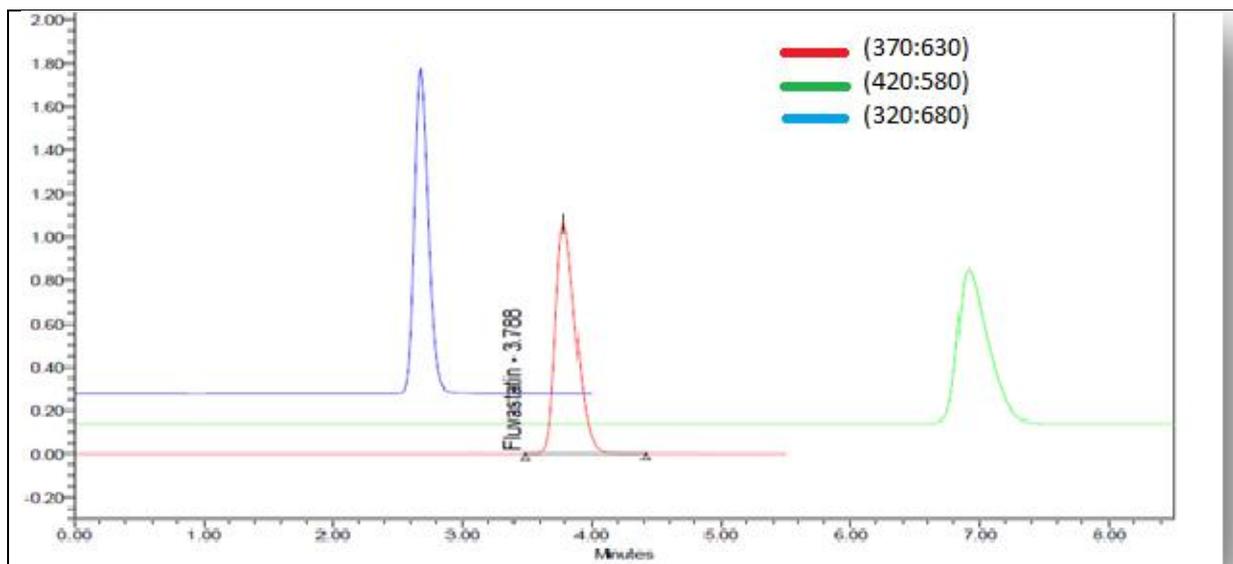


Figure 6.9 : Chromatogramme de comparaison des 3 proportions de la phase mobile

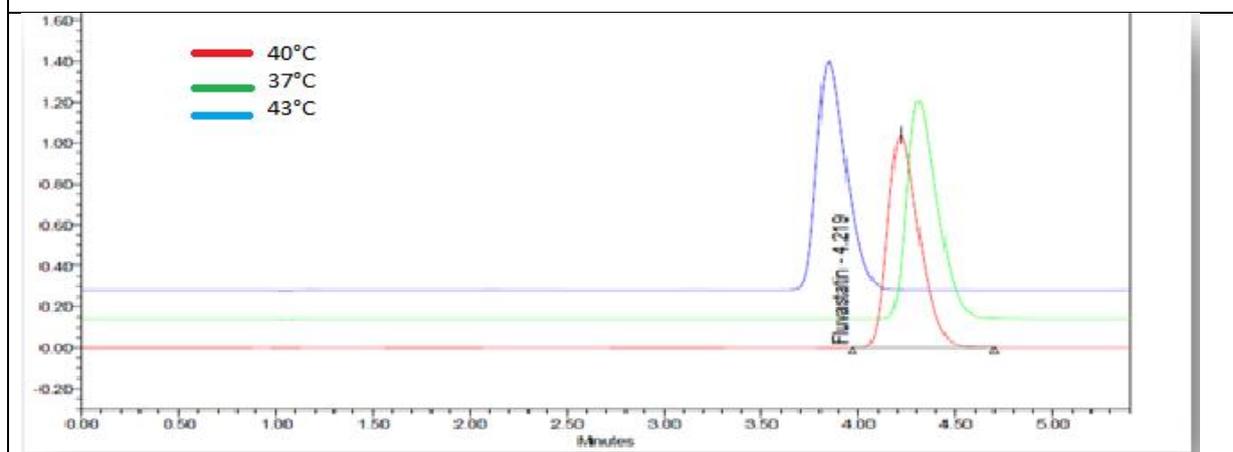


Figure 6.10 : Chromatogramme de comparaison des 3 proportions de la température de la colonne

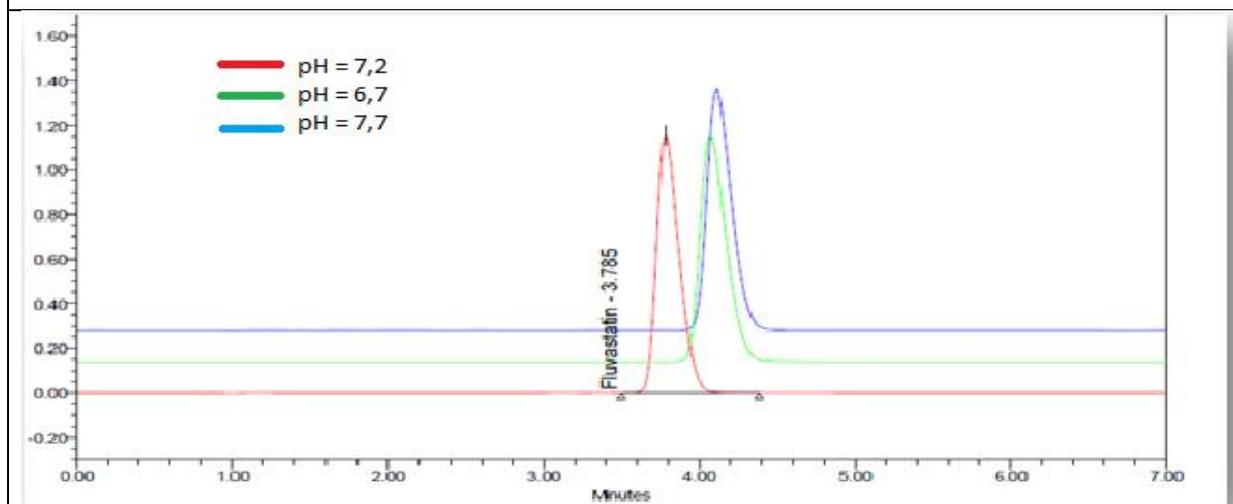


Figure 6.11 : Chromatogramme de comparaison des 3 valeurs de PH du tampon.

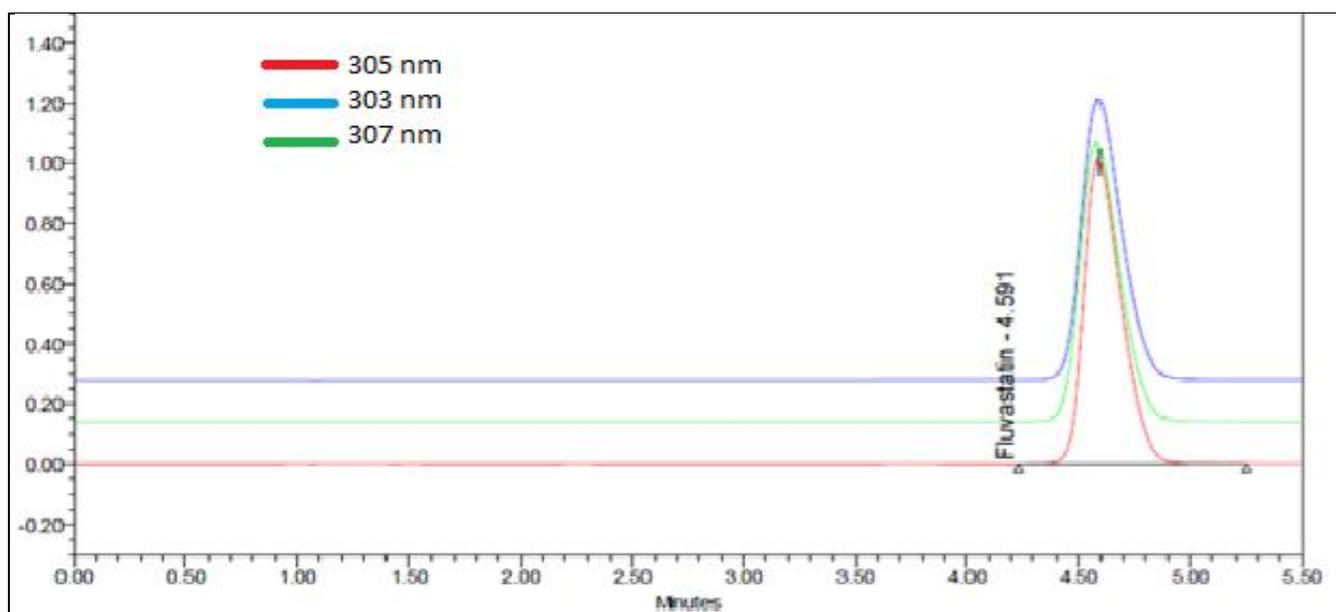


Figure 6.12: Chromatogramme de comparaison des 3 valeurs de la longueur d'onde

A la lumière des résultats de l'étude de la robustesse de la méthode, nous remarquons que les variations des paramètres de l'efficacité de la colonne à savoir le nombre de plateau théoriques (N) et la symétrie des pics (f) ne sont pas très importantes on fonction des changements réalisés.

Concernant le changement de la longueur d'onde (tableau 6.8 annexe B, figure 6.12) aucune variation n'a été observée, mais une légère variation du temps de rétention de se produit est observée dans le cas de changement de la température de la colonne (tableau 6.9 figure 6.10) et du pH de la solution tampon (tableau 6.10 annexe B, figure 6.11) alors que les surfaces sont restées presque les mêmes.

Mais en ce qui concerne le temps de rétention et la surface du pic de la Fluvastatin sodique, une variation très importante a été observée dans le cas du changement des proportions de la phase mobile (5%) (Tableau 6.11 annexe B, figure 6.9) et du débit de la phase mobile ($\pm 0,2$ ml/min) (tableau 6.7 annexe B, figure 6.8).

On finalité, nous pouvons déduire que la méthode n'est pas très robuste et les deux paramètres les plus importants à maîtriser lors de manipulation sont le débit et la polarité de la phase mobile.

6.5.2. Etude de stabilité :

Du fait de la sensibilité de la Fluvastatine référence, une étude de stabilité de ce composé a été évaluée afin de déterminer avec précision les paramètres influençant sa dégradation et ainsi définir les conditions de conservation.

Les résultats des 2 essais réalisés au réfrigérateur et dans l'injecteur automatique de l'appareillage (HPLC) (conditions réelles ou peuvent séjournées en général les solutions) sont résumés dans (le tableau 6.12 -6.13)

➤ Stabilité dans le réfrigérateur :

Tableau 6.12: Résultats de la stabilité des échantillons dans le réfrigérateur.

Echantillon	Initial	Après 24h		Après 48 h		Après 72h	
	Dosage %	Dosage %	CV%	Dosage %	CV%	Dosage %	CV%
1	105,0226	103,3349	1,1455	103,7116	0,8882	104,0817	0,6363
2	103,0621	103,4960	0,2970	103,7085	0,4420	104,3818	0,8996
3	107,6184	103,0809	3,0455	103,2277	2,9449	103,7325	2,600
4	102,7934	102,9472	0,1057	102,4760	0,2186	102,7047	0,0610
5	108,4478	102,4247	4,0393	102,6222	3,9032	103,1435	3,5452
6	103,4620	102,2433	0,8378	102,2909	0,8048	102,6786	0,5374

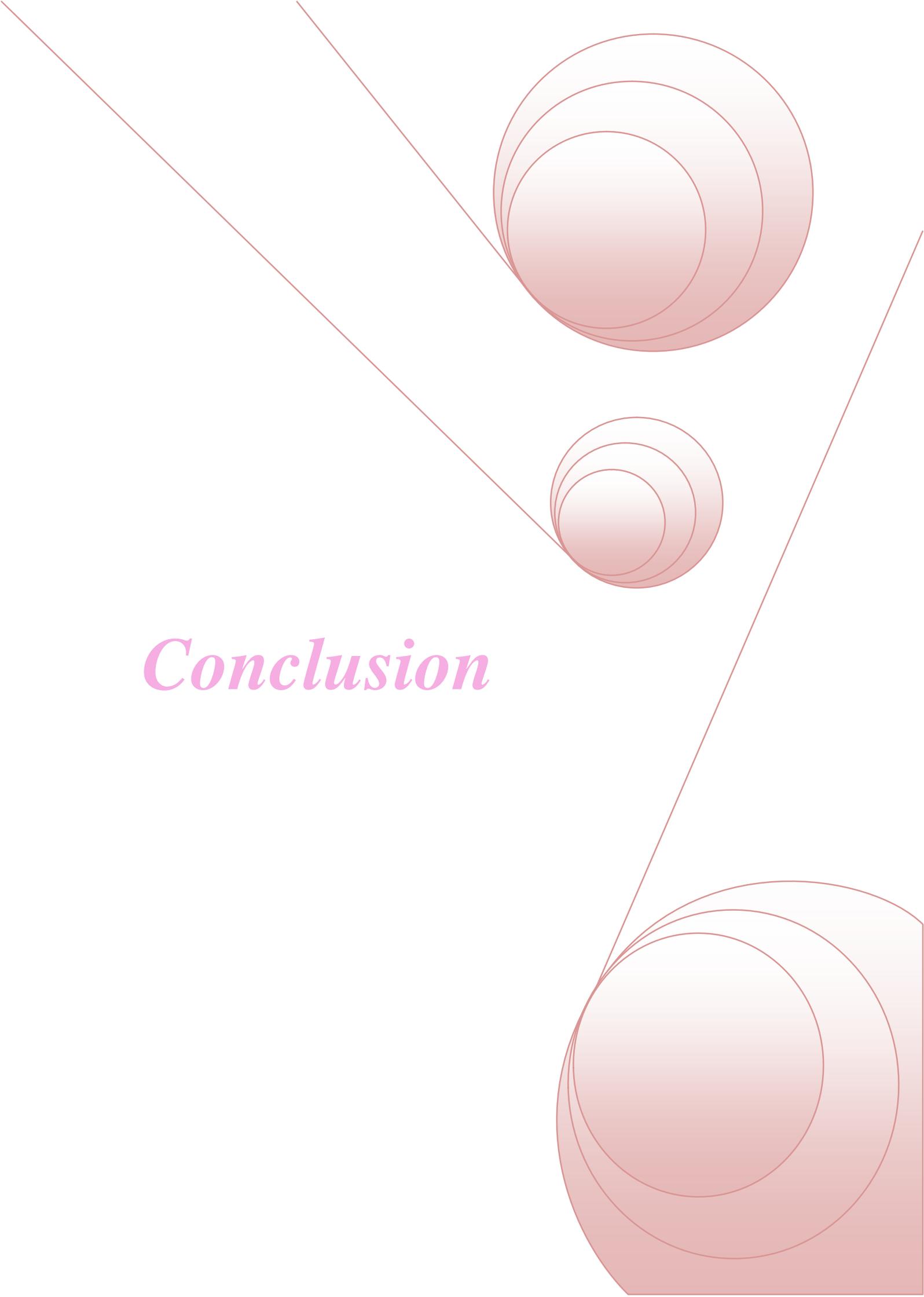
➤ Stabilité dans l'auto-injecteur de l'HPLC :

Tableau 6.13 : Résultats de la stabilité des échantillons dans l'auto-injecteur de l'HPLC.

Echantillon	Initial	Après 24h		Après 48 h		Après 72h	
	Dosage %	Dosage %	CV%	Dosage %	CV%	Dosage %	CV%
1	105,0226	103,1163	0,0201	104,6451	0,2546	104,4669	0,5646
2	103,0621	100,8180	1,5566	102,2072	0,5890	102,0426	1,0542
3	107,6184	105,8146	1,1952	107,6226	0,0027	107,7546	0,1343
4	102,7934	101,5140	0,8856	102,4268	0,2526	102,6083	0,1912
5	108,4478	106,3123	1,4062	107,9884	0,3001	107,5132	0,9178
6	103,4620	101,5122	1,3452	103,5498	0,0600	103,8028	0,3495

Les valeurs obtenus des temps de retentions, et des surfaces montrent une variation négligeable avec celle d'une référence fraîchement préparée (voir les figures 6.13 ; 6.14 ; 6.15 ; 6.16 ; 6.17 ; 6.18 ; 6.19 annexe C), les solutions sont restées stables dans ces deux conditions de conservations.

La Fluvastatin sodique doit être conservée dans des contenants serrés résistant à la lumière, à l'abri de l'humidité et stocker à une température ne dépassant pas 40°C. [13]

The background features a white page with three decorative elements: a large sphere at the top right, a smaller sphere in the middle right, and a large, partially cut-off sphere at the bottom right. Two thin red lines originate from the top left and extend towards the spheres, and another red line extends from the top right towards the bottom right sphere. The word "Conclusion" is centered on the page in a purple, italicized serif font.

Conclusion

Conclusion générale

Dans une industrie pharmaceutique, l'assurance de la qualité se trouve à un haut niveau sur les plans de la gestion (organisationnel) et réglementaire.

Attendre une qualité escomptée d'un service (mode opératoire, procédé, manipulation, analyse...) et d'une façon répétée n'est possible que par les validations, qui sont un moyen de prouver par le biais de paramètres statistiques que les écarts observés sont ou ne sont pas significatifs.

L'ICH fournit une méthodologie des plus complètes, pour réaliser ces essais de validation que nous avons appliqués dans cette étude au produit Fluvastatin Sodique, principe actif contenu dans un comprimé pelliculé à libération prolongée (Fluvacol 80 mg fabriqué par El KENDI) en utilisant la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) comme méthode analytique.

Tous les paramètres de validation qui ont été évalués ont montré des résultats très satisfaisants :

- Une bonne linéarité avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9984$.
- La spécificité par rapport au placebo est dans le domaine des concentrations choisies.
- Une bonne précision avec des coefficients de variation $< 2,0\%$.
- Une exactitude avec un recouvrement dans les normes.
- A l'exception de la robustesse de la méthode, la réalisation de ce test a pu démontrer que de faibles variations aux niveaux des conditions opératoires peuvent influencer la qualité de l'analyse et spécialement la polarité de la phase mobile.

Ceci est attribué en grande partie au produit Fluvastatin sodique lui-même qui est très sensible et doit être manipulé et conservé dans des conditions très strictes lors de son analyse.

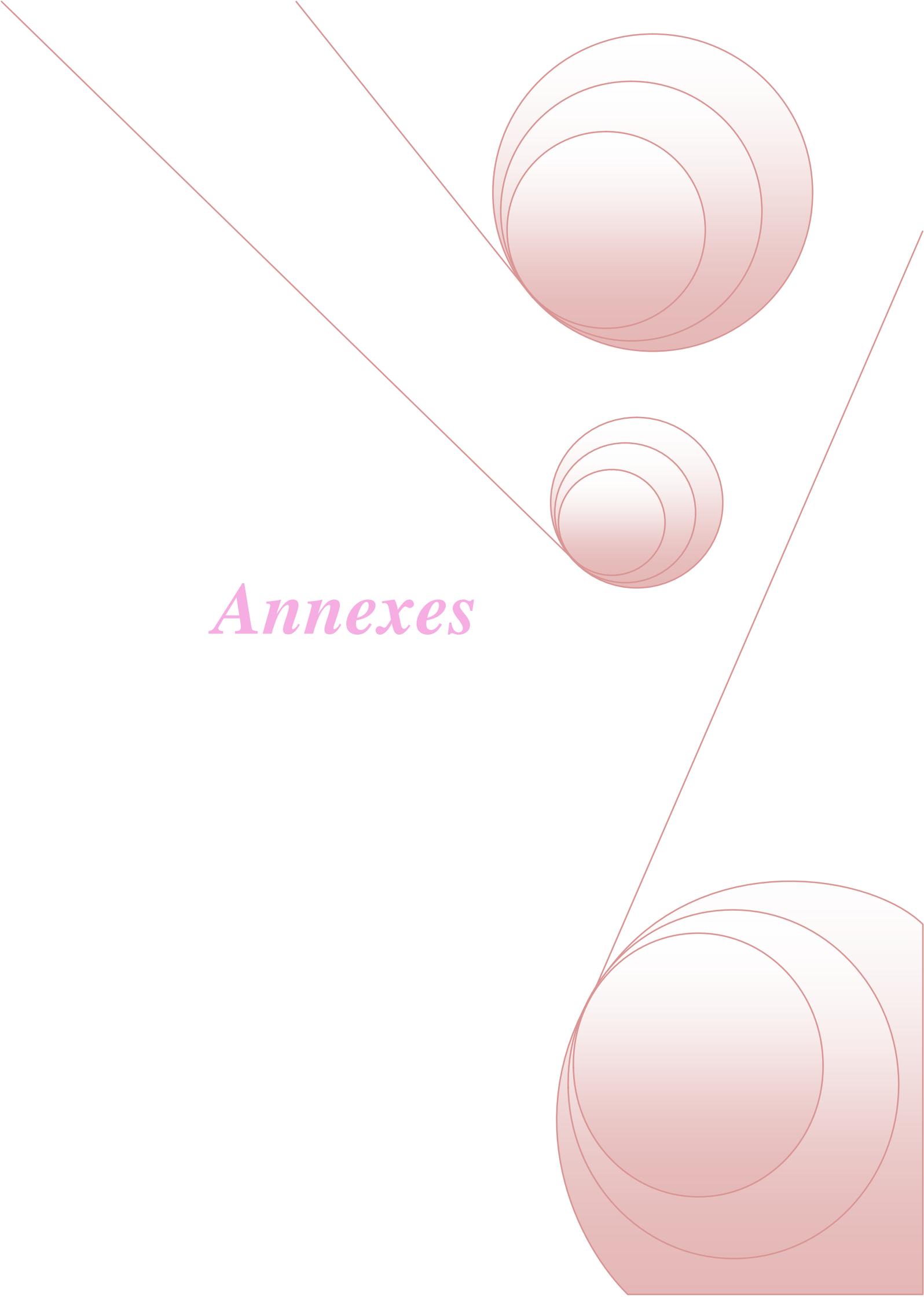
Sur la base de ces paramètres, nous pouvons dire que la robustesse de la méthode est limitée et qu'il est très important de travailler dans des conditions très strictes.

Nous retenons dans cette étude, que la méthode proposée pour l'analyse de dosage de Fluvastatin sodique, principe actif contenu dans le Fluvacol 80 mg, comprimés pelliculés à libération prolongée est validée tout en tenant compte des précautions à prendre lors des essais de manipulations surtout en ce qui concerne la préparation de la phase mobile.

Perspectives :

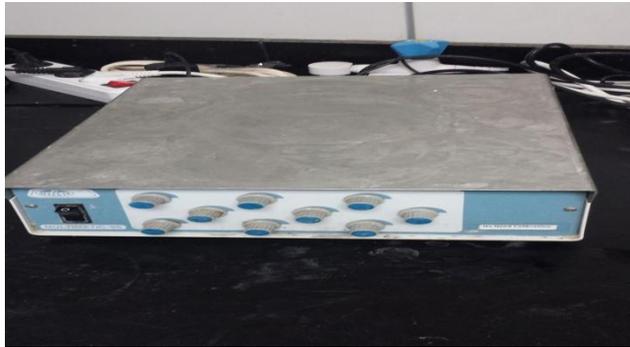
Il serait intéressant de vérifier l'influence d'autres paramètres qui ont gêné énormément l'analyse de la Fluvastatin sodique :

- La phase stationnaire (longueur de la colonne, son diamètre et sa granulométrie).
- La filtration des solutions (millipores)



Annexes

Annexe A

	
<p>Balance (MS105DU METTLER TOLEDO) Etendue de la pesée : [45 mg - 120g] Précision de la lecture (mg) : 0.0001 mg</p>	<p>Balance (SARTIOUS ED 124S) Etendue de la pesée : [0.1 mg - 120 g] Précision de la lecture (mg) : 0.1 mg</p>
	
<p>pH-Mètre (METTLER TOLEDO SEVENEASY). Domaine du pH : 0.00-14.00. Précision relative pH: ± 0.004. Echelle de mesure de température °C : 5.0 à 105.0. Précision de température °C : ± 0.5.</p>	<p>Bain ultrason SONOREX DIGITAL. Bain marie BIOCOTE</p>
	
<p>Centrifugeuse</p>	<p>Agitateur magnétique</p>

Figures 5.4. Autres appareillages

Annexe B

Tableau 6.1 : Etude de la dégradation forcée pour la Fluvastatin sodique

		Temps de rétention (min)	Recouvrement	Surface	Recouvrement
Conditions normales		4,521		12315395	
Effet de la chaleur (60°C)	1 h	4,389	2,919708029	11576347	6,00100549
	2h	4,385	3,00818403	11684553	5,122381585
	3h	4,381	3,096660031	11771837	4,413642616
	4h	4,383	3,052422031	11770496	4,424531427
Dégradation acide (HCl 0,1N) à 60°C	1h	Pas de pic	Pas de pic	Pas de pic	Pas de pic
	2h	Pas de pic	Pas de pic	Pas de pic	Pas de pic
	3h	Pas de pic	Pas de pic	Pas de pic	Pas de pic
	4h	Pas de pic	Pas de pic	Pas de pic	Pas de pic
Dégradation basique (NaOH 0,1N) à 60°C	1h	4,384	3,030303030	12409372	-0,763089644
	2h	4,388	2,941827029	11805520	4,1401394
	3h	4,39	2,897589029	12092998	1,805841461
	4h	4,392	2,853351029	12163062	1,236927489
Oxydation (H2O2 15%) à 60°C	1h	4,407	2,521566025	11950155	2,965714984
	2h	4,406	2,543685025	11937568	3,067920398
	3h	4,405	2,565804026	12128586	1,516869801
	4h	4,405	2,565804026	11934527	3,092613071

Annexe B

Tableau 6.2 : Résultat de la linéarité de la méthode.

Concentration théorique de Fluvastatin Sodium en (mg/ml)	La surface
0.08	9455396
0.09	10734069
0.10	11744835
0.11	12901530
0.12	14166119

Annexe B

Tableau 6.3: les valeurs du test de la linéarité.

préparation		Masse théorique de Fluvastatin Sodium (mg)	Masse réelle de Fluvastatin Sodium (mg)	Masse de Fluvastatin Sodium (mg)	Concentration de Fluvastatin Sodium (mg)	surface	Surface corrigée	Surface/ concentration	Paramètres	résultats
Niveau 1 a 80%	1	42	41,93	33,62	0,3362	9516274	9532160,434	2835264852		
	2			33,56	0,3356	9477268	9493089,316	28239773,54	S	74393,47232
	3			33,57	0,3357	9372647	9388293,656	2796632010	Moyenne	9471181,135
									% CV	0,785471962
Niveau 2 a 90%	1			37,83	0,3783	10604757	10622461,1	2807946366		
	2			37,8	0,378	10816440	10834497,5	2866269179	S	113569,4534
	3			37,84	0,3784	10781011	10799009,35	2853860822	Moyenne	10751989,32
									% CV	1,056264567
Niveau 3 a 100%	1			42,14	0,4214	11730120	11749702,84	2788254114		
	2			42,04	0,4204	11678291	11697787,31	2782537420	S	75117,93875
	3			42,14	0,4214	11826095	11845838,06	2811067409	Moyenne	11764442,74
									% CV	0,638516761
Niveau 4 a 110%	1			46,3	0,463	12792640	12813996,66	2767601871		
	2			46,19	0,4619	12940989	12962593,32	2806363568	S	95644,60917
	3			46,24	0,4624	12970962	12992616,36	2809821877	Moyenne	12923068,78
							% CV	0,740107561		
Niveau 5 a 120%	1	50,45	0,5045	14060227	14083699,83	2791615428				
	2	50,41	0,5041	14187835	14211520,87	2819186842	S	97039,1484		
	3	50,5	0,505	14250296	14274086,14	2826551712	Moyenne	14189768,95		
							% CV	0,683867008		
								S	719148453,8	
								Moyenne	2626080883	
								CV%	27,38485545	

Annexe B

Tableau 6.7 : Résultats de robustesse pour les changements du débit.

	Fluvastatin sodium			
		N	f	surface
Conditions initiales (F= 1,5 ml/mn)	4.167	3338	1.4	11720619
F= 1,3 (ml/min)	4.628	3523	1.4	13731536
CV %	7,41276239	3,81328537	0,0	11,1733804
F= 1,7 (ml/min)	3.584	2911	1.3	10391901
CV %	10,637163	9,66345321	5,23782801	8,49786011

Tableau 6.8 : Résultats de robustesse pour les changements de la longueur d'onde.

	Fluvastatin sodium			
	t _r	N	F	surface
Conditions initiales (λ= 305 nm)	4.592	3463	1.3	11569302
λ= 303 nm	4.598	2949	1.3	11555326
CV %	0,09233168	11,3366465	0,0	0,08547186
λ= 307 nm	4,590	2963	1.3	11531985
CV %	0,03080404	11,0038404	0,0	0,22844704

Tableau 6.9 : Résultats de robustesse pour le changement de la température de la colonne.

	Fluvastatin sodium			
	t _r	N	f	surface
Conditions initiales (T= 40°C)	4.167	3338	1.4	11720619
T= 37°C	4.292	3444	1.4	11733129
CV %	2,08980607	2,21036033	0,0	0,0754328
T= 43°C	3.847	3205	1.3	11824831
CV %	5,64697205	2,8746814	5,23782801	0,6259300

Annexe B

Tableau 6.10 : Résultats de robustesse pour le changement du pH de la solution tampon.

	Fluvastatin sodium			
	t _r	N	f	surface
Conditions initiales (pH= 7,2)	3,787	3089	1,3	11735940
pH= 7,7	4,095	3114	1,3	11915175
CV %	5,52623417	0,56997161	0,0	1,071732
pH= 6,7	4,081	2948	1,4	11865971
CV %	5,2844279	3,30303317	5,23782801	0,77913862

Tableau 6.11 : Résultats de robustesse pour le changement des proportions de la phase mobile.

	Fluvastatin sodium			
	t _r	N	f	surface
Conditions initiales Phase mobile (37 :63)	3,815	2770	1,4	11729000
Phase mobile (32 :68)	2,683	2711	1,2	11454151
CV %	24,6366536	1,5223244	10,8785659	1,67662792
Phase mobile (42 :58)	6,915	3752	1,5	11704216
CV %	40,8579874	21,2934333	4,87659849	0,14957345

Annexe C

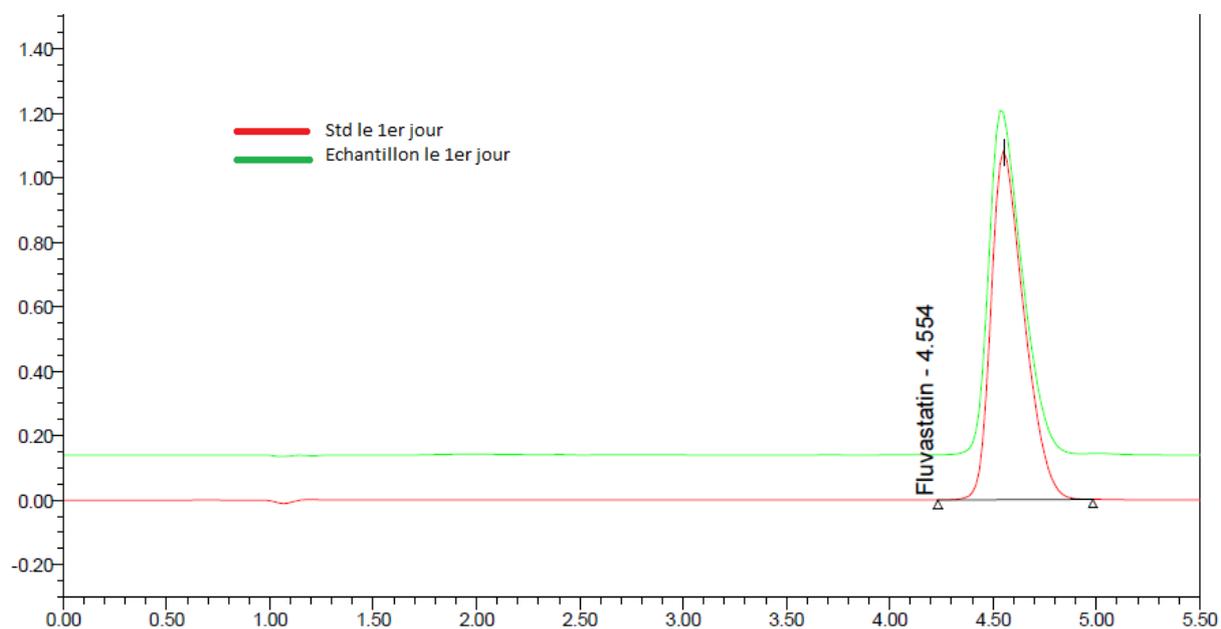


Figure 6.13: Comparaison entre le standard et l'échantillon le 1^{er} jour.

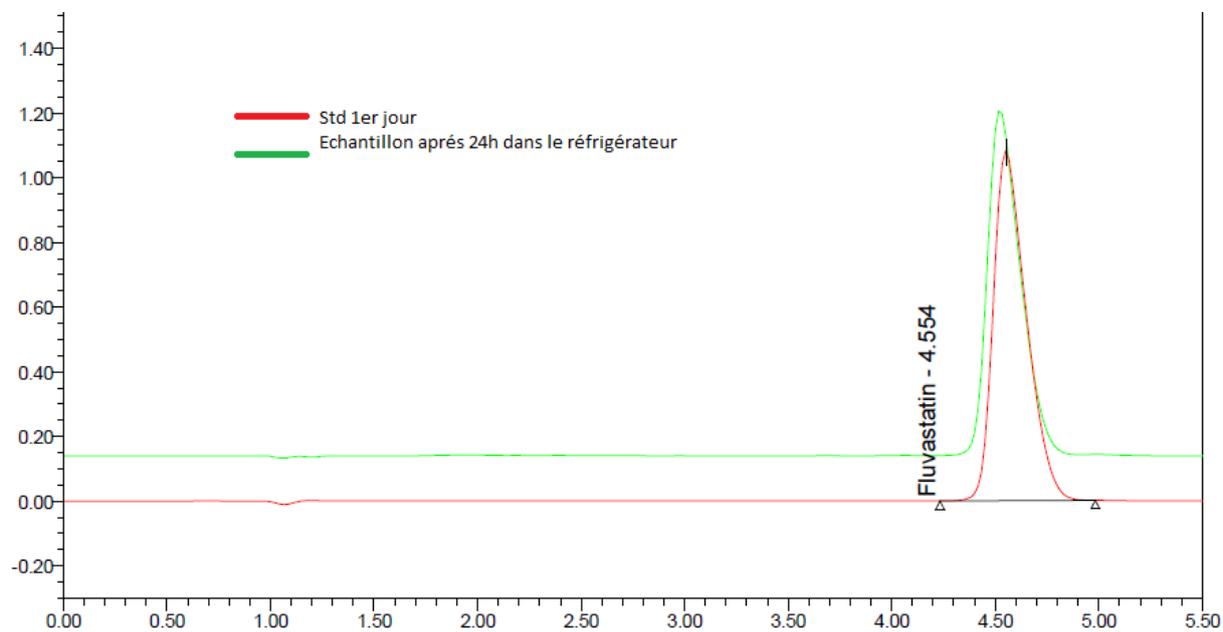


Figure 6.14 : Comparaison entre le standard le 1^{er} jour et l'échantillon après 24h dans le réfrigérateur.

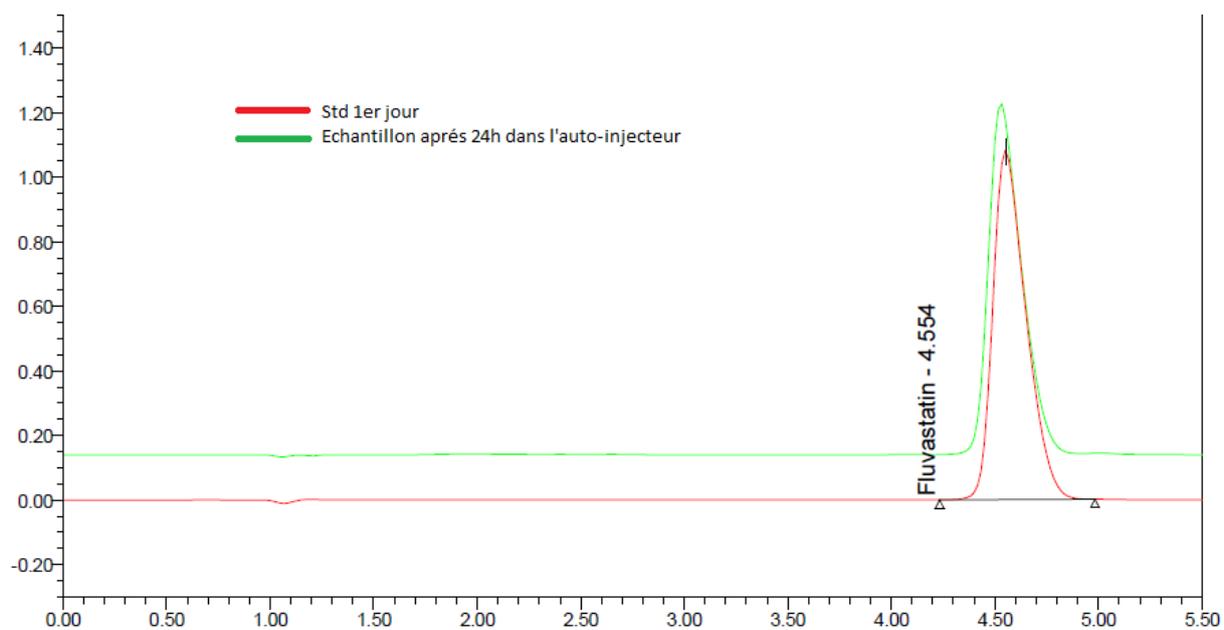


Figure 6.15: Comparaison entre le standard le 1^{er} jour et l'échantillon après 24h dans l'auto-injecteur.

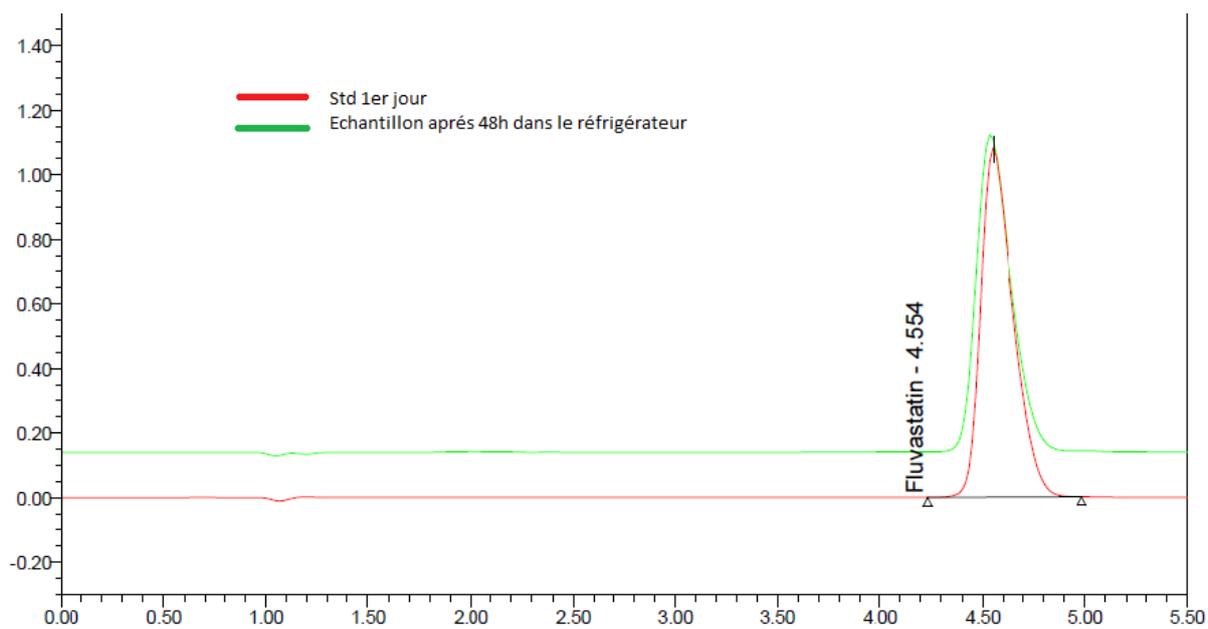


Figure 6.16: Comparaison entre le standard le 1^{er} jour et l'échantillon après 48h dans le réfrigérateur.

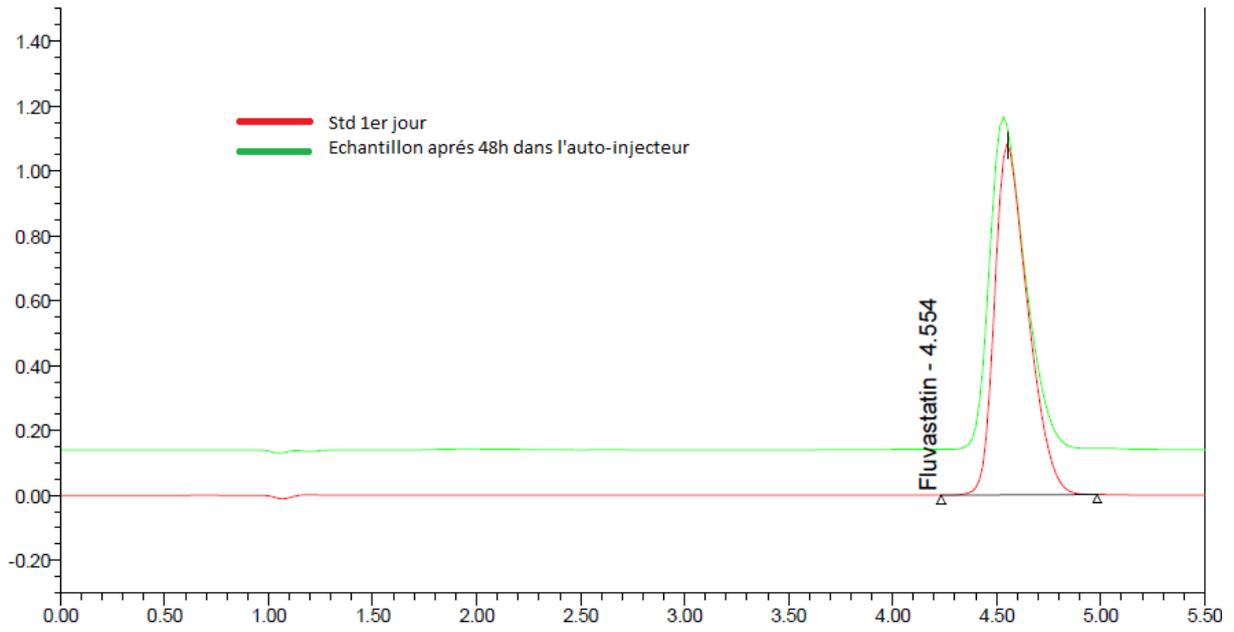


Figure 6.17: Comparaison entre le standard le 1^{er} jour et l'échantillon après 48h dans l'auto-injecteur.

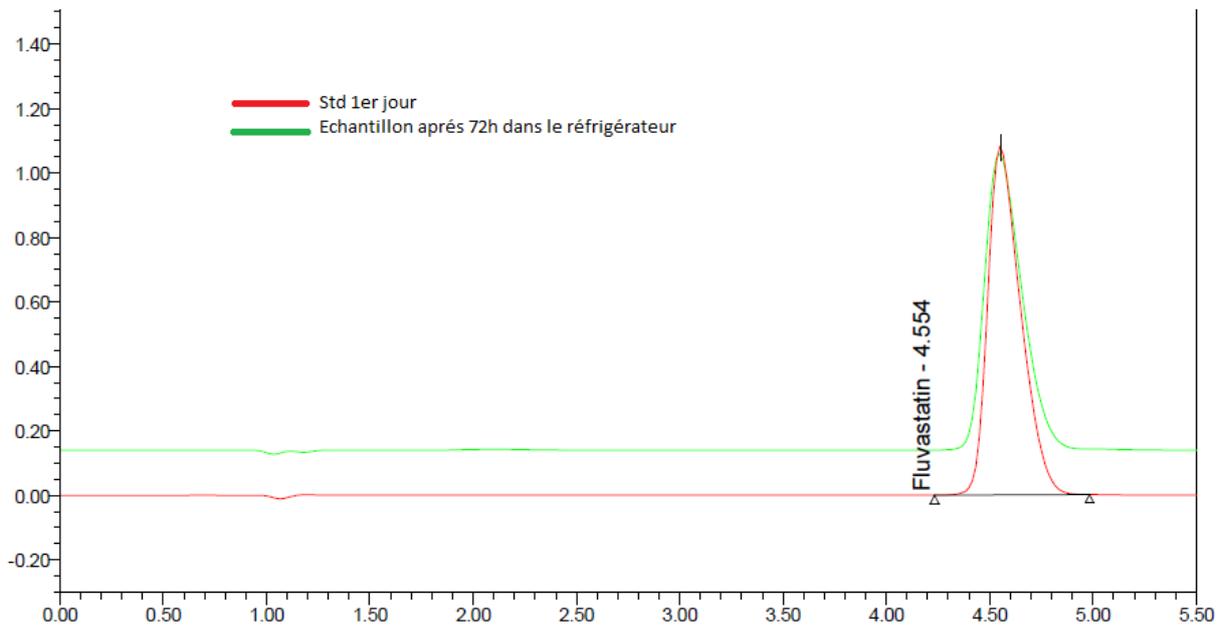


Figure 6.18: Comparaison entre le standard le 1^{er} jour et l'échantillon après 72h dans le réfrigérateur.

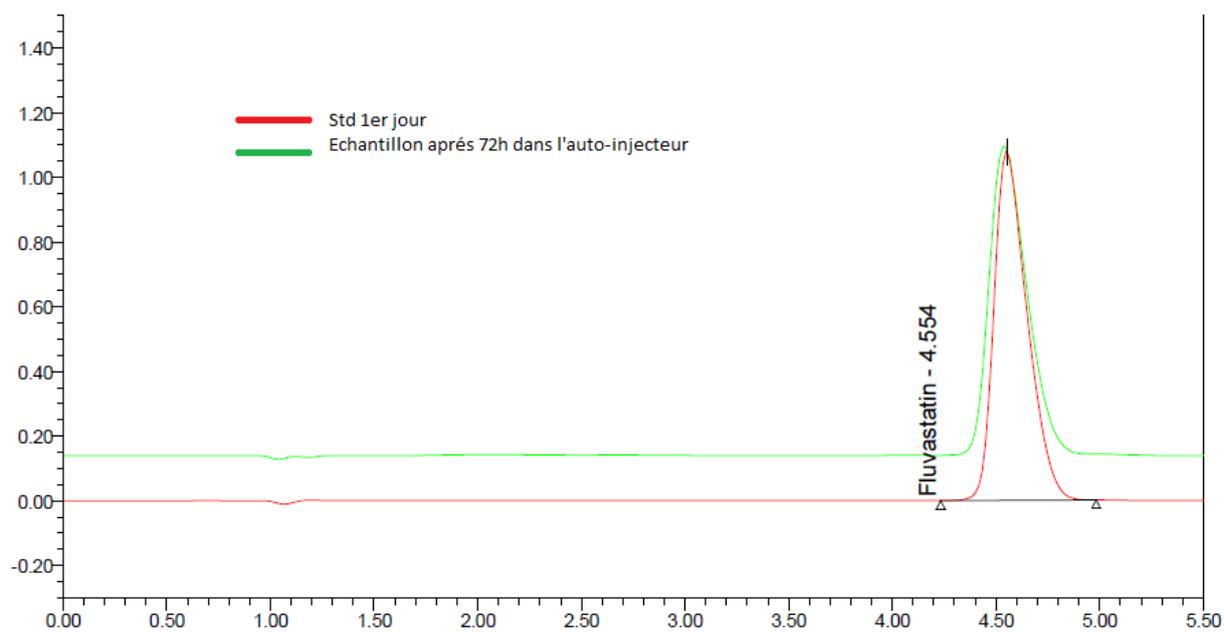
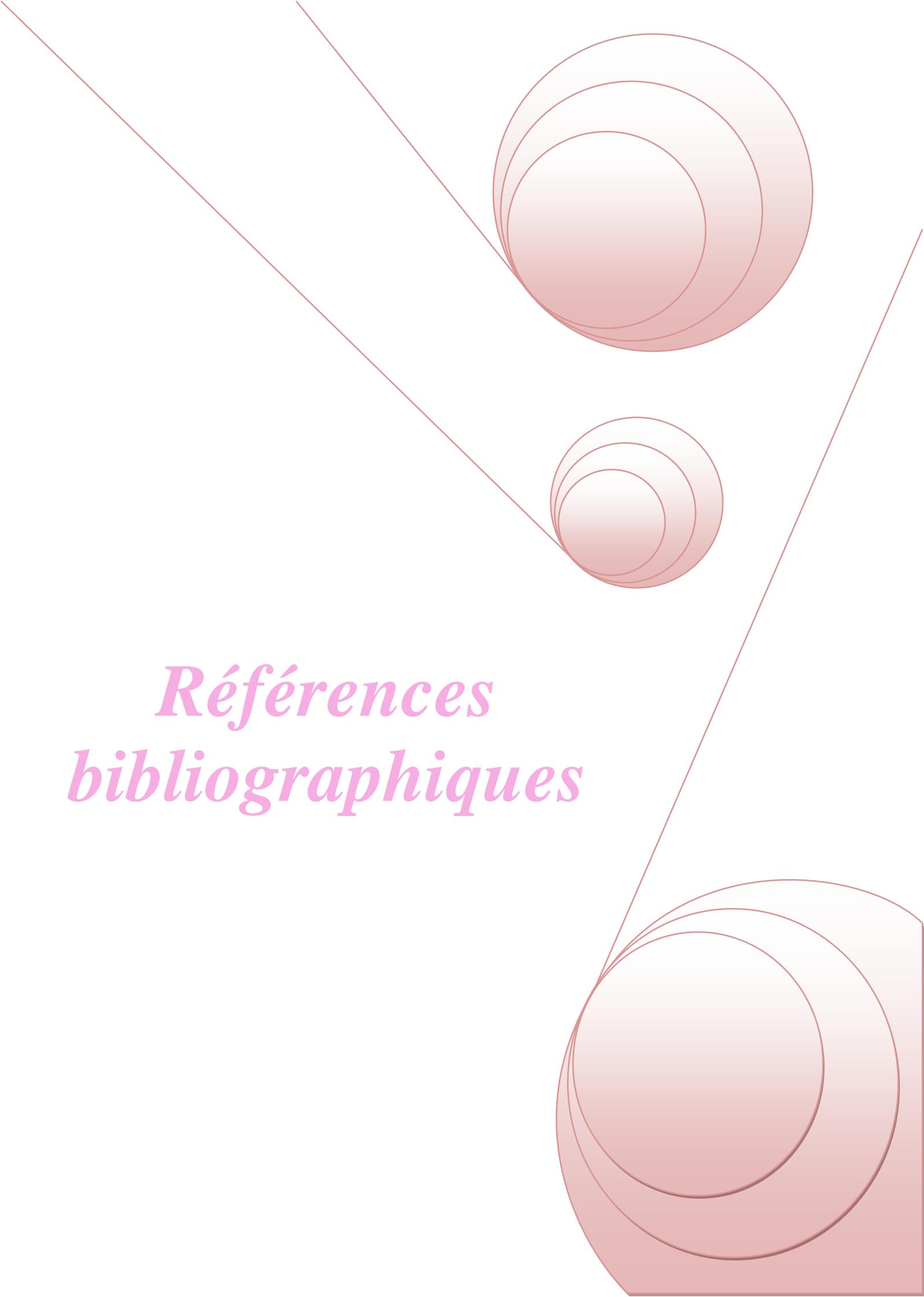


Figure 6.19: Comparaison entre le standard le 1^{er} jour et l'échantillon après 72h dans l'auto-injecteur.



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- [1] Le Hir.A : pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 1998 (Edition MASSON).
- [2] Marianne RAYNAUD. 2011. Validation du procédé de fabrication dans l'industrie pharmaceutique, appliquée aux formes solides orales. Thèse doctorat : pharmacie. Université de LIMOGES.
- [3] Abrégés de pharmacie galénique ; III Masson ; 9^{ème} édition 2006.
- [4] (HALALI.A.E.K docteur en médecine, pharmacologie 2ème édition 1983. Fondamentale et clinique).
- [5] ALLAIN « pharmacologie : les médicaments », édition : ESTEM, paris, 1996.
- [6] Martine ANDRE : www.santepratique.fr.
- [7] Le Hir.A : pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 2001 (8^{ème} édition).
- [8] Le Hir. A, Chaumeil. J.C., Brossard. D. 2009. Pharmacie galénique : Bonne Pratique de Fabrication des médicaments, 9eme édition, Ed Masson.
- [9] Tournier. N., Legrand, T., Aichard. D. 2006. Médicament en gériatrie, Ed Lamarre.
- [10] F.C.HUGES ; CL.LE JEUNNE ; S.LA BATIDE ALLANOR, « thérapeutique générale du développement à prescription des médicaments », édition FRISON-ROCHE, PARIS, 1993.
- [11] C.GUICHARD, « élément de théologie pharmaceutique », édition médicales, Flammarion.
- [12] USP : United state pharmacopée 2016 USP 39NF34 , official May 1 2016 to 1 August 2016
- [13] Dr Gérard KIERZEK en collaboration avec Dr Emmanuelle TOUREL et Dr Patrice MARIE. Fiche révisée le 13/05/2014 par Dr. Vincent VUIBLET MCU-PH CHU de REIMS / CNRS UMR 7369 Date : 13/05/2014 ([santé pratique.fr](http://santépratique.fr)).
- [14] Conte, L. 2003. Validation des procédés de nettoyage. Application a un cas concret dans l'industrie pharmaceutique. Thèse doctorat : pharmacie. Nancy Cedex. Page 71
- [15] ICH Harmonised Tripartite Guideline .2005. Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2 (R1).2005

- [16] International Conference on Harmonization (ICH) of technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for human Use, Validation of analytical procedures: methodology, Q2B, Geneva (1996).
- [17] Standard operating procedures à EL kendi.
- [18] Ducauze C.J (2003). Méthodes d'analyse pour la recherche des fraudes alimentaires .In : fraude alimentaires.
- [19] Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A., Wittier, P. 1995. Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse. Ed. Masson, Paris.
- [20] Rosset, R., Caude, M., Jardy, A. 1991. Chromatographies en Phase Liquide et Supercritique. Ed. Masson, Paris.
- [21] Thèse de doctorat. 2013. Stratégie analytique des tradi-médicaments : établissement de profils chromatographiques des métabolites phytochimiques apolaires.
- [22] Caude, M., Jardy, A. 1994. Chromatographie en phase liquide – Théorie et méthodes de séparation. In Techniques de l'Ingénieur, p. 456.
- [23] Professeur Jean Louis CUQ chromatographie liquide, Université MONTPELLIER 2, sciences et techniques.
- [24] USP 39 NF 34 official May 1 2016 to 1august 2016, chromatographie liquid, chapitre 621.
- [25] J-M. Descoutures, le bon usage des médicaments, Frison-roche, paris, 1994.

Liste des abréviations

A : Absorbance.

B % : Proportion de solvant organique dans la phase mobile.

BPF : Bonne pratique de fabrication.

C : La concentration de la solution.

C_s : Concentration du soluté dans la phase stationnaire.

C_m : Concentration du soluté dans la phase mobile.

CL : Chromatographie liquide.

CV : Coefficient de variation.

D : Densité.

FDA : Food and Drug Administration.

h : Hauteur de plateau réduite.

ICH : International Conférence on Harmonisation.

IEC : International Electrotechnical Commission.

ISO: International Organization of Standardization.

l : Longueur du trajet optique.

L : Longueur de la colonne chromatographique.

LNCPP : Laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques.

M : Masse molaire du solvant.

N : Nombre de plateaux théoriques.

QC : Contrôle qualité.

R_s : Facteur de Résolution.

T : Température absolue en Celsius.

t₀ : Temps de rétention nulle.

t_R : Temps de rétention d'un soluté.

nm : Nanomètre ou 10⁻⁹m.

μm : Micromètre ou 10^{-6}m .

mm : Millimètre ou 10^{-3}m .

cm : Centimètre ou 10^{-2}m .

ml/min : Millilitre par minute.

g : Gramme.

g/mol : Gramme par mole.

rpm : Rotation par minutes.

r^2 : Corrélation.

$\%$: Pourcentage.

C° :Degré Celsius.

Lettres grecques :

ε : Coefficient d'extinction molaire du soluté.

δ : écart-type.

ω : Largeur de pic à la base.

λ : Longueur d'onde.

α : Facteur de sélectivité.

-

Dédicace

Je dédie vivement avec tous mes sentiments de joie et de bonheur ce modeste travail comme fruit de toute mes années d'études à :

L'âme de la personne que je souhaitais bien qu'elle soit avec moi aujourd'hui, mais malgré son absence elle restera toujours vivante dans mon cœur et mon esprit, mon très cher papa qui ma indiqué la bonne voie et qui a sacrifié sa vie afin de me voir ici.

Ma chère « MAMAN » pour tous les sacrifices qu'elle a fait afin de voir ma réussite, pour son amour, sa compréhension et ses perpétuels encouragements qui ont toujours été ma source de volonté durant toutes mes années d'étude.

*Ma chère petite sœur « **IBTISSEM** ».*

*Mon fiancé « **AHMED** » pour son soutien, sa gentillesse et son encouragement.*

A toute ma famille chacun par son nom,

*Mon cher binôme et ma chère amie « **Lydia** ».*

*Ma promotrice M^{me}. **Ait Mesbah** pour son aide, sa patience et ses précieux conseils.*

A tous les étudiants de la promotion 2015-2016 option pharmacie industrielle.

Tous les enseignants du département de chimie industrielle.

Une dédicace particulière à tous les membres de jury.

*« **Siham** »*

Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous rendons grâce à (الله) qui nous a donné la patience et le courage durant ces années d'études.

Nous tenons tout d'abord à exprimer nos vifs remerciements à Mme Ait Mesbah en tant que promotrice, qui a toujours été à notre écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer.

Nos vifs remerciements vont également à Mr. I. Yahiaoui, responsable de validation de l'Entreprise ELKENDI, en tant que encadreur, et à toute l'équipe du laboratoire en particulier l'équipe de validation Amine, Mahdi, Mounir pour leurs précieux conseils et leur aide durant notre stage.

Nos remerciements vont aussi à Mr. K. Basta, chef de département de contrôle de qualité de l'Enterprise ELKENDI, d'avoir accepté de nous accueillir au sein du laboratoire de contrôle qualité.

Egalement, nous tenons à remercier vivement nos parents pour leur soutien et leur patience. A nos enseignants de l'USDB : votre enseignement fut pour nous des plus enrichissants. Que ce travail soit l'occasion de vous exprimer notre grand respect.

Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui nous ont communiqué leur savoir leur savoir-faire et leur savoir-être.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale

Chapitre 1 : Généralité sur les médicaments

1.1. Définition d'un médicament	1
1.2. Les composants principaux d'un médicament	1
1.3. Les formes galéniques des médicaments	2
1.4. Voie d'administration.....	2
1.5. Procédé de fabrication des comprimés	4
1.5.1. Les différentes étapes de fabrication d'un comprimé pelliculé	5

Chapitre 2 : Forme et présentation de Fluvacol 80mg LP

2.1. Présentation de Fluvacol 80 mg.....	6
2.2. Propriétés physico-chimique.....	6
2.3. Indications et possibilité d'emploi.....	6
2.4. Définition de l'hyper-cholestérolémie.....	7
2.5. Effets secondaires indésirables.....	7
2.6. Précaution d'emploi.....	7

Chapitre 3 : validation d'une méthode analytique

3.1. Normes	8
3.2. Les types de validation.....	9
3.3. Les paramètres de validation.....	11
3.4. Les critères de validation.....	11
3.5. Ordre dans la détermination des critères de validation	12
3.6. Les critères de validation d'une méthode analytique de dosage.....	13
3.6.1. Spécificité	13
3.6.2. Linéarité.....	14
3.6.3. La fidélité (précision).....	14
3.6.4. Exactitude (justesse).....	15
3.6.5. Robustesse.....	16

Sommaire

Chapitre 4 : Généralités sur la chromatographie liquide

4.1 Introduction ..	17
4.2 Principe général de la chromatographie	17
4.3 Classification des méthodes chromatographiques	18
4.4 Chromatographie en phase liquide à haute performance	18
4.5 Définitions et interprétation des chromatogrammes	22
4.6 Grandeurs fondamentales utilisées en chromatographie	23
4.7 Les développements récents en HPLC	25

Chapitre 5 : matériel et méthodes

5.1 Introduction.....	26
5.2. Matériel.....	26
5.3. Equipements.....	29
5.4.Méthodes.....	30
5.5. Validation de la méthode.....	31
5.5.1.Spécificité.....	31
5.5.2. Linéarité.....	32
5.5.3. Précision (fidélité).....	33
5.5.4. Exactitude (justesse).....	33
5.5.5. Robustesse.....	33

Chapitre 6 : résultats et discussion

6.1. Spécificité.....	35
6.2. Linéarité.....	38
6.3 Exactitude.....	39
6. 4. Précision.....	40
6.5. Robustesse.....	42

Conclusion générale

Annexes

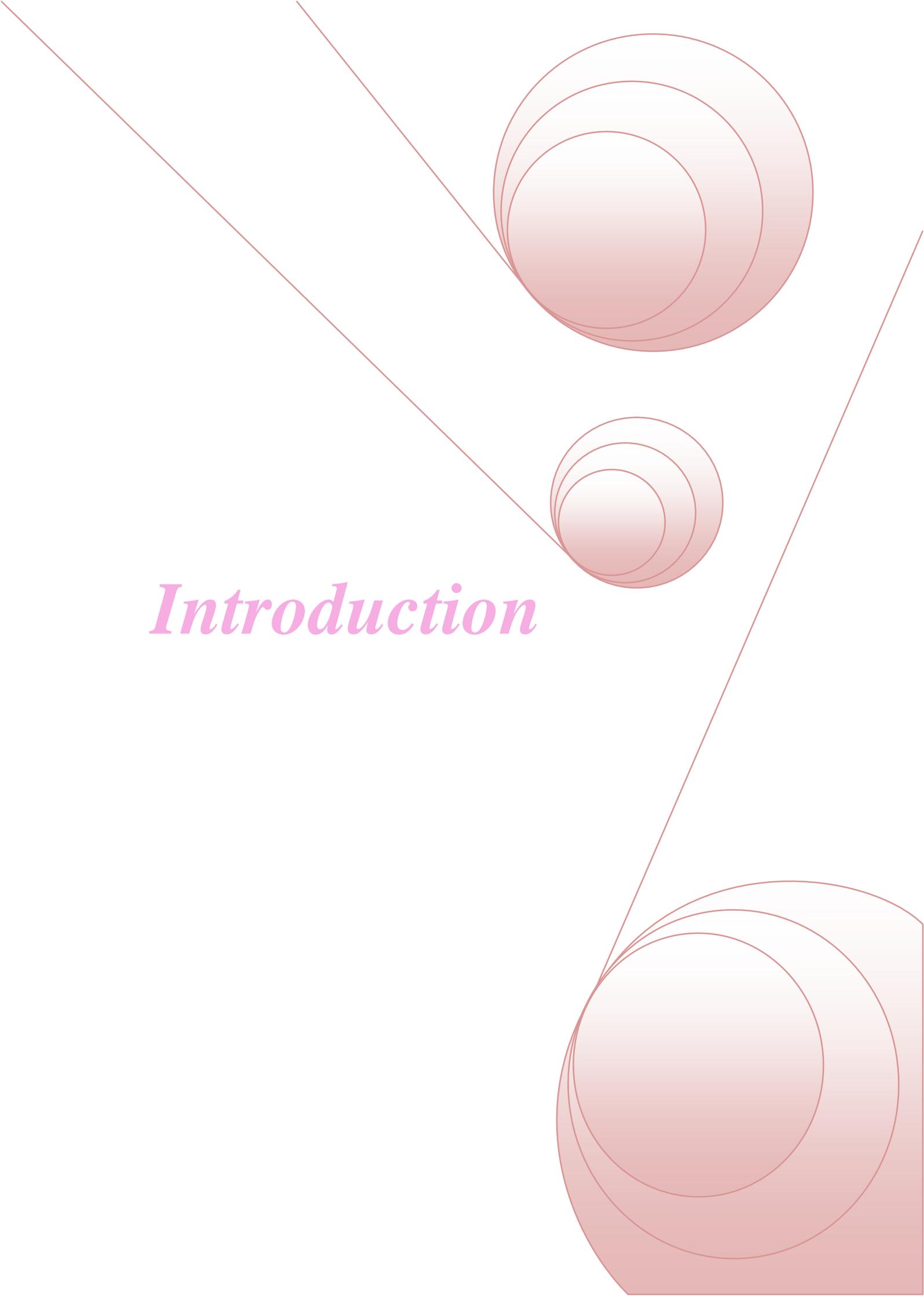
Références bibliographiques

Liste des Figures

Figure 1.1: Procédé de fabrication de Fluvacol 80 mg LP comprimés pelliculés.	5
Figure 3.1 : Etapes de réalisation d'une validation d'une méthode analytique de dosage.	12
Figure 3.2 : Différence entre exactitude et fidélité.	15
Figure 4.1 : Conception générale d'un appareil HPLC.	19
Figure 4.2 : Principaux paramètres d'un chromatogramme.	23
Figure 5.1 : Présentation de Fluvacol 80 mg comprimés pelliculés à LP	26
Figure 5.2 : Structure chimique de Fluvastatin sodique.	27
Figure 5.3: Appareil HPLC.	29
Figure 6.1 : Chromatogramme de Fluvastatin dans les conditions normales.	35
Figure 6.2 : L'influence de la chaleur sur la Fluvastatin après 4h.	36
Figure 6.3 : L'influence de l'HCl sur la Fluvastatin après 4h.	36
Figure 6.4 : L'influence du NaOH sur la Fluvastatin après 4h.	36
Figure 6.5 : L'influence de l'H ₂ O ₂ sur la fluvastatin après 4h.	37
Figure 6.6 : La linéarité de la méthode	38
Figure 6.7 : Chromatogramme de Fluvastatin dans les conditions normales.	42
Figure 6.8 : Chromatogramme de comparaison de 3 débits.	42
Figure 6.9 : Chromatogramme de comparaison des 3 proportions de la phase mobile	43
Figure 6.10: Chromatogramme de comparaison des 3 proportions de la température de la colonne	43
Figure 6.11 : Chromatogramme de comparaison des 3 valeurs de PH du tampon.	43
Figure 6.12: Chromatogramme de comparaison des 3 valeurs de la longueur d'onde	44

Liste des Tableaux

Tableau 1.1 : Formes galénique les plus courantes selon la voie d'administration	2
Tableau 3.1 : Les types de paramètres de validation.	11
Tableau 3.2 : Procédures analytiques et ses paramètres	12
Tableau 5.1 : Les excipients de Fluvacol® 80 mg, comprimés pelliculés à libération prolongée.	28
Tableau 5.2 : Préparation des solutions d'identification.	32
Tableau 5.3 : Préparation des solutions de la dégradation forcée.	32
Tableau 5.4 : La variation des paramètres.	34
Tableau 6.4 : Les résultats du test de justesse (exactitude).	39
Tableau 6.5 : Les résultats de la répétabilité.	40
Tableau 6.6 : Données d'évaluation de l'étude de la précision intermédiaire.	41
Tableau 6.12: Résultats de la stabilité des échantillons dans le réfrigérateur	45
Tableau 6.13: Résultats de la stabilité des échantillons dans l'auto injecteur de l'HPLC	45

A decorative graphic on the right side of the page. It features three overlapping circles of different sizes, each with a red-to-white gradient. The circles are arranged vertically, with the largest at the top, a medium one in the middle, and the largest at the bottom. Two thin red lines originate from the top left and extend towards the circles, and another thin red line extends from the top right towards the circles.

Introduction

Introduction

Introduction

Le médicament est l'un des produits de consommation humaine le plus délicat, sa conception, sa fabrication et sa commercialisation doivent répondre à des normes strictes et des exigences de qualité de sorte que son utilisation ne comporte aucun risque pour la santé des patients. [1]

Le développement d'un médicament est un procédé long, impliquant la découverte de la molécule active, les essais laboratoires, les études sur l'animal, les essais cliniques et les enregistrements réglementaires. Afin de s'assurer de l'efficacité et la sécurité du médicament après sa mise sur le marché, les agences réglementaires et les fabricants de médicament doivent vérifier son identité, son dosage, sa qualité, sa pureté et sa stabilité avant libération. Les fabricants de médicaments sont donc dans l'obligation de démontrer qu'ils contrôlent les aspects critiques de leurs opérations spécifiques. Pour cette raison, la validation pharmaceutique et les contrôles de procédé sont importants. [2]

L'industrie pharmaceutique est dans le monde entier, un élément important des systèmes de santé, et en perpétuel développement grâce à la fabrication de nouvelles molécules destinées à la thérapeutique. Elle est le secteur industriel chargé de la conception, de la fabrication, du conditionnement et de la commercialisation des produits pharmaceutiques.

Cependant la qualité de ces substances médicamenteuses doit être extrême, pour cela le principal objectif de l'industrie pharmaceutique est la mise en œuvre des méthodes plus performantes de fabrication et de contrôle des formes galéniques en vue de promouvoir un meilleur accès à un traitement efficace, (les bonnes pratiques de fabrication et les bonnes pratiques de laboratoires).

Nous avons réalisé notre stage au niveau du laboratoire de contrôle qualité d'El-Kendi industrie des médicaments. C'est un laboratoire de recherche en Algérie agréé par le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP) et le ministère de la santé, pour la conception de génériques innovants et la transposition à l'échelle industrielle. C'est un laboratoire qui veille en permanence sur la qualité du médicament tout au long de la chaîne de production.

Parmi la liste des produits innovants, le principe actif Fluvastatin sodique contenu dans le Fluvacol 80 mg comprimés pelliculés à libération prolongée fabriqué par le laboratoire

Introduction

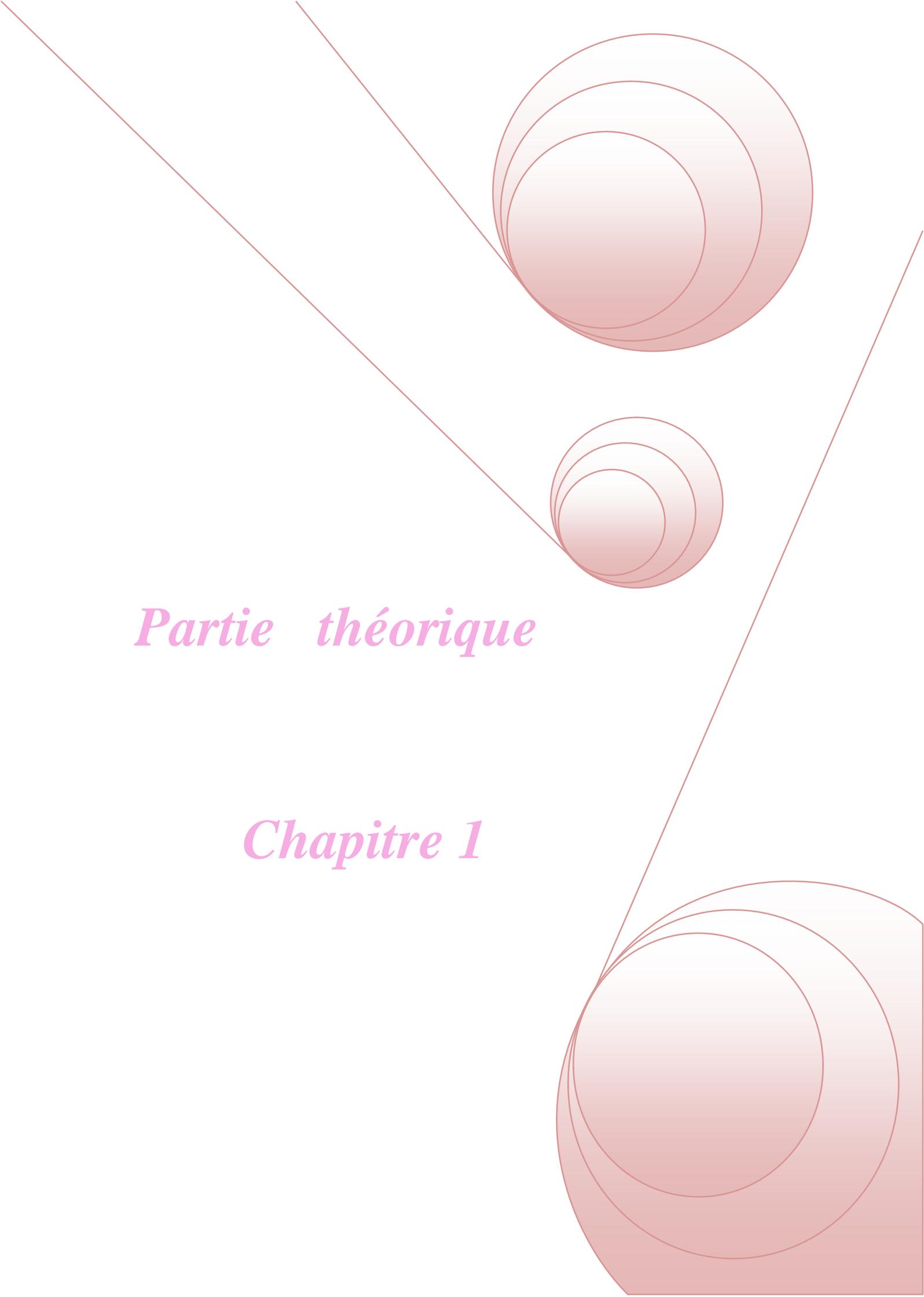
pharmaceutique El Kendi est utilisé pour le traitement de l'hypercholestérolémie primaire ou une dyslipidémie mixte en suivant un régime alimentaire.

Cette classe de médicaments est commercialisée depuis une dizaine d'année, mais sur le marché national nous retrouverons beaucoup plus son princeps LESCOL XL comprimés pelliculés à libération prolongée.

Ce produit est analysé au laboratoire selon la monographie de la pharmacopée américaine (USP).

Le protocole proposé étant complexe (HPLC en mode gradient, c'est-à-dire, avec deux phases mobiles), qui pose souvent un problème d'instabilité de l'appareil, alors nous nous sommes intéressés à l'amélioration de la méthode en passant à un système HPLC en mode single (mode isocratique), plus simple et mieux maîtrisé et surtout plus stable en vue d'utilisation dans des contrôles de routines.

Tout changement de méthode nécessite une validation et nous avons suivi dans notre cas les nouvelles méthodes de validation selon l'ICH.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three overlapping circles of different sizes, each with a red-to-white gradient. Two thin red lines extend from the top-left towards the circles, and one thin red line extends from the top-right towards the circles. The circles are positioned in the upper and lower right quadrants of the page.

Partie théorique

Chapitre 1

1.1. Définition d'un médicament :

Un médicament est défini comme toute substance ou composition possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical, ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques. [3]

1.2. Les Composants principaux d'un médicament :

Parmi les principales composantes d'un médicament on distingue :

1.2.1. Le principe actif « PA » :

Le principe actif d'un médicament, est chacun des composants de ce médicament qui possède un effet thérapeutique. Cette substance est souvent très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients. [4]

1.2.2. L'excipient :

Substance associée au principe actif d'un médicament et dont la fonction est de faciliter l'administration, la conservation et le transport de ce principe actif jusqu'à son site d'absorption. [5]

1.2.3. L'additif :

Les additifs entrent dans la composition des médicaments soit pour en améliorer la conservation (conservateurs antimicrobiens et antioxydants), soit pour en rendre l'administration plus agréable ou pour réduire les risques de confusions (aromatisants et colorants). [6]

1.3. Les formes galéniques des médicaments :

Tableau 1.1 : Formes galéniques les plus courantes selon la voie d'administration [7].

Voie	Formes principales
Oral	Comprimés, gélules, solutions ou suspensions aqueuses
Parentéral	Solutions aqueuses
Rectal	Suppositoires
Vaginale	Comprimés, solutions aqueuses
Ophtalmique	Solutions aqueuses
ORL	Solutions aqueuses pulvérisées au non
Percutanée	Pommades et solutions

1.4. Voie d'administration :

Le rôle d'un médicament est de soigner un organe, de réparer une fonction altérée, mais, il est souvent impossible de placer le remède directement en contact avec l'organe, le tissu où se trouve la lésion. Ainsi, une plaie au niveau cutané sera traitée par application d'une substance antiseptique. Par contre, une infection pulmonaire ne sera traitée que si l'on administre le médicament directement dans les poumons (sous forme d'aérosols) ou si l'on introduit le produit anti-infectieux de telle sorte qu'il puisse atteindre le tissu pulmonaire et agir à ce niveau précis (cas des antibiotiques oraux par exemple).

Le choix de la voie d'administration dépend de:

- La biodisponibilité du principe actif.
- La vitesse d'action désirée, de la durée du traitement et du nombre de prise par jour.
- Du type de malade c'est-à-dire de son âge (nourrisson, enfant, adulte, vieillard) et aussi de sa situation, debout ou alité, à domicile ou hospitalisé, traitement ambulatoire ou non. [8]

1.4.1. La voie orale :

La voie orale est la voie d'administration la plus normale. C'est celle qui est adoptée pour la plupart des principes actifs : les trois quarts des prescriptions concernent la voie orale. [8]

La voie orale consiste en l'administration du médicament par la bouche. Le médicament est avalé par le malade grâce à un mouvement spécial de la langue. Il passe ensuite dans

l'œsophage, et arrive directement dans l'estomac. Il restera dans cet organe jusqu'à ce qu'un mouvement péristaltique gastrique le pousse à travers le pylore vers le duodénum puis dans l'iléon et le jéjunum. C'est dans cette zone que se situe la zone d'absorption privilégiée de la majorité des principes actifs utilisés en thérapeutique. La fraction de principe actif non absorbée rejoindra enfin le colon ou elle pourra éventuellement être réabsorbée, puis la partie non absorbée sera éliminée avec les matières fécales au niveau du rectum. [9]

1.4.2. Définition d'un comprimé :

Les comprimés sont une forme galénique très populaire parmi les préparations solides obtenues par traitement de la poudre. Les formes pharmaceutiques les plus répandues sont généralement obtenus en agglomérant par compression des particules de poudres refermant une unité de prise du médicament avalé, croqué ou dissout dans l'eau. [7]

1.4.3. Les différentes catégories des comprimés :

- Les comprimés effervescents.
- Les comprimés à libération modifiée.
- Les comprimés gastro- résistants.
- Les comprimés à utiliser dans la cavité buccale.
- Les comprimés dispersibles.
- Les comprimés non enrobés : Ces comprimés résultent de la compression du ou des principes actifs en mélange avec les excipients. Ils sont constitués d'une couche unique (comprimés simple ou « noyau ») ou de plusieurs couches (comprimé multicouche), les excipients ne sont pas spécifiquement destinés à modifier la libération des principes actifs dans les sucs digestifs.
- Les comprimés enrobés : sont des comprimés recouverts d'une ou plusieurs couches de mélange de substances diverses telles que : résine naturelle ou synthétique, gomme gélatine, sucre, les polyols, les aromatisants ect. [10]

1.5. Procédé de fabrication des comprimés :

Les comprimés sont fabriqués par la compression d'un volume constant de particules ou d'agrégats obtenus par la méthode de granulation. La fabrication d'un comprimé doit satisfaire deux exigences :

- Une dureté suffisante.
- Un délitement facile.

Lorsque le comprimé est fabriqué, il est quelque fois conseillé d'améliorer sa présentation par diverses opérations accessoires (enrobage et dragéification). [11]

1.5.1. Les différentes étapes de fabrication d'un comprimé pelliculé :

Le schéma ci-dessous présente les différentes étapes de fabrication d'un comprimé pelliculé.

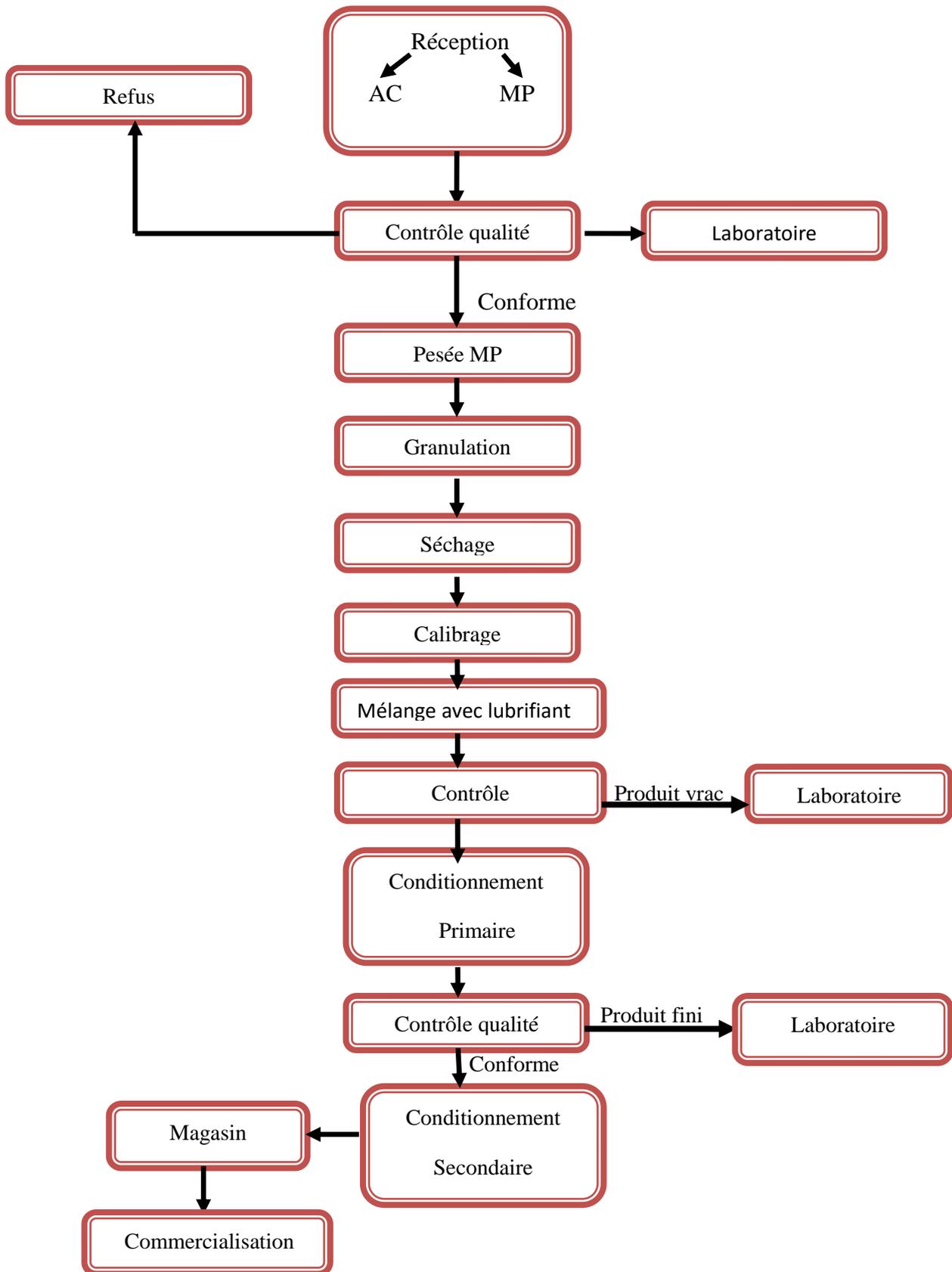
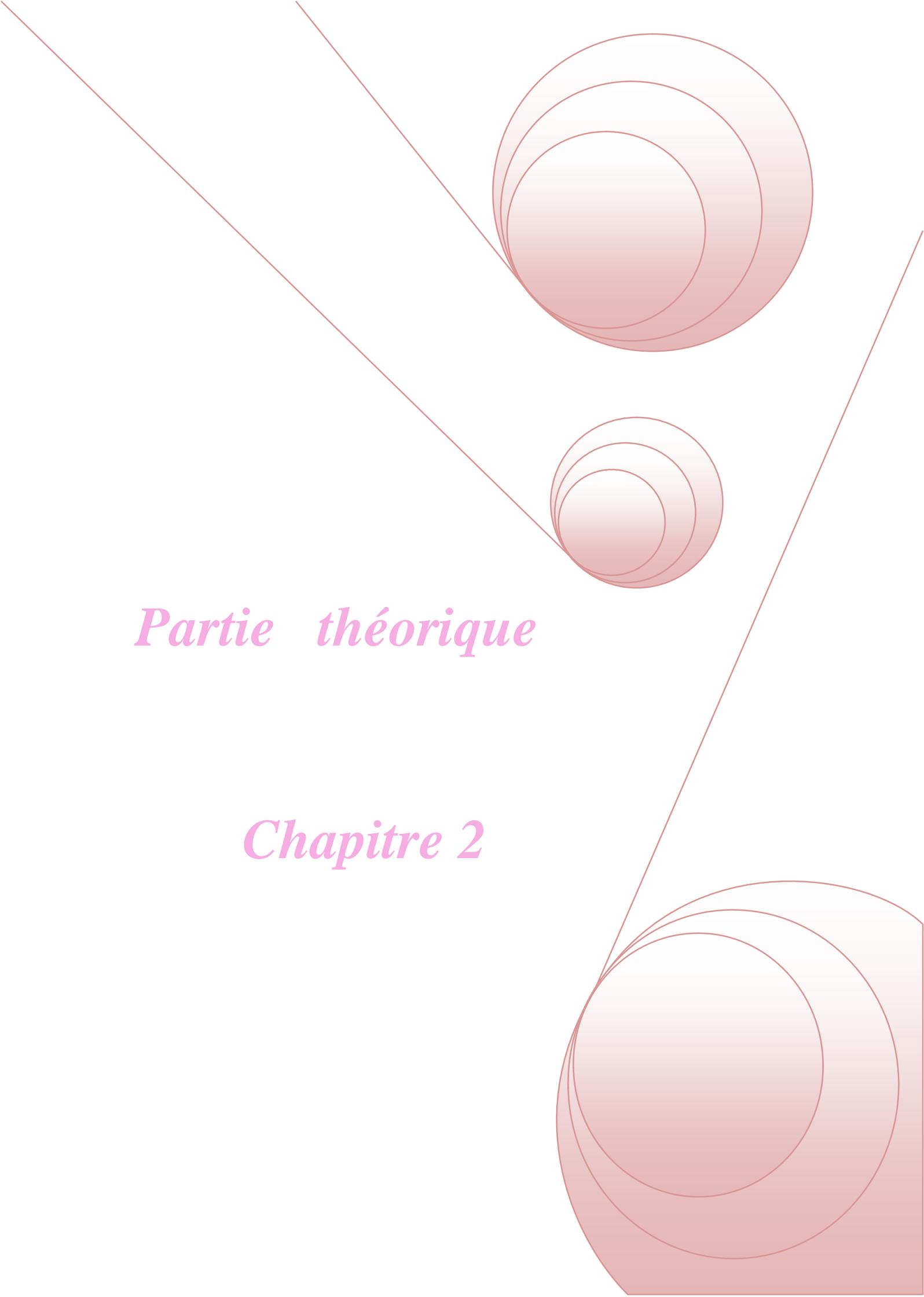


Figure 1.1 : Procédé de fabrication de Fluvacol 80 mg LP comprimés pelliculés

A decorative graphic on the right side of the page. It features three overlapping circles of varying sizes, each with a red-to-white gradient. These circles are positioned along a diagonal line that descends from the top left towards the bottom right. The circles are partially enclosed by this line and another line that descends from the top right towards the bottom left, creating a funnel-like shape. The text 'Partie théorique' and 'Chapitre 2' is placed to the left of this graphic.

Partie théorique

Chapitre 2

2.1. Présentation de Fluvacol 80 mg :

Fluvacol LP 80 mg, comprimé pelliculé à libération prolongée fabriquée par El-KENDI industrie des médicaments, contenant le principe actif Fluvastatin sodium. Il est formulé avec des excipients décrits dans la Pharmacopée Européenne en vigueur. Son princeps c'est LESCOL 80 mg, comprimé pelliculé à libération prolongée commercialisé en France par NOVARTIS PHARMA SAS.

La Fluvastatine : est un principe actif de la famille des statines ayant une action hypolipémiant par inhibition de la HMG-Co A réductase. Elle est commercialisée dans les spécialités FRACTAL et LESCOL.

- **Le principe actif Fluvastatin Sodique :** Le principe actif fluvastatine sodique dérivée de l'acide (6 E)-7-[3-(4-fluorophényl)-1 (propan-2-yl)-1H-indol-2-yl]-3,5-dihydroxyhept-6-énoïque il est soluble dans l'eau, l'alcool, méthanol. [12]
- **]Sa formule brute :** $C_{24}H_{26}FNO_4$, et sa masse moléculaire est de $M = 411,4659$ g/mol. Il se trouve sous forme de capsule, et comprimé pelliculé. [12]

2.2 Propriétés physico-chimiques :

La molécule de fluvastatine a une double liaison carbone-carbone typique d'un alcène. Ainsi, elle peut se présenter sous la forme de deux diastéréoisomères, Z (cis) ou E (trans). Par ailleurs, cette molécule a aussi deux atomes de carbone asymétrique et pas de plan de symétrie donc peut former 2 paires d'énantiomères. Au total, la molécule de fluvastatine se présente donc sous forme de 8 stéréo-isomères.

Le médicament est composé de la paire d'énantiomères :

- acide (3R, 5S, 6E)-7-[3-(4-fluorophényl)-1-(propan-2-yl)-1H-indol-2-yl]-3,5-dihydroxyhept-6-énoïque.
- acide (3S, 5R, 6E)-7-[3-(4-fluorophényl)-1-(propan-2-yl)-1H-indol-2-yl]-3,5-dihydroxyhept-6-énoïque. [12]

2.3 Indications et possibilité d'emploi :

La Fluvastatine est indiquée en complément d'un régime pour réduire les taux de cholestérol total (C-total) et de cholestérol-LDL (lipoprotéines de faible densité) lorsque la réponse au régime et aux autres traitements non-pharmacologiques (par exemple, activité physique, perte de poids) ne sont pas suffisants chez les adultes ayant une

hypercholestérolémie primaire (variant hétérozygote) ou une dyslipidémie mixte (Fredrickson Types IIa et IIb). [25]

2.4 Définition de l'hyper-cholestérolémie :

Le cholestérol est un composant essentiel des cellules et de la fabrication de certaines hormones. Le cholestérol est donc indispensable à la vie.

Deux types de cholestérol coexistent : le « mauvais » cholestérol ou LDL-cholestérol qui est la fraction responsable du développement de la plaque d'athérome sur les artères qui vont alors se boucher progressivement : l'athérosclérose, et le « bon » cholestérol ou HDL-cholestérol dont l'augmentation du taux est, à l'inverse, associée à une diminution du risque vasculaire.

L'hypercholestérolémie correspond, dans le langage courant à une augmentation en excès du LDL-cholestérol qui est un facteur de risque cardiovasculaire (FRCV). Il peut être responsable de maladies cardio-vasculaires telles qu'un infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral ou un artériopathie des membres inférieurs.

L'hypercholestérolémie fait partie du groupe des dyslipidémies dont fait également partie l'hypertriglycéridémie qui est un excès de triglycérides dans le sang avec des conséquences relativement similaire à l'hypercholestérolémie. L'hypercholestérolémie est un facteur modifiable par le régime alimentaire et par l'administration de médicament hypolipémiant (statines principalement). [13]

2.5. Effets secondaires indésirables :

- ❖ Dépression.
- ❖ Problèmes respiratoires tels que toux persistantes et/ou essoufflement ou fièvre.
- ❖ Fatigue inhabituelle ou fièvre, coloration jaune de la peau et des yeux, urines foncées (signes d'hépatite). [25]

2.6. Précaution d'emploi :

- ❖ Prévention secondaire des événements cardiaques majeurs chez les adultes présentant une pathologie coronaire après une intervention coronarienne percutanée. [25]

A decorative graphic on the right side of the page. It features three overlapping circles of varying sizes, each with a red-to-white gradient. Two thin red lines extend from the top left towards the circles, and another line extends from the top right towards the bottom circle. The circles are positioned in the upper right, middle right, and lower right areas of the page.

Partie théorique

Chapitre 3

Introduction :

Avant le début des années 1960, la validation n'était pas une exigence réglementaire, les compagnies pharmaceutiques n'avaient pas obligation de prouver la sécurité de leur médicaments. Avant 1962, la seule voie pour les autorités pour prouver qu'un procédé n'avait pas fait ce qu'il devait faire était de prendre des échantillons du produit final, les analyser et montrer des écarts aux spécifications.

La validation de procédé pharmaceutique s'est grandement développée pendant ces dernières années. Pour la plupart des industries, elle est apparue comme une exigence réglementaire et de là, était souvent considérée comme un fardeau.

Malgré les critiques initiales, la validation des méthodes analytiques est maintenant bien acceptée et considérée comme une partie de la gestion de qualité. [2]

3.1. Normes :

Compte tenu de l'importance de la validation en termes de qualité du médicament, elle est définie et contrôlée par plusieurs normes :

3.1.1. Norme ISO/IEC/17025 :

«La validation est la confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulières d'un usage projeté donné sont remplies ».

3.1.2. BPF Européennes :

« La validation est l'établissement de la preuve en conformité avec les BPF que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, matériel, produit ou activité permet d'atteindre réellement les résultats escomptés ».

3.1.3. ICH :

« La validation est l'ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé ».

3.1.4. FDA :

« La validation représente pour une société une mesure de la compréhension qu'elle possède de son propre procédé et à le maintenir sous contrôle». [14]

3.2. Les types de validation :

Il existe plusieurs types de validation :

- Validation des méthodes analytiques.
- Validation du procédé de fabrication.
- Validation de la durée de stockage.
- Validation du fournisseur des matières premières.
- Validation des équipements (qualification).
- Validation des procédés de nettoyage.
- Validation des systèmes informatisés. [14]

3.2.1. Validation d'une méthode analytique :

La validation des méthodes analytiques ne peut être réalisée que sur des équipements qualifiés. La qualification est essentielle pour une mesure précise et juste : si le matériel n'est pas qualifié, assurant que les résultats indiqués sont dignes de confiance, tout autre travail basé sur l'utilisation de ce matériel sera suspect. La qualification est « l'action de fournir et documenter que l'équipement ou les matériels annexes sont correctement installés, fonctionnent correctement et fournissent en réalité les résultats attendus, la qualification est partie intégrante de la validation mais les étapes de qualification seules ne constituent pas la validation de procédé ».

La qualification suit un ordre logique d'opérations successives :

- Qualification à la conception (QC).
- Qualification à l'installation (QI).
- Qualification opérationnelle (QO).
- Qualification de performance (QP).

3.2.1.1. Définition d'une méthode d'analyse :

La méthode d'analyse est la manière dont une analyse est réalisée. Chaque étape doit être décrite en détail. Il faut décrire notamment, mais non exclusivement, la préparation de

l'échantillon, de l'étalon de référence et des réactifs, l'utilisation des appareils, la production de la courbe d'étalonnage, l'application des formules de calcul, ect.

3.2.1.2. Validation d'une méthode analytique selon l'ICH :

Pour valider divers types de méthodes d'analyse, on évalue les propriétés globales de plusieurs méthodes utilisées ensemble pour vérifier si la qualité des substances médicamenteuses ou des produits finis est effectivement assurée.

La présentation doit fournir et commenter, s'il y a lieu, toutes les données recueillies durant la validation et toutes les formules utilisées pour calculer les attributs validés.

Il se peut que d'autres approches que celles préconisées dans cette directive soient applicables et acceptables. Il revient au demandeur de choisir la méthode de validation la mieux indiquée pour son produit. Il importe toutefois de se rappeler que le principal objectif de la validation est de démontrer que la méthode d'analyse considérée convient pour l'usage auquel elle est destinée. Vu leur complexité, les méthodes d'analyse applicables aux produits biologiques et biotechnologiques sont validées par une approche différente de celle décrite ici.

Il faut utiliser des étalons de référence bien caractérisés et de pureté connue durant toutes les étapes de la validation. Le degré de pureté nécessaire dépend de l'usage préconisé. En pratique, il est habituellement possible de suivre un plan d'expérimentation qui permet d'évaluer simultanément les divers attributs à valider, et d'en venir ainsi à bien connaître l'ensemble des propriétés de la méthode d'analyse (par ex., spécificité, linéarité, écart d'utilisation, exactitude et précision).

3.2.1.3. La validation aspect réglementaire :

Le guideline ICH a dédié à la validation analytique :

- **Q2:** « Analytical validation ».
 - **Q2 A:** « Text on validation of analytical procedures » : Il présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques [15].
 - **Q2 B :** « Méthodologie » : 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 devrait être présentées dans un dossier d'enregistrement. [15]

3.3. Les types de paramètres de validation :

L'ICH décrit les procédures appliquées pour valider les essais prescrits dans les monographies des pharmacopées. Ces essais peuvent être des identifications, des essais de pureté ou des dosages. Donc, on distingue les différents types d'analyse suivants :

Tableau 3.1 les types de paramètres de validation.

Les types de paramètres de validation	Définition
❖ Épreuves d'identification	à vérifier l'identité de la substance analysée dans un échantillon. Elles consistent normalement à vérifier une caractéristique de l'échantillon [par exemple, ses propriétés spectrales, ses caractères chromatographiques, sa réactivité chimique, etc.] avec celles d'un étalon de référence.
❖ Dosage quantitatif des impuretés ❖ Vérification des teneurs limites des impuretés	peut être un dosage quantitatif ou la vérification d'une teneur limite. Dans les deux cas, il s'agit d'évaluer avec exactitude la pureté de l'échantillon. Les caractéristiques à évaluer diffèrent selon qu'on valide une méthode de dosage ou une méthode de vérification d'une teneur limite.
❖ Dosage de la partie active ou d'une ou de plusieurs autres composantes de la substance médicamenteuse ou du produit fini	Dans le cas des produits finis, les analyses visent l'ingrédient actif ou d'autres composantes spécifiques, et la validation des méthodes utilisées à cette fin porte sur des caractéristiques semblables. La validation d'autres méthodes de détermination est également fondée sur ces caractéristiques.

3.4. Les critères de validation :

Il est habituellement possible de suivre un plan d'expérimentation qui permet d'évaluer simultanément les divers attributs à valider, et d'en venir ainsi à bien connaître l'ensemble des propriétés de la méthode d'analyse (par ex., spécificité, linéarité, exactitude et précision). [15]

Tableau 3.2 : Procédures analytiques et ses paramètres. [15]

	Type de procédure analytique			
	Identification	Essai de pureté		Dosage
		Quantitative	Limite	Mesure de dissolution (Teneur/Activité)
Caractéristiques				
Exactitude	-	+	-	+
Fidélité				
✓ Répétabilité		+	-	+
✓ Fidélité intermédiaire		+*	-	+*
Spécificité**	+	+	+	+
Limite de détection	-	-***	+	-
Limite de quantification	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Intervalle de mesure	-	+	-	+

(+) : à évaluer ; (-) : ne pas à évaluer ; (*) : Si la reproductibilité a été évaluée, il n'est pas nécessaire d'évaluer la fidélité intermédiaire ; (**) : Le manque de spécificité d'une procédure analytique peut être compensé par le recours à une ou plusieurs méthodes complémentaires ; (***) : Nécessaire dans certains cas.

3.5. Ordre dans la détermination des critères de validation :

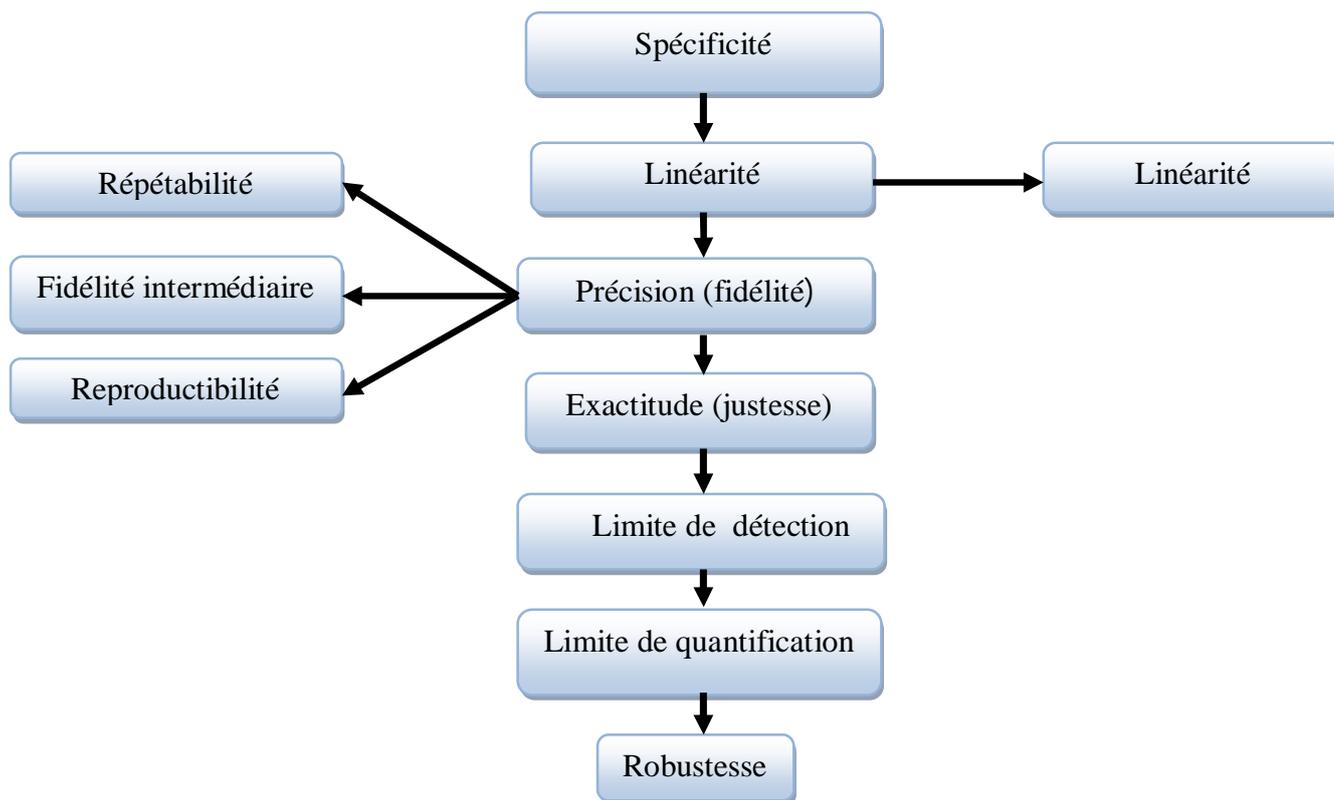


Figure .3.1 : Etapes de réalisation d'une validation d'une méthode analytique de dosage. [15]

3.6. Les critères de validation d'une méthode analytique de dosage :

3.6.1. Spécificité :

3.6.1.1. Identification :

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc.

Si une méthode d'analyse est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité de l'une ou de plusieurs des autres analyses complémentaires.

Cette définition renvoie à plusieurs aspects :

- **Identification** : Il s'agit de vérifier l'identité de la substance analysée.
- **Pureté** : Il s'agit de vérifier si les analyses permettent de déterminer avec exactitude la teneur en impuretés de la substance analysée (recherche des substances apparentées, métaux lourds, résidus de solvants, etc.)
- **Dosage (teneur ou activité)** : Il s'agit d'obtenir un résultat indiquant exactement la concentration ou l'activité de la substance analysée dans l'échantillon. [15]

Pour démontrer la spécificité des méthodes chromatographiques, il convient de présenter des chromatogrammes représentatifs où chacun des composants est adéquatement identifiés.

Pour cela, ajouter à la substance pure une quantité adéquate d'excipients, puis démontrer que ces composants additionnels n'ont aucun effet sur le temps de rétention et le dosage de la substance pure. [16]

3.6.1.2. La dégradation forcée :

L'étude de la dégradation forcée devrait démontrer que les produits de dégradation n'ont aucun effet sur le temps de rétention et le dosage de la substance active.

Pour cela on doit soumettre le produit « substance active » à un état de stress en utilisant la température, la dégradation acide, la dégradation basique et l'oxydation. [17]

3.6.2. Linéarité :

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon. [15]

Son domaine d'utilisation est l'intervalle entre la concentration la plus faible et la concentration la plus élevée dont on a démontré qu'elles pouvaient être déterminées avec une précision, et une linéarité acceptable, ses caractéristiques sont déterminées en appliquant la méthode à une série d'échantillons dont les concentrations en analyte couvrent tout le domaine d'utilisation proposé.

La linéarité est vérifiée en établissant un graphe des réponses obtenues en fonction de la concentration/teneur et en procédant à une évaluation visuelle du ce graphe obtenu. Il faut aussi déterminer le coefficient de corrélation (R^2), l'ordonnée à l'origine et la pente de la courbe de régression. [18]

3.6.3. La fidélité (précision) :

La fidélité d'une méthode correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, dans des conditions prescrites. La précision peut s'évaluer à trois niveaux : répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité.

La précision est généralement exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation d'un ensemble de mesures. [15]

➤ **Répétabilité :**

La répétabilité est une expression de la précision de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps. La répétabilité est aussi désignée « précision intra-analyse ». [15]

➤ **Précision intermédiaire :**

La précision intermédiaire correspond aux variations survenant dans un même laboratoire : analyses effectuées à des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents, etc. [15]

➤ **Reproductibilité :**

La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement l'uniformisation de la méthodologie). [15]

3.6.4. Exactitude (justesse) :

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. Elle est déterminée sur les cinq échantillons utilisés dans l'étude de la linéarité. Le principe de l'exactitude est de calculer les valeurs de recouvrements en % entre les quantités retrouvées et les quantités introduites. [15]

L'exactitude est aussi désignée par l'authenticité.

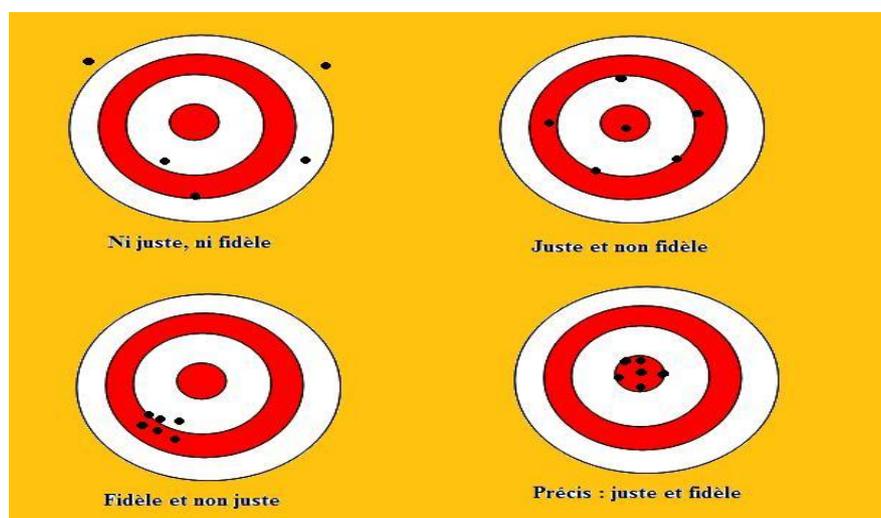


Figure 3.1 Différence entre l'exactitude et la fidélité.

3.6.5. Robustesse :

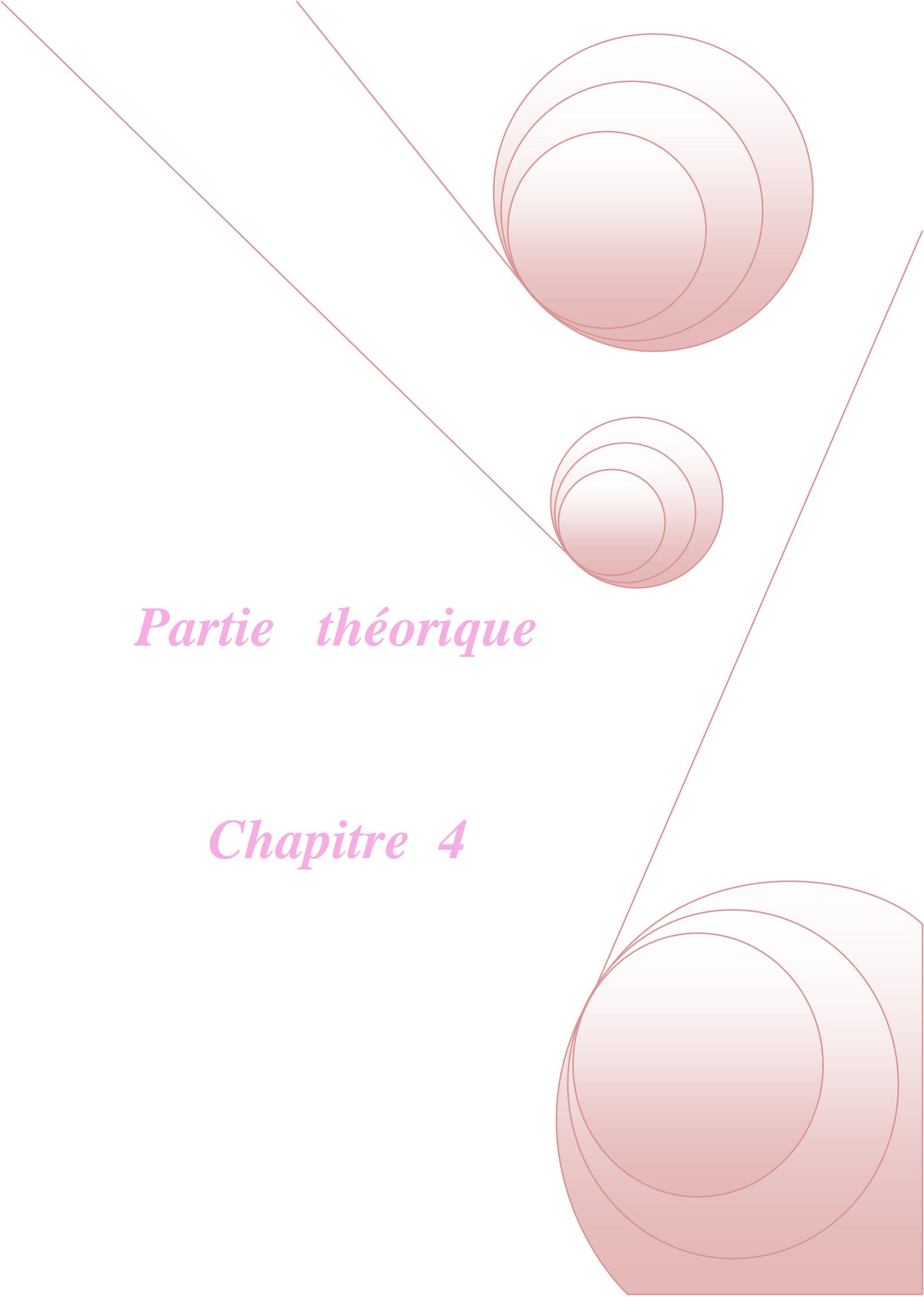
La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquence de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode, elle donne une idée de la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation. [15]

L'évaluation de la robustesse doit démontrer que la méthode demeure fiable lorsqu'on introduit des variations planifiées de paramètres. Elle a notamment pour conséquence l'établissement d'un ensemble de paramètres d'appropriation (nombre de plateau théorique (N), temps de rétention (t_R), facteur de symétrie (f) et la surface des pics) qui permet de garantir la validité de la méthode d'analyse quelque soient les conditions d'utilisation. [15]

L'évaluation de la robustesse a notamment pour conséquence la définition d'un ensemble de paramètres sur le caractère approprié de la méthode d'analyse qui permet de garantir la validité de cette méthode, quelles que soient les conditions d'utilisation.

En ce qui concerne les chromatographies en phase liquide :

- Variations du pH de la phase mobile
- Variations de la composition de la phase mobile
- Variation de la longueur d'onde Température
- Débit.
- Stabilité des solutions d'analyse

A decorative graphic on the right side of the page. It features three overlapping circles of varying sizes, each with a red-to-white gradient. Two thin red lines extend from the top left towards the circles, and another line extends from the top right towards the bottom right circle.

Partie théorique

Chapitre 4

4.1 Introduction :

Les techniques chromatographiques telles qu'on les connaît aujourd'hui ont été développées en 1952 pour la chromatographie en phase gazeuse par Martin et James. [19]

En 1967 la chromatographie liquide à haute pression, qui s'appellera ensuite chromatographie liquide à haute performance (HPLC), a été développée avec les travaux de Huber et Huzsman. [20]

Depuis la mise en place de ces techniques séparatives, les colonnes utilisées n'ont cessé d'évoluer. La première séparation chirale sur une colonne HPLC a été rapportée en 1979, ainsi, la taille des particules des colonnes HPLC ne cesse de diminuer pour en accroître les performances.

Dans le domaine pharmaceutique, les techniques séparatives sont très utilisées et la chromatographie en phase liquide (HPLC) joue un rôle important lors de toutes les phases du cycle de vie d'un nouveau médicament (découverte, développement et mise sur le marché). La productivité accrue voulue par les industries pharmaceutiques impacte les laboratoires d'analyse et entraîne le développement de nouvelles méthodes rapides.

4.2 Principe général de la chromatographie :

La chromatographie est une technique de séparation, d'analyse quantitative et qualitative. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration des composés entraînés entre deux phases non miscibles dont l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, qui se déplace au contact de la première. L'échantillon doit impérativement être soluble dans la phase mobile.

Le temps de rétention associé à un pic chromatographique caractérise qualitativement une substance dans des conditions chromatographiques données. L'aire ou la hauteur des pics chromatographiques permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté. [21]

Lorsque l'on développe une méthode chromatographique, l'objectif est triple: obtenir des pics chromatographiques les plus fins possible (grande efficacité), les mieux séparés possible (bonne résolution), et en un temps d'analyse minimum. [22]

4.3 Classification des méthodes chromatographiques :

On peut classer les méthodes chromatographiques de trois manières:

- Selon la nature des phases.
- Selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation.
- Selon la technologie mise en œuvre. [23]

4.3.1 Classification selon la nature des phases :

- Selon la nature de la phase mobile.
- Selon la nature de la phase stationnaire.

4.3.2 Classification selon la nature des phénomènes misent en jeu :

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer.

On distingue ainsi:

- La chromatographie d'adsorption.
- La chromatographie de partage.
- La chromatographie d'échange d'ions.
- La chromatographie d'exclusion encore qualifiée de chromatographie de perméation ou de filtration sur gel.
- La chromatographie d'affinité. [23]

4.4 Chromatographie en phase liquide à haute performance :

La chromatographie en phase liquide à long terme, telle qu'elle est utilisée dans les compendiums est synonyme de chromatographie liquide à haute pression ou la chromatographie liquide à haute performance. La chromatographie liquide est une technique de séparation basée sur une phase mobile liquide. [24]

La chromatographie en phase liquide est utilisée dans un grand nombre de domaines analytiques, et plus particulièrement dans les domaines de l'agroalimentaire, de l'environnement, de la pharmacie et de la biologie. Un chromatographe en phase liquide est souvent appelé chaîne HPLC. [22]

4.4.1 Conception générale d'un appareil HPLC :

Un chromatographe liquide est constitué d'un réservoir contenant la phase mobile, une pompe pour forcer la phase mobile à travers le système à haute pression, un injecteur pour introduire l'échantillon dans la phase mobile, une colonne de chromatographie, un détecteur et une collecte de données dispositifs. [24]

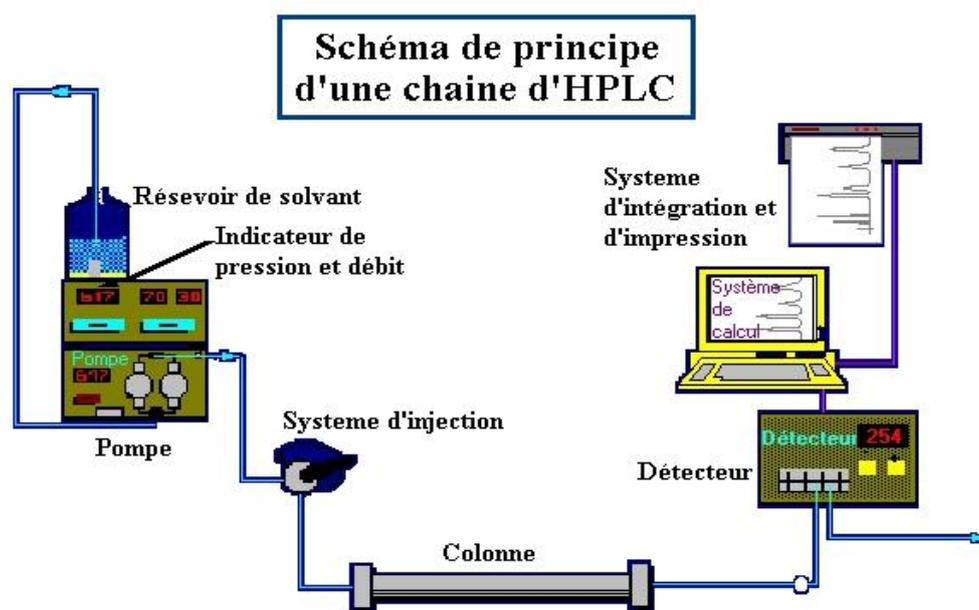


Figure 4.1 : Conception générale d'un appareil HPLC.

➤ Phase stationnaire :

a/ La colonne chromatographique :

La colonne terme comprend l'acier inoxydable, l'acier inoxydable garni, et colonnes polymériques, garnies d'une phase stationnaire. La longueur et le diamètre interne de la colonne affecte la séparation. [24]

b/ Adsorbants utilisés en CLS :

Le processus de l'adsorption est complexe et les forces mises en jeu qui dépendent du soluté, du solvant et de l'adsorbant sont nombreuses (forces de dispersion de London, forces électrostatiques, forces de liaisons hydrogène etc...). Il devient alors impossible de préciser la part relative de ces différentes forces d'adsorption car pratiquement on n'observe que leur résultante.

SNYDER distingue ainsi 4 types d'adsorbants :

- **Inorganiques polaires** silice, alumine.
- **Inorganiques apolaires** graphite, charbon.
- **Greffés polaires** aminopropyl (NH₂), cyanopropyl (CN).
- **Greffés apolaires** C18 - C8. [23]

c/ Phases greffées apolaires :

Les phases greffées apolaires représentent les phases stationnaires les plus utilisées en HPLC. Ces phases (qualifiées de réverses ou d'inverses) sont préparées à partir de silice par formation d'une liaison éthersilyl.

La longueur du greffon alkyle **R** s'il s'agit d'une chaîne aliphatique ou la nature même de cette chaîne (groupements phényle, etc) sert à caractériser la phase.

Les phases **RP 8** et **RP 18** sont les plus répandues et les plus utilisées.

En réalisant une surface hydrophobe, on inverse totalement la nature des interactions fournies par la silice. L'eau n'a pas d'affinité pour le greffon hydrophobe et la force éluante des solvants est exactement l'inverse de celle qui est observée sur supports polaires d'où le terme reversed phase (**RP**) appliqué à ce genre de support.

Les solutés les plus polaires seront les moins retenus, les solutés apolaires seront retenus d'autant plus fortement que leur hydrophobicité est élevée.

La rétention des composés apolaires croît avec la longueur du greffon et avec le taux de greffage de la surface (surface coverage). La taille des particules n'a pas d'effet sur la rétention exprimée par le facteur de capacité k' , les effets de la taille ne concernant que la pression et la HEPT. [23]

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N}$$

➤ **Phase mobile :**

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants. [24]

a/ Elution en mode isocratique :

Dans ce type d'élution, la composition de la phase mobile reste constante tout au long de l'analyse chromatographique. On utilise généralement soit un mélange binaire type eau / méthanol, eau / acétonitrile ou eau / tétrahydrofurane, soit un mélange ternaire eau / acétonitrile / méthanol.

La phase stationnaire subit des changements de structure selon la nature de la phase mobile. Il n'est pas actuellement possible de prévoir de tels changements et seule l'expérimentation permet d'en déterminer les effets. Ainsi l'ordre d'élution de composés benzéniques varie avec l'éluant. [23]

b/ Elution en mode gradient :

Le profil de gradient d'élution est présenté dans la monographie comme une table de gradient, qui répertorie le temps et la composition proportionnelle de la phase mobile à l'heure indiquée. [24]

Les appareils modernes proposent des systèmes gérés par microordinateurs qui permettent de réaliser des gradients par mélange de deux solvants. Le plus souvent les gradients réalisés sont linéaires, c'est à dire que les variations de **B** dans la phase mobile en fonction du temps sont linéaires. Certaines appareils permettent des gradients curvilignes ou complexes et il existe même des systèmes qui autorisent la mise en place de gradients par mélange ternaire (3 solvants) voire quaternaire. Dans ces cas seule l'expérimentation et le « savoir » faire de l'analyste peut répondre à un besoin analytique : les paramètres à prendre en considération restent cependant très nombreux et il devient souvent illusoire de maîtriser toutes les inconnues introduites dans ces conditions. [23]

➤ **Le détecteur :**

Il existe différents types de détecteurs utilisés en chromatographie liquide :

- Spectrophotomètre UV-visible,
- Spectrofluorimètre,

- Réfractomètre différentiel,
- Détecteur à diffusion de lumière... [23]
- **Détecteur par absorption UV-visible :**

Le détecteur UV-visible est le plus utilisé en chromatographie liquide à haute performance. Le faisceau de longueur d'onde λ donnée traverse une cuve dans laquelle circule le soluté. Son principe est fondé sur la loi de **BEER-LAMBERT**, qui relie l'absorbance optique d'un composé à sa concentration.

$$A = \epsilon.l.C$$

4.5 Définitions et interprétation des chromatogrammes :

4.5.1 Chromatogramme :

Un chromatogramme est une représentation graphique de la réponse du détecteur, la concentration de l'analyte dans l'effluent, ou une autre quantité utilisée comme mesure de la concentration de l'effluent en fonction du volume de l'effluent ou du temps. [24]

4.5.2 Le pic :

Le pic correspond à la partie de l'enregistrement chromatographique de la réponse du détecteur quand un seul composant est élué de la colonne. Si la séparation est incomplète, deux ou plusieurs composants peuvent être élués comme un pic en suspens. [24]

4.5.3 Le temps de rétention :

Dans la chromatographie liquide, le temps de rétention t_R , est défini comme étant le temps écoulé entre l'injection de l'échantillon et l'apparition de la réponse de crête maximale de la zone d'échantillon éluée. T_R peut être utilisé comme paramètre d'identification. Les temps de rétention chromatographiques sont caractéristiques des composés qu'ils représentent, mais ne sont pas uniques. La coïncidence des temps de rétention d'un échantillon et une substance de référence peut être utilisée comme un critère partiel dans la construction d'un profil d'identité, mais peut être pas suffisante en soi pour établir l'identité. Le temps de rétention absolu d'un composé donné peut varier d'un chromatogramme à l'autre. [24]

4.6 Grandeurs fondamentales utilisées en chromatographie :

4.6.1 Le coefficient de distribution :

En chromatographie en phase liquide, les séparations sont basées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles l'une stationnaire (particules solides imprégnées ou non d'un liquide), l'autre mobile (liquide).

Pour un système chromatographique donné, le coefficient de distribution **K** (ou coefficient de partage) est défini par: [23]

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

4.6.2 Grandeurs de rétention :

Si la quantité injectée est petite on obtient pour chaque composé élué un pic symétrique et gaussien (figure 3). On définit ainsi les paramètres suivants :

➤ **Le temps de rétention (t_R) :**

C'est le temps d'élution au maximum du pic mesuré à partir de l'injection. Un chromatogramme type est schématisé, avec les paramètres principaux d'évaluation, sur la figure 3. [22]

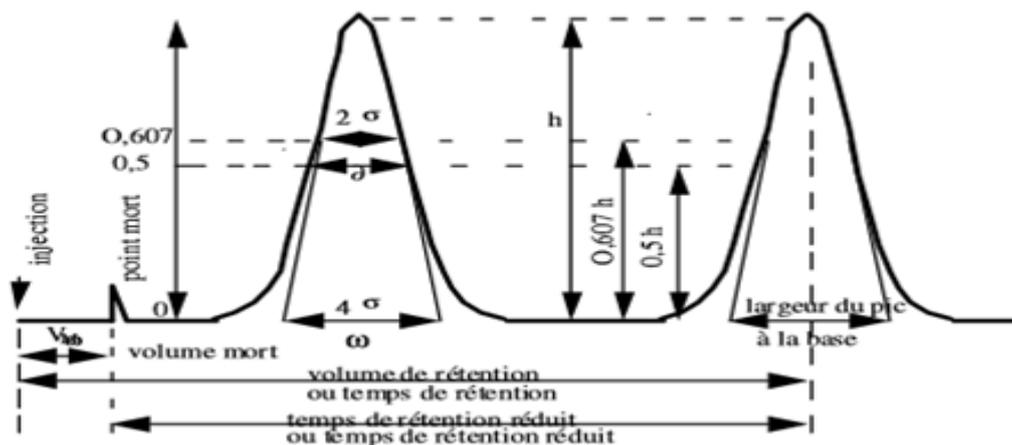


Figure 4.2 : Principaux paramètres d'un chromatogramme.

➤ **Le facteur de capacité k' (ou facteur de rétention) :**

Pour s'affranchir des paramètres géométriques de la colonne, on utilise, pour caractériser la rétention d'un composé le facteur de capacité.

k' est le paramètre le plus important en chromatographie liquide. [23]

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

4.6.3 Sélectivité d'une colonne:

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité :

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

Il s'agit du rapport des temps de rétention réduits. [23]

4.6.4 Efficacité d'une colonne. Nombre de plateaux théoriques et de plateaux efficaces :

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne.

$$N = 16. \left(\frac{tr}{\omega} \right)^2 = 5,54. \left(\frac{tr}{\delta} \right)^2$$

ω largeur du pic à la base : distance entre les points d'intersection des tangentes au point d'inflexion avec la ligne de base et δ largeur du pic à mi-hauteur. [23]

4.6.5 Résolution :

La résolution R_s mesure la séparation qui existe entre deux pics chromatographique.

Elle est définie par la relation :

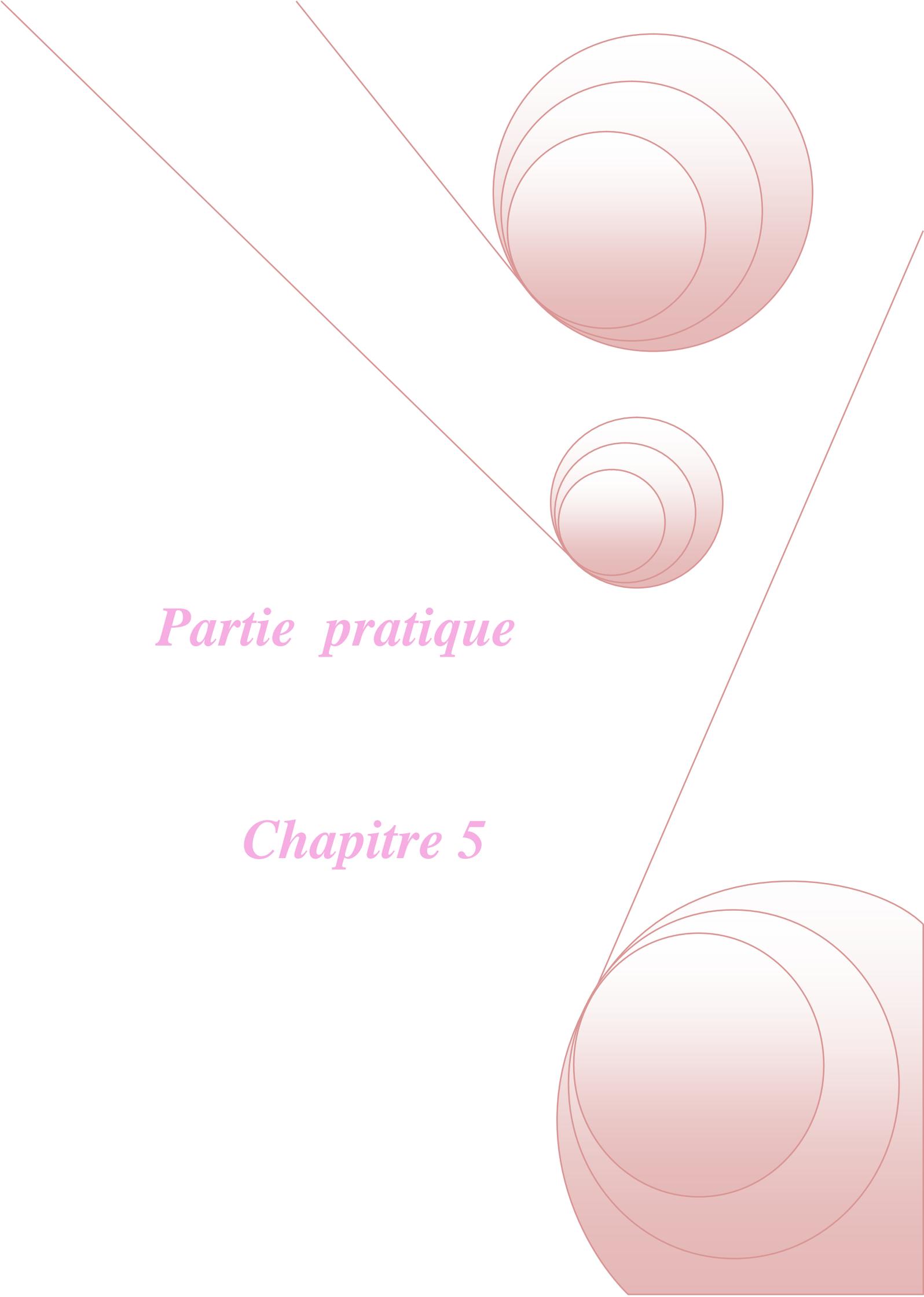
$$R_s = 2. \frac{tr_1 - tr_2}{\omega_1 + \omega_2}$$

Plus R_s est grand, meilleure est la séparation.

La séparation est complète quand $R_s = 1$ (2 % de recouvrement des 2 pics). [23]

4.7 Les développements récents en HPLC :

Les récentes avancées en chromatographie liquide concernent principalement le développement de méthodes plus rapides et plus résolutive que les techniques actuelles. Pour parvenir à de tels résultats, il est possible de modifier la taille des particules, la pression, la température ou plusieurs de ces paramètres en même temps.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three overlapping circles of varying sizes, each with a red-to-white gradient. Two thin red lines originate from the top left and extend towards the circles, and another red line extends from the top right towards the circles. The circles are positioned in the upper right, middle right, and lower right areas of the page.

Partie pratique

Chapitre 5

5.1 Introduction :

Dans le cadre de ce travail nous nous sommes intéressées au médicament Fluvacol 80 mg, comprimés pelliculé à libération prolongée fabriqué au laboratoire pharmaceutique d'El Kendi.

Des modifications ont été apportées au protocole d'analyse du dosage du produit fini préconisé par l'USP [3] pour des raisons pratiques.

L'objectif de notre travail est le passage du mode gradient au mode isocratique, et pour cela nous avons suivi et vérifié la validation de la méthode alternative selon les exigences de l'ICH, pour diminuer le nombre de solutions à préparer avec un temps réduit et une forme simple adoptée pouvant être utilisés dans un contrôle de routine (étant donné que c'est un médicament demandé sur le marché), sans toucher à la qualité de l'analyse. Et pour cela on va faire des essais sur la MP pour optimiser les conditions opératoires.

5.2. Matériels :

❖ Produits utilisés :

➤ Fluvacol 80mg comprimé pelliculé à LP :

Fluvacol ® 80mg se présente sous forme de comprimés pelliculés rond, jaune, légèrement biconvexe, à bords biseautés d'environ 10mm de diamètre : boîte de 30 sous plaquettes thermoformées.



Figure 5.1 : Présentation de Fluvacol 80 mg comprimés pelliculés à LP.

➤ **Fluvastatine sodique (matière première) :**

- **Sa structure chimique :**

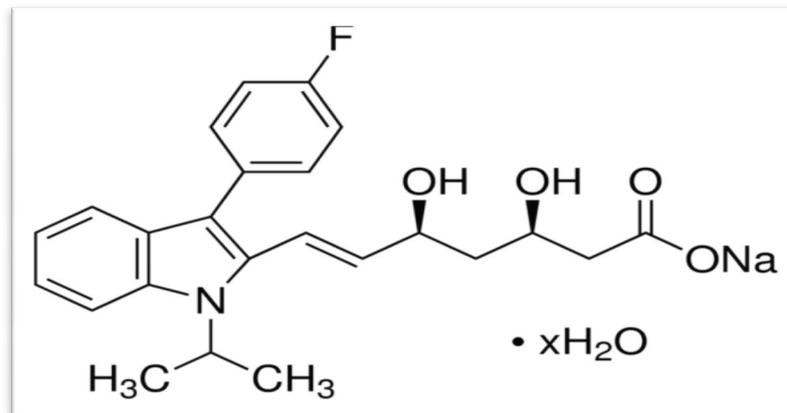


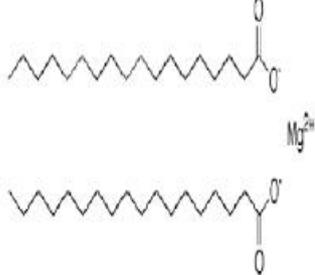
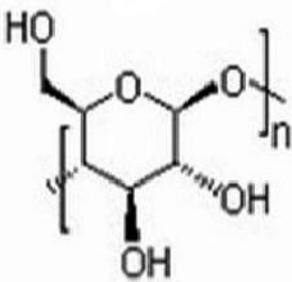
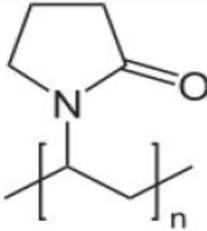
Figure 5.2 : structure chimique de Fluvastatin sodique. [3]

- **Sa pureté : 98,6%.**
- **Précaution particulière de conservation :**
 - A conserver à une température ne dépassant pas 25°C.
 - A conserver dans l’emballage d’origine à l’abri de la lumière et de l’humidité.

➤ **Les excipients :**

Les excipients utilisés pour la fabrication de fluvacol® 80 mg, comprimés pelliculés à libération prolongée sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5.1 : Quelques excipients de Fluvacol® 80 mg, comprimés pelliculés à libération prolongée.

Excipients	Définition	Structure chimique
<p>Stéarate de magnésium</p>	<p>C'est un sel constitué de deux anions stéarate et d'un cation magnésium, de formule $C_{36}H_{70}MgO_4$. Solide à température ambiante, il fond vers 88 °C et n'est pas soluble dans l'eau. On le trouve avec le stéarate de calcium dans la crasse de savon générée par l'action d'une eau dure sur un savon (s'il contient des stéarates).</p> <p>Cette substance de consistance onctueuse est utilisée en confiserie ou comme lubrifiant dans la fabrication des comprimés et des gélules.</p>	
<p>Cellulose microcristalline</p>	<p>La cellulose microcristalline est une cellulose purifiée, partiellement dépolymérisée. Elle est préparée par le traitement avec des acides minéraux de l'alpha-cellulose obtenue sous forme de pulpe à partir de matière végétale fibreuse.</p>	
<p>Povidone k30</p>	<p>La polyvinylpyrrolidone, appelée aussi polyvidone ou povidone, est un polymère organique synthétisé par polymérisation de la N-vinylpyrrolidone.</p>	

❖ **solvants utilisés :**

- Eau purifiée par osmose inverse.
- Méthanol à 99 %.(HPLC)
- Acétonitrile à 99,9 %.(HPLC)
- Acide phosphorique 85 % - 88%.
- Triméthylamine 99 %.

5.3. Equipements :

- Un HPLC de type WATERS H-CLASS 2695.

EMPOWER V2.0 a été utilisé pour contrôler le système HPLC, afin d'enregistrer les résultats et d'établir les chromatogrammes.

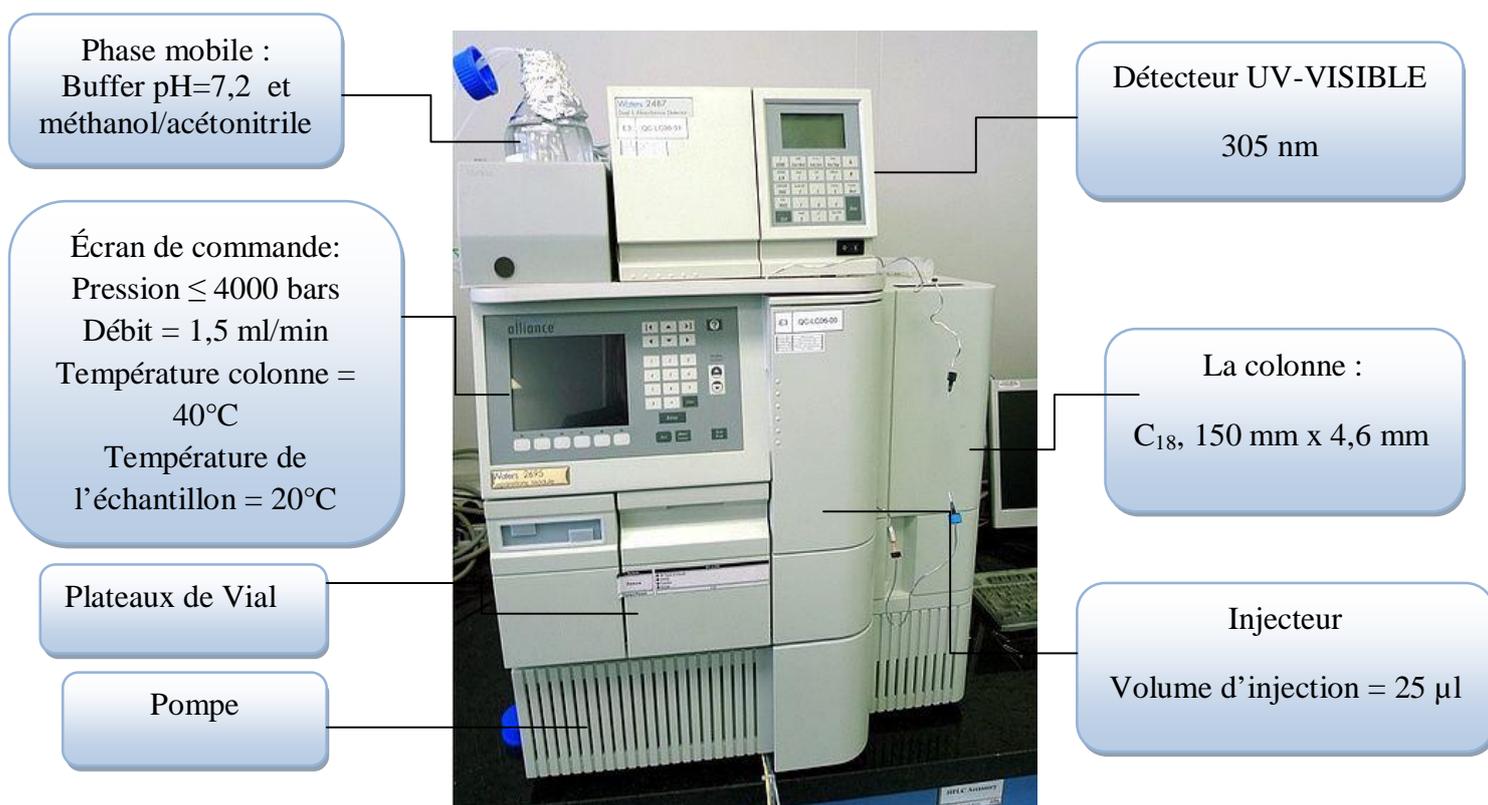


Figure 5.3: Appareil HPLC

Les autres équipements utilisés sont représentés dans les figures 5.4 (Annexe A).

5.4. Méthodes :

5.4.1 Conditions chromatographiques :

Les conditions chromatographiques proposées dans l'analyse de la Fluvastatin sont :

- Colonne : C₁₈, 150 mm x 4.6mm
- Débit d'injection : 1.5ml /min
- Détecteur, longueur d'onde : 305nm
- Volume d'injection : 25µl
- Température de la colonne : 40 °C
- Système suitability (la stabilité du système) :
 - ✓ CV ≤ 2.0 % de 5 injections du standard 1.
 - ✓ CV ≤ 2.0% entre la 5^{ème} injection du standard 1 et la 2^{ème} injection du standard 2.

5.4.2. Préparation des solutions :

➤ La préparation de la solution tampon :

Mélanger 10 ml de triméthylamine dans 1l d'eau, ajuster le pH en ajoutant approximativement 4,5 ml d'acide phosphorique.

➤ La préparation de mixture d'acétonitrile-méthanol :

Préparer une mixture de méthanol – acétonitrile (300 : 200).

➤ Préparation de la phase mobile : (solution A)

Phase mobile : La phase mobile est un mélange d'une solution tampon (pH = 7,2) et une mixture d'acétonitrile-méthanol. Elle doit être filtrée et dégazée (370 :630).

➤ Préparation du diluant : (solution B)

Mélanger 540 ml de la solution tampon pH = 7,2 avec 460 ml de la mixture méthanol-acétonitrile.

5.4.3. Préparation des solutions à injecter :

❖ Préparation du standard : (solution C)

Préparer deux standard 1et 2 de la même manière :

Peser avec précision 42 mg de Fluvastatin sodique (qui est équivalent à 40 mg de Fluvastatin) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre avec le diluant et mettre dans un

sonicateur pendant 10 minutes. Compléter au volume et filtrer avec un filtre à membrane en nylon 0,45µm.

❖ **Préparation de l'échantillon : (solution D)**

Peser 20 comprimés de Fluvacol. Les broyer en poudre fine et prendre une quantité équivalente à 80 mg de Fluvastatin sodique. Dissoudre avec 35 ml de méthanol dans une fiole jaugée de 50 ml. Mettre dans le sonicateur pendant 15 minutes puis ajuster avec le méthanol jusqu'au trait de jauge. Centrifuger pendant 20 minutes à 3000 rpm. Diluer 5 ml dans une fiole jaugée de 20 ml avec le diluant et filtrer avec un filtre à membrane 0.45µm.

❖ **Préparation du Placebo à 200% : (solution E)**

Dissoudre une quantité de placebo (tous les excipients sans principe actif) à 200% de la concentration d'essai dans une fiole de 200 ml. Mettre dans le sonicateur pendant 15 minutes après ajuster jusqu'au trait de jauge avec le diluant.

❖ **Préparation du standard à 200 % : (solution F)**

Peser avec précision 168 mg de Fluvastatin sodique dans une fiole jaugée de 200 ml. Dissoudre avec le diluant puis mettre dans le sonicateur pendant 15 minutes. Ajuster au volume avec le diluant et filtrer avec un filtre à membrane en nylon 0,45µm.

5.5. Validation de la méthode :

5.5.1. Spécificité :

❖ **Identification des excipients :**

Identifier les pics de chaque excipient pour permettre à la fin de faire la distinction entre la substance active à analyser et les excipients.

Les solutions d'identification sont préparées selon le tableau 5.2.

Tableau 5.2 : Préparation des solutions d'identification.

S1 et S2 (Fluvastatin Sodium)	Solution C
P (Placebo)	Prélever 5 ml de la solution E, mettre dans une fiole jaugée de 100 ml, puis ajuster avec le diluant. (solution G)
S1 + P S2 + P	Prélever 5 ml de la solution E, mettre dans une fiole jaugée de 100 ml contenant 70 ml de diluant et 42 mg de Fluvastatin sodique, mettre dans le sonicateur 15 minutes puis ajuster avec le diluant.
Diluant	Solution B
La phase mobile	Solution A

❖ Dégradation forcée :

Soumettre le produit "substance médicamenteuse" à un état de contrainte (dégradation forcée) en utilisant la température de l'hydrolyse acide et basique et de l'oxydation (par exemple NaOH 1N, HCl 1N, 30% de H₂O₂).

Les solutions à dégrader sont préparées selon le tableau 5.3.

Tableau 5.3 : préparation des solutions de la dégradation forcée.

solutions	S1	S2	S3	S4
Fluvastatin sodium	10 ml de (F) + 10 ml d'HCl	10 ml de (F) + 10 ml de NaOH	10 ml de (F) + 10 ml d'H ₂ O ₂	10 ml de (F) + 10 ml de diluant
Placebo	10 ml de (E) + 10 ml d'HCl	10 ml de (E) + 10 ml de NaOH	10 ml de (E) + 10 ml d' H ₂ O ₂	10 ml de (E) + 10 ml de diluant
Vt (ml)	20	20	20	20

- Chauffer les échantillons pendant au moins 4 heures dans un bain d'eau à température 60°C.
- Retirer et injecter les échantillons après chaque escale d'une heure bouillante.
- Le temps d'exécution est 3 fois le temps d'élution du standard (temps de rétention en chromatographie liquide).
- Vérifiez la pureté du pic de l'échantillon avec et sans dégradation en utilisant un détecteur UV-visible pour fournir des preuves documentées que l'analyte de pointe est résolu et pure à 100%. [17]

5.5.2. Linéarité :

Préparer une gamme d'étalonnage de cinq niveaux de concentrations (80, 90, 100, 110 et 120%)

En dissolvant respectivement : 33,6 mg ; 37,8 mg ; 42,0 mg ; 46,2 mg ; 50,4 mg du principe actif Fluvastatin sodique dans des fioles jaugées de 100 ml avec le diluant. Les solutions sont mises dans un sonicateur pendant 15 minutes puis complétés au volume avec le diluant. Préparer chaque niveau 3 fois et injecté en double injection.

- Le coefficient de variation doit être inférieur à 2%.
- Le coefficient de corrélation doit être égal à 0.999 %.

5.5.3. Précision (fidélité) :

Cette méthode étant prévue pour un contrôle qualité de routine au niveau d'El Kendi, on se limitera pour la précision aux 2 paramètres : la répétabilité, la précision intermédiaire.

❖ Répétabilité :

Faire 10 mesures (injections) de la solution (C). [17]

Le coefficient de variation entre les 10 injections doit être inférieur à 2,0 %.

❖ Précision intermédiaire :

Préparer 2 séries de 6 échantillons par deux analystes (solution D).

Le coefficient de variation des 12 résultats obtenus doit être inférieur ou égale à 2.0 %.

5.5.4. Exactitude (justesse) :

L'exactitude est évaluée avec 3 niveaux de concentration différents (correspondant à 80, 100 et 120 % de la concentration de la solution d'essai) en dissolvant respectivement : 33,6 mg ; 42,0 mg ; 50,4 mg de principe actif Fluvastatin sodique dans des fioles jaugées de 100 ml avec le diluant, les solutions sont mises dans un sonicateur pendant 15 minutes. Ajouter ensuite 5 ml de la solution (E). Compléter au volume avec le diluant.

Le coefficient de variation pour chaque niveau par rapport à une solution standard doit être inférieur à 2,0 %.

5.5.5. Robustesse :

Afin d'évaluer la robustesse de la méthode, plusieurs paramètres qui sont variés (**voir le tableau 5.4**), pouvant influencer l'analyse. L'essai a été réalisé sur la solution C.

❖ Changements des paramètres chromatographiques :

Préparer une solution standard (solution C).

Injecter aux conditions normales puis injecter en changeant les paramètres (à chaque fois on change un paramètre et on garde les autres à l'état initial).

Les paramètres à changer sont regroupés dans le tableau 5.4.

Tableau 5.4 : la variation des paramètres chromatographiques.

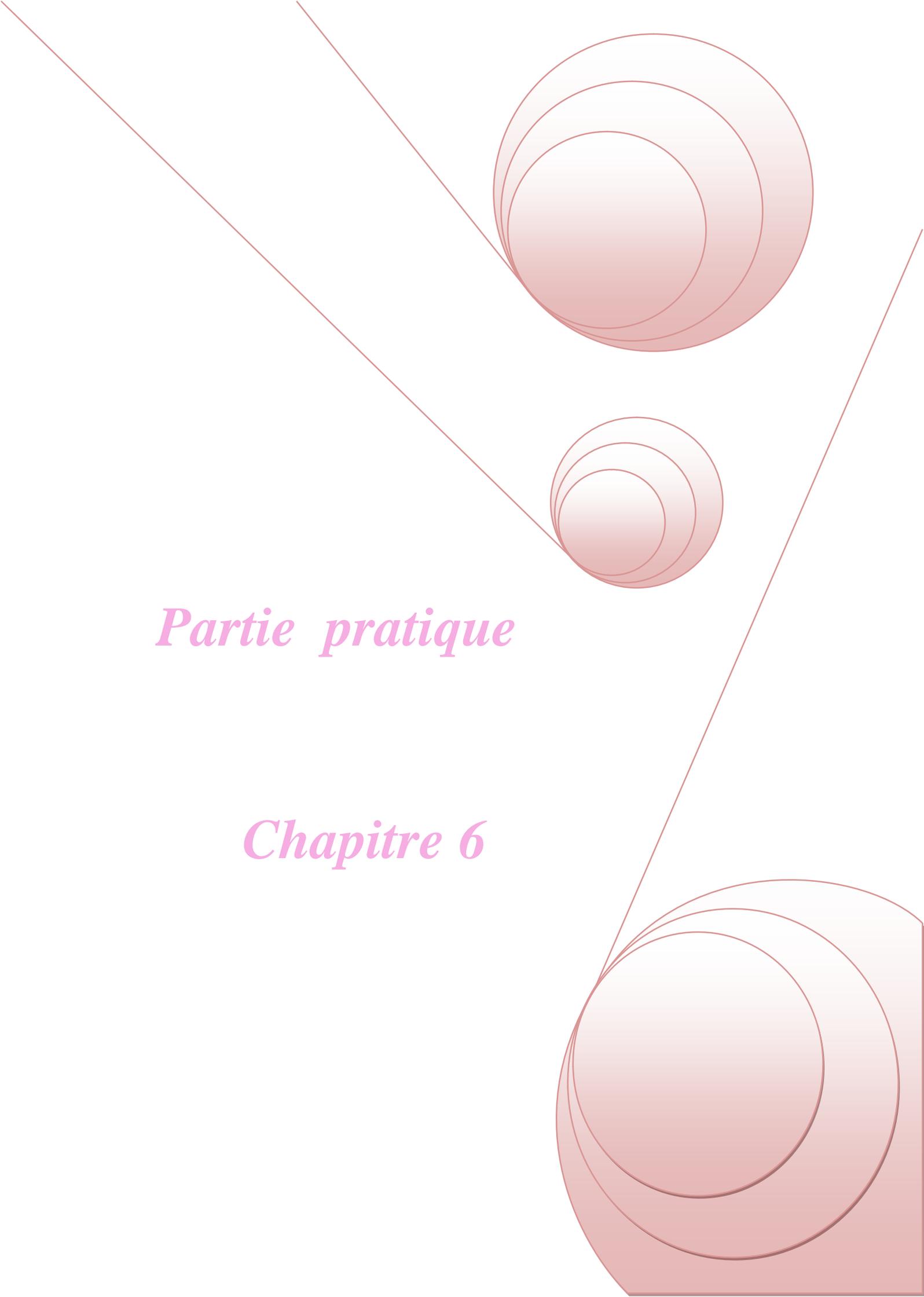
Paramètres	Variations
Débit (ml/min)	$\pm 0,2$
Longueur d'onde (nm)	± 2
Température de la colonne (°C)	± 3
Proportions de la phase mobile	$\pm 5\%$
pH de la phase mobile	$\pm 0,5$

❖ Stabilité des échantillons :

Cette étude permet d'évaluer la durée de stabilité des solutions standards et échantillons lors de l'analyse afin de prévoir et définir des conditions de conservation.

Elle sera réalisée sur les solutions C et D .Les solutions sont conservées dans l'auto-injecteur et le réfrigérateur pendant 72 h et des prélèvements sont effectués chaque 24 h.

La teneur en principe actif dans les solutions après 24 h, 48 h et 72 h ne doit pas varier de $\pm 2\%$.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three overlapping circles of varying sizes, each with a red-to-white gradient. Two thin red lines extend from the top left towards the circles, and another line extends from the top right towards the bottom circle. The circles are positioned in the upper right, middle right, and lower right areas of the page.

Partie pratique

Chapitre 6